

Ecotoxicidade em água de amostras de óleo recuperadas de áreas afetadas no Litoral do Nordeste brasileiro

Debora Cristina Nascimento de Santana

São Vicente

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

Ecotoxicidade em água de amostras de óleo recuperadas de áreas
afetadas no Litoral do Nordeste brasileiro.

DEBORA CRISTINA NASCIMENTO DE SANTANA

ORIENTADOR: DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Biodiversidade de
Ambientes Costeiros.

São Vicente

2023

S232e

Santana, Debora Cristina Nascimento de
Ecotoxicidade em água de amostras de óleo recuperadas de áreas
afetadas no Litoral do Nordeste brasileiro / Debora Cristina
Nascimento de Santana. -- São Vicente, 2023
45 p. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Ecologia marinha. 2. Água Conservação. 3. Água
Poluição. 4.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, aquele que me direciona minha vida e me deu caminhos por onde eu nunca poderia ter imaginado estar, me fortaleceu em toda essa jornada me dando a oportunidade de aprender em diferentes caminhos

Não poderia deixar de expressar o quão grata sou pela minha família, a meus pais, por todo o suporte que me permitiram chegar aonde estou, pela paciência com os humores na íntegra, a falta de disponibilidade de tempo e todo o aconselhamento e sem os quais eu não poderia ter tido todas as conquistas ao longo dessa caminhada e que me permitiu construir o meu eu até aqui. Assim como outros familiares que expressaram seu apoio de alguma maneira, meu irmão e primos principalmente.

À toda a comunidade acadêmica em que estive envolvida, ao meu orientador que se dispôs a dar oportunidade de aprender mais sobre essa linda função que é estudo da ecotoxicologia disponibilizando de tempo muitas vezes inoportunos para me auxiliar. As pessoas na secretaria (principalmente Fabiana) que lidou com a minha desatenção com os prazos. As técnicas que sempre auxiliaram e se dispuseram a ajudar bem como o restante dos servidores, que de alguma maneira acrescentam em nossa rotina. Obviamente não serão nessas poucas linhas descritas que serão citadas todas as pessoas e profissionais que foram fundamentais para essa conquista, e que estiveram diretamente envolvidos no crescimento pessoal e profissional desde o começo deste curso.

Aos que se dispuseram a me auxiliar, seja em testes ou correções, em especial, Carol, Lucas e Fernando e aos que prestaram apoio em múltiplas formas, Guacira e Caio, mas também todo o corpo do grupo de pesquisa do Nepea que em algum momento me auxiliou durante essa jornada como a Juliana Nicolau. Também devo mencionar o pessoal do Unisanta, em especial a Paloma que confiou em mim para me recomendar a ajudar a Juliana Pereira que se tornou uma grande parceira de (des)aventuras com experimentos várias vezes.

E as dificuldades que nos confrontam e nos impulsionam a mudanças que geram o nosso desenvolvimento.

"Tudo que o homem semear, isso também colherá"

gl 6:7

Lista de Figuras

Figura 1. Localidades verificadas quanto ao registro de novas manchas no litoral do estado da Bahia, considerando as áreas oleadas até a data de 12/03/2020. Dados da última vistoria. Os pontos em vermelho indicam as regiões onde foram coletadas as amostras usadas para os testes realizados nesta pesquisa. O ponto superior ao norte indica a praia do Massarandupió, enquanto o ponto inferior no sul, indica a praia do trancoso. (extraído de IBAMA, 2019).

Figura 2. Amostras de óleo coletadas nas praias nordestinas onde ocorreram o derramamento em 2019. Notar diferenças visíveis entre a viscosidade e estado de intemperismo das amostras.

Figura 3. Náuplio de *Artemia* sp. na fase de uso para o teste de toxicidade, metanáuplio II.

Figura 4. Desenvolvimento embrionário do ouriço *Echinometra lucunter* nas diferentes diluições de FSA. Asterisco (*) significa diferença significativa com o controle ($p < 0.05$).

Figura 5. Taxa de sobreviventes de *Artemia salina* nas diferentes diluições de FSA realizadas com a amostra 1 em 24 e 48 horas. Asterisco (*) indica diferença significativa com o controle dentro do mesmo tempo de exposição ($p < 0.05$).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Amostras utilizadas para realização das frações solúveis para os organismos testes avaliados e seus respectivos tratamentos.

Tabela 2. Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (HA) quantificado para todas as frações solúveis em água (FSA) das três amostras de petróleo analisadas. (<DL = concentrações abaixo do limite de detecção).

Tabela 3. Concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) quantificado nas frações solúveis em água (FSA) das três amostras de petróleo analisadas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (<DL = concentrações abaixo do limite de detecção).

Tabela 4. Dados estatísticos de concentrações inibitória para 50% dos organismos (C.I.50) e concentração de efeito observável e não observável (CEO e CENO) para o desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* nas diferentes diluições de FSA realizadas com as amostras 1, 2 e 3. (nd = não determinável)

Tabela 5. Concentrações letais em 10% dos organismos e concentrações de efeito observável e não observável nos diferentes períodos de exposição, obtidas no teste de toxicidade com náuplios de *Artemia* sp exposta a fração solúvel de óleo encontrado na Bahia.

Tabela 6. Estudos sobre toxicidade de frações solúveis de petróleo ou seus derivados, utilizando organismos marinhos.

Resumo

No segundo semestre de 2019 surgiram manchas de óleo que atingiram toda a extensão do nordeste brasileiro. Isso apresenta alto risco à saúde dos organismos marinhos em diversos âmbitos como o contato com as frações de óleo que se dissolvem na água. A fim de avaliar os riscos deste composto foram realizadas análises ecotoxicológicas para averiguar os efeitos causados pela exposição desse material. Desse modo, foram preparadas, em laboratório, frações solúveis em água a partir de três amostras coletadas em diferentes pontos. Com estas frações foram realizadas análises químicas para quantificar o total de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (TPHA) e alifáticos (THA) presentes nas frações solúveis e realizados testes com o objetivo de avaliar a mortalidade em *Artemia salina* e o desenvolvimento embrionário em *Echinometra lucunter*. Os resultados encontrados nas análises químicas detectaram valores quantificáveis para HA e HPA que foram superiores nas FSA da amostra 3 em comparação às outras amostras avaliadas. Quanto aos testes de toxicidade, o organismo *Artemia salina* apresentou concentrações que obtiveram diferença significativa com o controle a partir de 5% após 48 horas de exposição para a amostra 1. Já no para os testes realizados com *Echinometra lucunter*, expostos às FSA de 3 amostras, encontrou-se diferença significativa com o controle a partir das concentrações de 50% após 48hs de exposição. Os organismos avaliados mostraram baixa sensibilidade nas frações avaliadas quando comparadas a estudos anteriormente estudados com frações solúveis de óleo. Todavia, encontrou-se nas frações solúveis avaliadas concentrações de hidrocarbonetos compatíveis com estudos realizados com amostras ambientais e que apresentaram toxicidade aos organismos avaliados demonstrando assim o potencial tóxico dessas frações aos organismos que possam ser expostos as frações solúveis destes materiais. Conclui-se que o óleo que atingiu as praias brasileiras no ano de 2019 apresentava condições para contaminar a coluna d'água, pela solubilização de hidrocarbonetos, e afeta negativamente as populações de invertebrados marinhos após a exposição às frações solúveis deste óleo. Mais estudos precisam ser realizados para aperfeiçoar a compreensão dos efeitos dos óleos encontrados nas praias nordestinas em organismos marinhos.

Palavras-chave: *Artemia salina*, Fração solúvel do óleo, *Echinometra lucunter*, HPA, Desastre ambiental.

Abstract

In the second half of 2019, oil stains appeared that reached the entire length of the Brazilian northeast. This poses a high risk to the health of marine organisms in various areas, such as contact with oil fractions that dissolve in water. In order to assess the risks of this compound, ecotoxicological analyzes were carried out to investigate the effects caused by exposure to this material. Thus, water-soluble fractions were prepared in the laboratory from three samples collected at different points. With these fractions, chemical analyzes were carried out to quantify the total amount of polycyclic aromatic hydrocarbons (TPHA) and aliphatic hydrocarbons (THA) present in the soluble fractions, and tests were carried out with the aim of evaluating mortality in *Artemia salina* and embryonic development in *Echinometra lucunter*. The results found in the chemical analyzes detected quantifiable values for HA and HPA that were higher in the FSA of sample 3 compared to the other evaluated samples. As for the toxicity tests, the organism *Artemia salina* showed concentrations that obtained a significant difference with the control from 5% after 48 hours of exposure for sample 1. As for the tests carried out with *Echinometra lucunter*, exposed to the ASF of 3 samples, a significant difference was found with the control from concentrations of 50% after 48 hours of exposure. The evaluated organisms showed low sensitivity in the evaluated fractions when compared to previously studied studies with oil soluble fractions. However, concentrations of hydrocarbons compatible with studies carried out with environmental samples were found in the evaluated soluble fractions, which showed toxicity to the evaluated organisms, thus demonstrating the toxic potential of these fractions to organisms that may be exposed to the soluble fractions of these materials. It is concluded that the oil that fed the Brazilian beaches in 2019 was able to contaminate the water column, due to the solubilization of hydrocarbons, and affected the appearance of marine invertebrates after exposure to the soluble fractions of this oil. More studies need to be carried out to improve the understanding of the effects of oils found on Northeastern beaches on marine organisms.

Keywords: *Artemia salina*, Water Soluble fraction of oil, *Echinometra lucunter*, HPA, Environmental disaster.

Sumário

1. Introdução e Objetivo.....	11
1.1. Derramamento de petróleo.....	11
1.2. Caso de surgimento de manchas de óleo em praias do litoral brasileiro em 2019.....	12
1.3. Petróleo, hidrocarbonetos e fração solúvel.....	16
2. Metodologia.....	19
2.1 Preparação da fração solúvel em água – FSA.....	19
2.2 Análises químicas.....	20
2.3 Testes de ecotoxicidade.....	21
2.3.1 Teste de toxicidade crônica - Desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar (<i>Echinometra lucunter</i>).....	21
2.3.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	22
2.4 Análises dos dados.....	23
3. Resultados.....	24
3.1 Análises químicas.....	24
3.2 Testes de ecotoxicidade.....	28
4. Discussão e Conclusões.....	31
5. Referências.....	36

1. Introdução e Objetivos:

1.1. Derramamentos de petróleo

O petróleo é um composto de alta relevância na sociedade e fundamenta boa parte da economia mundial, assim como o desenvolvimento econômico. Entretanto, os processos relacionados com sua extração, uso, transporte, beneficiamento e disposição de seus resíduos envolvem riscos e geram muitas questões ambientais, dentre elas, os derramamentos e acidentes que periodicamente ocorrem contaminando os ecossistemas, causando impactos ambientais com consequências graves (Parviainen et al, 2021).

Os corpos hídricos são atingidos com frequência por estes acidentes envolvendo petróleo e seus derivados, e uma parte significativa desse material acaba sendo lançada nos oceanos. Ao longo da história ocorreram acidentes de grande relevância, principalmente pelas suas dimensões e impactos, que resultaram em um aumento exorbitante de estudos e avaliações sobre os efeitos da toxicidade do petróleo e seus derivados (Aranguren-Abadía et al, 2022).

Dentre os casos com derramamento no oceano podemos citar os casos da plataforma Deepwater Horizon, que foi o maior incidente do tipo com a liberação de 5 milhões de barris de óleo no mar (Beyer et al, 2016). Outro evento importante foi o acidente com o navio Exxon Valdez, em 1989, com mais de 36.000 toneladas de petróleo bruto sendo liberadas no mar (Ramseur, 2010). No Brasil, podemos citar a explosão do cargueiro chileno Vicuña em novembro de 2004, no porto de Paranaguá, que havia sido considerado o maior acidente na Baía de Paranaguá até então, no qual 4 tripulantes morreram e cerca de 1 milhão de litros de metanol e 5 milhões de litros de óleo combustível vazaram no mar. Destes, apenas foram retirados do mar cerca de 1,2 milhões de litros de metanol e 2,5 milhões de litros de água oleosa, causando a morte de centenas de animais incluindo crustáceos, golfinhos, tartarugas e aves aquáticas (Silva, 2019).

Algumas ações vêm sendo tomadas para diminuir o risco de derramamentos, como melhorias nas embarcações, aprimoramento na capacitação das equipes envolvidas na manipulação e transporte do óleo, organização de ações preventivas e planos para ações de resposta, estas ações estão constantemente sendo revisadas. Também existem locais onde a regulamentação é mais rígida como as do Alasca e Mar Ártico adjacente, as quais exigem a diminuição das concentrações de enxofre para que o transporte seja autorizado (Szklo e Schaeffer, 2007). Contudo, os acidentes envolvendo petróleo continuam ocorrendo e gerando danos ambientais e socioeconômicos (Miranda et al, 2022)

As legislações abordando ações de resposta a estes tipos de acidentes têm sido aprimoradas no Brasil desde 1967, como a lei federal nº 5.357/1967 (Anexo 1), que apenas imputava multas àqueles que lançassem detritos ou óleo em águas jurisdicionais brasileiras, permanecendo em vigor até 2000, quando foi substituída pela Lei Federal nº 9.966/2000 (Anexo 2). Traz consigo os princípios básicos a serem obedecidos na movimentação do óleo e outras substâncias nocivas. No âmbito internacional, a MARPOL 73/78 - Convenção Internacional para Prevenção da Poluição Causada por Navios já estabelecia regras para a prevenção da poluição causada por óleo, sendo internalizada no Brasil por meio do decreto legislativo nº60/95 e do decreto executivo nº 20508/98 (Anexos 3 e 4) que também regulamenta as ações no caso de acidentes (Brasil, 2008).

Além dos aparatos legais, o Brasil dispõe também de regulamentos para as ações de resposta e combate ao óleo no mar, em caso de acidentes, que incluem a elaboração e uso de cartas de sensibilidade ambiental ao óleo, planos de contingência e mobilização da estrutura institucional para tais ações (Oliveira et al, 2022). Porém, algumas falhas operacionais podem ser identificadas, evidenciando a necessidade de avanços e aprimoramentos como em distribuição de competências e ações rápidas de respostas. Por exemplo, o fato do Brasil não ser signatário do fundo internacional de compensação sobre derramamento de óleo impede o acesso do país a esses recursos para mitigação dos danos causados por derrames que ocasionalmente podem ocorrer. Em 2019, houve um incidente de grandes proporções no litoral brasileiro, com o aparecimento de toneladas de óleo, de origem desconhecida, que atingiram uma extensa área das regiões nordeste e sudeste. No caso desse incidente, os recursos foram obtidos apenas 3 a 4 meses após as primeiras observações de óleo nas praias, quando já se havia retirado boa parte do material e o surgimento de novas manchas já diminuía (Lima et al, 2021).

A escassez de informações publicadas sobre espécies que podem ser afetadas e a dificuldade em acessar informações sobre os potenciais alvos do óleo levam a uma subestimativa, pelos planos de contingência, dos efeitos adversos causados nas áreas costeiras. Também faltam informações sobre endemismo, raridade e principalmente vulnerabilidade de espécies encontradas em determinadas áreas (Oliveira et al, 2022), necessárias para a atribuição de importância às áreas costeiras sob risco de exposição ao óleo.

1.2. Caso de surgimento de manchas de óleo em praias do litoral brasileiro em 2019

Em 30 de agosto de 2019 foi registrado o surgimento de manchas de petróleo no Município do Conde, Paraíba, nas praias de Jacumã e Tambaba. Este foi o primeiro relato de

uma sequência trágica do que viria a ser o maior incidente no litoral já visto até então. Nos dias que se seguiram, esporádicas manchas oleosas surgiram nas praias nordestinas. Em cinco semanas, todos os nove estados já haviam apresentado aparecimento de manchas em alguma localidade (Miranda et al, 2022).

Mesmo a maior parte dos registros sendo observada na região nordeste do Brasil. O mesmo aconteceu no sudeste, tendo o primeiro ocorrido na praia do Guriri, no litoral de São Mateus, no norte do Espírito Santo, em 7 de novembro. Fragmentos foram registrados também no Rio de Janeiro, em proporções muito menores em ambos os locais (Disner et al, 2022).

O IBAMA informou que 5.300 toneladas de resíduo de óleo (ainda com algum agregado de areia) foram removidos do ambiente, sendo o estado de Alagoas, o que mais obteve quantidade coletada, com mais de 2000 toneladas (apresentação do governador do Estado na COMPESA, Secretaria de Planejamento e Gestão, SEPLAG, 29/10/2019). Apesar do grande volume de óleo removido ficou ainda uma quantidade do óleo retida. Podemos caracterizar este como um evento de grande escala (Baker, 1985), sendo o maior incidente de petróleo em áreas costeiras já ocorrido no Brasil.

Logo após a ocorrência das primeiras manchas, as comunidades locais se mobilizaram para ajudar a remover o óleo das praias. Entre os milhares de voluntários, destacou-se a atuação daqueles que vivem de pesca artesanal ou do turismo local, que tiveram suas fontes de renda afetadas pela chegada do óleo, e não viam ações efetivas de limpeza nas praias, função esta que foi assumida em boa parte pela marinha do Brasil, na ausência do agente responsável. (Pena et al, 2020). Além disso, ocorreram relatos de intoxicação desses voluntários após exposição ao óleo que possui toxicidade já conhecida, principalmente pela inalação, podendo inclusive gerar irritações na pele, entre outros efeitos. Um risco a qual foram submetidos pois a maioria deles não utilizava equipamentos de segurança (Disner et al, 2020).

Mesmo assim, o Ministério da Saúde e a Marinha do Brasil emitiram, apenas no dia 24 de outubro, as recomendações para retirada do material, e também evitar o contato direto com o óleo, o qual contém substâncias cancerígenas. Em 25 de outubro, o governo anunciou a criação de uma página na internet contendo informações sobre o surgimento de manchas (IBAMA, 2019b). Só então houve detalhes específicos sobre locais e fauna afetados foram divulgados.

Ao se tratar especificamente do estado da Bahia e sua vasta área litorânea que possui uma riqueza de biodiversidade da qual muito ainda há por ser descoberta. Esta possui diferentes áreas para preservação ambiental seja no sul da Bahia que conta por exemplo com o Parque Nacional de Abrolhos, a reserva extrativista Marinha de Ponta do Corumbau e a APA Caraíva/

Trancoso, ou como no norte com a APA Litoral Norte. Estas áreas possuem praias voltadas ao oceano e à baía, mangues, estuários, costões e recifes de corais áreas de preservação com grupos taxonômicos abundantes como equidoneurmatas, Toxopneustidae, Arbaciidae e Mellitidae.(Amaral e Jablonski, 2005; Nunes e Matos, 2017) as quais são reconhecidas áreas por possuírem uma grande diversidade biológica e pelos serviços ecossistêmicos prestados, como fonte de recursos pesqueiros, fornecimento de proteção a costa contra ondas e geração de renda através do turismo (IMO/UNEP, 2009)

As primeiras amostras do Estado da Bahia datam de 04 de outubro de 2019. O governo do estado da Bahia estimou em 459,59 toneladas o total recolhido das praias atingidas até o dia 28/10/2019. (IBAMA, 2019) As praias atingidas foram demarcadas e a quantidade de material encontrado foi descrita para cada uma. O total de locais vistoriados e marcados na última vistoria realizada pelo Ibama em março de 2020 podem ser vistas na Figura 1 para este estado.

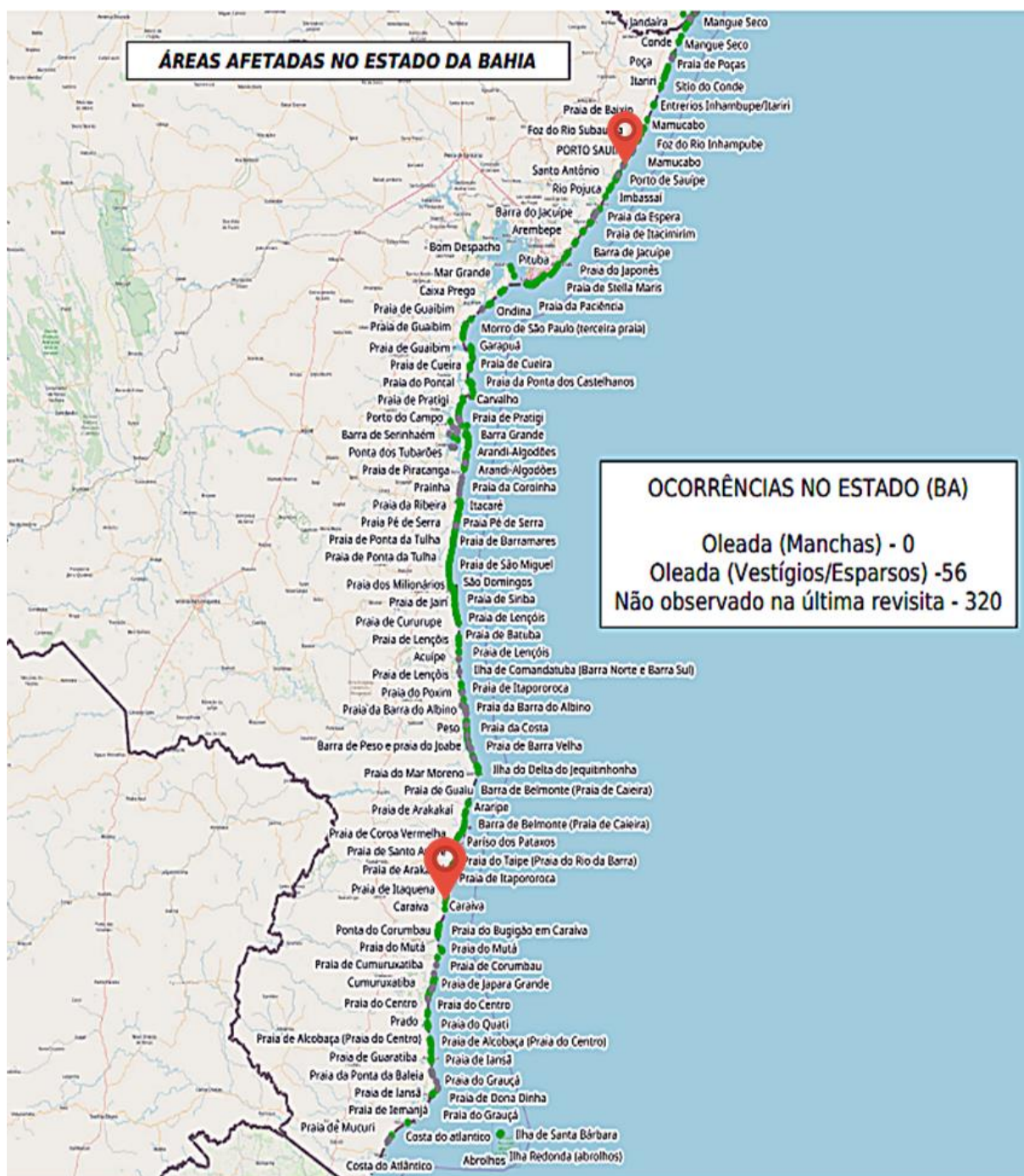


Figura 1. Localidades verificadas quanto ao registro de novas manchas no litoral do estado da Bahia, considerando as áreas oleadas até a data de 12/03/2020. Dados da última vistoria. Os pontos em vermelho indicam as regiões onde foram coletadas as amostras usadas para os testes realizados nesta pesquisa. O ponto superior ao norte indica a praia do Massarandupió, enquanto o ponto inferior no sul, indica a praia do Trancoso. (extraído de IBAMA, 2019).

1.3. Petróleo, hidrocarbonetos e fração solúvel

O petróleo bruto tem origem biológica, sendo originado a partir de matéria orgânica submetida a alta pressão e temperatura por milhões de anos em depósitos sedimentares, sendo que sua composição depende diretamente da fonte da matéria orgânica que a originou. Geralmente, é composto por uma mistura complexa com mais de 1000 compostos de hidrocarbonetos com peso molecular variando de baixo (de C1) a alto (mais de C38). Os principais grupos presentes nele são hidrocarbonetos saturados (alcanos e cicloalcanos) ou aromáticos, resinas, asfaltenos (compostos policíclicos contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio), e compostos organometálicos (NRC, 2003).

Após o derramamento, o óleo sofre vários processos de degradação, como espalhamento, evaporação, dispersão, emulsificação, dissolução, oxidação, sedimentação e biodegradação. Através da emulsificação, é gerado o mousse (óleo + água), promovendo o aumento significativo do volume deste poluente no ambiente. Devido à sua persistência no ambiente marinho, o mousse pode transportar os compostos aromáticos a longas distâncias (GESAMP, 1993).

Por consequência do processo de intemperismo e perda dos compostos monoaromáticos (benzeno, tolueno, xileno) do mousse, os HPA são os principais contribuintes para a toxicidade dos óleos intemperizados (NRC, 2003). Os HPA formam uma vasta classe de substâncias orgânicas contendo dois ou mais anéis aromáticos fundidos, podendo ou não conter grupos substitutos ligados (Hylland, 2006).

Apesar destes compostos apresentarem potencial carcinogênico em baixas concentrações, os HPA possuem baixa solubilidade em água. Devido a sua natureza hidrofóbica, a solubilidade aquosa dos HPA diminui quando estes fazem parte de uma mistura, pois os compostos tendem a permanecer no óleo devido a sua baixa polaridade. Contudo sua natureza hidrofóbica torna-o suscetível a se ligar à matéria orgânica e tecidos dos organismos (Shiu et al, 1990). Os HPA podem variar amplamente em suas propriedades devido à grande variedade de tamanhos e massa molecular (Newman e Unger, 2002). Compostos com grande massa molecular são considerados hidrofóbicos e tendem a acumular em sedimentos e nos organismos. Já os compostos de menor massa molecular têm propriedades tóxicas agudas (Newman e Unger, 2002). Quanto à solubilidade em água dos hidrocarbonetos aromáticos do petróleo, Xie et al, (1997) destacam que a salinidade interfere na solubilidade desses compostos, diminuindo suas concentrações solúveis.

Devido à alta detecção de HPA no meio ambiente e ao fato de esses compostos apresentarem toxicidade e potencial carcinogênico, a United States Environmental Protection Agency (USEPA), agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América, estabeleceu 16 HPA prioritários, considerados particularmente importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Fluoranteno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo-[a]pireno, Indeno[1,2,3-c,d]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]perileno (USEPA, 1999).

Por sua vez, a fração solúvel em água (FSA) pode ser definida como a fase aquosa após a aplicação de energia que mistura a água, seja doce ou salina ocorrendo o envolvimento das moléculas do solvente (água) nas partículas do soluto (petróleo), dissolvendo-as, com óleos brutos por longo período variando do quanto e da força aplicada..(Shen e Yapa, 1988) A dissolução é um processo importante do ponto de vista de possíveis danos biológicos, embora seja responsável por apenas uma fração desprezível do balanço de massa do óleo. Em sua composição contém abundância de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Bera et al, 2019) e outras substâncias solúveis em água. E a capacidade destes compostos químicos para partição na fase aquosa é regida por propriedades físico-químicas comuns (principalmente polaridade, medida pelo coeficiente de partição octanol-água - Kow) (Liu e Kujawinski, 2015).

O óleo entranhado na coluna d'água pode ser responsável por danos aos organismos marinhos por diferentes vias, como através da ingestão de gotículas de óleo e incorporação do óleo no zooplâncton (Lee et al., 1985). Nesse sentido, em alguns casos de derramamento foram avaliadas a presença de marcadores de petróleo e encontrados níveis elevados na coluna d'água, passados 1,5 anos, em locais próximos do acidente ocorrido no Golfo do México com a plataforma Deepwater Horizon (Paul et al., 2013), mantendo-se biodisponível para causar efeitos nos organismos a eles expostos.

Recobrimento, inalação e ingestão de óleo por aves e mamíferos marinhos podem causar efeitos letais ou subletais devido à sua toxicidade, como danos ao sistema nervoso redução da habilidade de se alimentar ou digerir os alimentos (GESAMP, 1993; USEPA, 1999; Islam & Tanaka, 2004). Estudos de toxicidade mostram que o copépodo *Tigriopus japonicus* pode ser impactado negativamente pelo óleo e dispersantes em seu desenvolvimento e sua reprodução. (Lee et al, 2013). Mais além, o efeito tóxico do óleo pode causar uma série de problemas à saúde humana, através de sua inalação, contato com a pele ou até mesmo ingestão acidental. Esse contato do homem com o petróleo é mais intenso dentro das refinarias, terminais e navios, mas pode ocorrer também durante as operações de limpeza das áreas atingidas, e também por

meio do consumo dos pescados na região onde ocorreram. (Euzebio et al, 2019) Os efeitos toxicológicos do óleo no homem estão associados principalmente a irritação na pele e olhos, náuseas, vômitos, sensação de embriaguez e dores abdominais (NRC, 1985). Outros estudos indicaram a relação entre o aumento de casos de diabetes gestacional em mulheres que tiveram exposição prolongada e outros impactos no sistema reprodutor como a diminuição da qualidade do sêmen ou sua má-formação.

Embora os HPA possam ser metabolizados pelos organismos vertebrados e invertebrados, em um processo iniciado pelo sistema citocromo P450, eles podem ser acumulados em invertebrados que possuem atividade metabólica reduzida. Porém, mesmo nos vertebrados, pode existir a baixa capacidade de eliminação dos HPA mais hidrofóbicos, os quais podem se acumular nos tecidos adiposos (Lourenço et al, 2021). Em peixes, a acumulação de hidrocarbonetos solúveis é extremamente rápida e esses compostos são metabolicamente degradados por biotransformação enzimática, sendo um mecanismo essencial para o modo de ação de compostos genotóxicos (Sorhus et al, 2021).

Considerando que o aparecimento do óleo no litoral da região nordeste do Brasil como evento que gerou os impactos aos ecossistemas costeiros, o objetivo principal do presente estudo é avaliar a toxicidade da fração solúvel em água (FSA) de amostras ambientais de óleo coletadas em praias nordestinas. Foram usados como organismos modelos náuplios de *Artemia salina*, organismo de fácil obtenção e com resposta rápida e eficaz além de embriões de ouriço do mar *Echinometra lucunter* que também são organismos largamente utilizados em avaliações ecotoxicológicas já que estão amplamente distribuídos sendo assim fáceis de coletar e bons representantes para avaliação de impacto ambiental. É válido ressaltar também o baixo custo e a ausência de necessidade de manutenção de cultivo bem como a sensibilidade dos organismos nas fases de seus ciclos de vida que foram avaliadas.

A hipótese deste trabalho foi de que o óleo derramado no ecossistema aquático pode produzir uma FSA que contém hidrocarbonetos e oferece riscos para os organismos marinhos, por produzir efeitos tóxicos. Para atingir este objetivo principal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estimar a liberação de hidrocarbonetos (alifáticos e policíclicos aromáticos) na água através da análise química da fração solúvel preparada em laboratório;
- Avaliar a toxicidade aguda da fração solúvel de amostra de óleo coletada nas praias do nordeste sobre a sobrevivência do crustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a toxicidade das frações solúveis de amostras de óleo coletadas em praias do nordeste sobre o desenvolvimento embrio-larval do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.

2. Metodologia:

2.1 Preparação da fração solúvel em água - FSA

Três soluções-estoque contendo as frações solúveis de óleo em água do mar foram preparadas, a partir de três amostras de óleo coletadas em diferentes pontos do litoral da Bahia, seguindo o protocolo ABNT/ NBR 15.469. As amostras contemplaram as praias de Trancoso (Litoral Sul) e Massarandupió (Litoral Norte). Estes fragmentos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Rafael Lourenço, do Instituto Oceanográfico da USP. As amostras de óleo nas praias da Bahia foram coletadas durante o período de surgimento do óleo, quando estava sendo realizada a retirada do material bruto acumulado na linha de costa por meio dos voluntários onde parte do material foi entregue a grupos de pesquisas. Armazenou-se algumas amostras em marmitex de alumínio descartável e outras em potes de vidro as quais foram mantidas em refrigeração à $5^{\circ}\text{C} \pm 2$. As amostras utilizadas foram enumeradas de acordo com o pote em que foram armazenadas em conjunto a localidade a qual estava demarcada sendo então referidas para o presente estudo como Amostras 1, 2 e 3. Tendo as duas primeiras tendo sido coletadas na praia do trancoso e a última na praia de Massarandupio como descritos na **Tabela 1**.

Quanto ao preparo das frações solúveis, primeiramente a água do mar foi coletada no Parque Estadual Marinho da Laje de Santos (SP) para uso como controle e água de diluição, e posteriormente filtrada com membrana de $45\mu\text{m}$ e autoclavada para em seguida ser misturada ao petróleo coletado com proporção de 9/1 (água/óleo) seguindo o método padronizado por Nordtug et al (2011). Com o auxílio de um agitador magnético de baixa energia (160 rpm) durante o período de 20 horas a mistura foi homogeneizada para a formação das gotículas dissolvidas. A camada aquosa foi drenada após 2 horas de decantação depois de desligado o agitador magnético sendo colocado em garrafas de vidro âmbar limpas e posteriormente armazenadas em refrigerador em temperatura de cerca de 4°C . Para o preparo dos testes, a solução estoque (100%) foi diluída em água do mar filtrada para a obtenção das concentrações de 0,1%; 1%, 10% e 50%.



Figura 2. Amostras de óleo coletadas nas praias nordestinas onde ocorreram o derramamento em 2019. Notar diferenças visíveis entre a viscosidade e estado de intemperismo das amostras.

No que diz respeito à Amostra 1, observou-se alta concentração visível de material suspenso (partículas de óleo e sedimento) na solução inicial (100% da amostra 1), dessa forma, para o teste preliminar, esta amostra teve sua solução estoque diluída em mais 10x, obtendo-se assim uma solução de 10%, da qual foi gerada um novo range de diluição seriada para as concentrações. As amostras 1 e 3 seguiram as diluições a partir da concentração de 100%. As concentrações utilizadas para cada amostra seguem descritas na **Tabela 1**:

Tabela 1. Amostras utilizadas para realização das frações solúveis para os organismos testes avaliados e seus respectivos tratamentos

Organismo	Concentração (%)	Amostra (localidade)
<i>Artemia salina</i>	0,01; 0,1; 1; 5 e 10	Amostra 1 (Trancoso)
<i>Echinometra lucunter</i>	0,01, 0,1, 1, 5, 10, e 100	Amostra 1 (Praia do Trancoso)
<i>Echinometra lucunter</i>	0,01, 0,1, 1, 10, 50, 100	Amostra 2 (Praia do Trancoso)
<i>Echinometra lucunter</i>	0,1, 1, 10, 50, 100	Amostra 3 (Praia do Massarandupió)

2.2 Análises químicas

Foram realizadas análises para determinação dos hidrocarbonetos presentes nas amostras da solução estoque da fração solúvel. Essas análises foram conduzidas pelo grupo coordenado pelo Prof. Dr. Rafael Lourenço, do IOUSP, colaborador no presente trabalho. A extração dos compostos a partir da FSA foi realizada de acordo com protocolo descrito na Norma ABNT/NBR 15.469. Cerca de 500 mL do total preparado foi dividido em duas subamostras de 100 mL (réplicas) para as análises de hidrocarbonetos. Para a obtenção dos extratos orgânicos referentes a HPA nas frações aquosas FSA, foi empregado o método EPA3510C. Foram determinados os compostos totais de hidrocarbonetos aromáticos e

alifáticos por meio de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) e com detector de ionização de chama (GC-FID). O procedimento analítico está descrito em detalhes em Martins et al (2011).

2.3 Testes de ecotoxicidade

Foram realizados testes de toxicidade aguda (medindo sobrevivência) com *Artemia salina* e teste de toxicidade crônica de curta duração analisando desenvolvimento embrionário com o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. As propriedades físico-químicas (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade) das soluções teste e dos controles foram medidas no início e no final de todos os experimentos.

2.3.1 Teste de toxicidade crônica - Desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*)

Neste ensaio foram avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* após exposição às diferentes concentrações de FSA. Os testes foram realizados segundo metodologia descrita por NBR/ABNT 15.350 (2006). Para tal, indivíduos adultos foram coletados em costões rochosos e foram induzidos a liberar seus gametas através da injeção de 2,5 mL de KCl (0,5M) em sua região peri-oral. Os óvulos foram examinados quanto a sua morfologia, em estereomicroscópio. Por sua vez, os espermatozoides foram ativados imediatamente antes do início da fecundação, por meio da adição de 0.5 ml de esperma em 24,5 mL de água do mar filtrada.

Para o processo de fertilização, foram acrescentados aproximadamente 2 mL da solução de esperma ao béquer contendo os óvulos. Três sub-amostras foram retiradas para contagem dos ovos, identificados pela presença da membrana de fecundação à sua volta (para continuidade do teste deve-se obter um mínimo de 80% de ovos fecundados). Foram colocados aproximadamente 500 ovos em cada réplica contendo os tratamentos das FSA e nos respectivos controles. Os ovos então recém-fecundados foram introduzidos nos tubos de ensaio e após 36-42 horas (tempo necessário para a formação da larva equinoplúteo, o teste foi finalizado com a adição de 0,5 mL de formol 10% tamponado com bórax em cada réplica. Posteriormente, foi realizada a contagem das 100 primeiras larvas encontradas em cada réplica, utilizando-se de

microscópio óptico (aumento de 100x) para observar o desenvolvimento embrionário normal em relação ao controle.

2.3.2 Teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Os crustáceos do gênero *Artemia*, Ordem Anostraca, são organismos filtradores e cosmopolitas, estando amplamente presentes nos ambientes aquáticos, e consequentemente podendo estar expostos aos poluentes presentes na coluna d'água. Por seu hábito alimentar, atuam como elo trófico entre as comunidades fitoplanctônicas e os níveis tróficos superiores. Sua utilização em experimentos laboratoriais se dá pela alta sensibilidade, baixo custo e facilidade de cultivo (Ferreira et al, 2000). Além disso, caracteriza-se por ser um excelente bioindicador, proporcionando respostas robustas perante pequenas variações na qualidade do ambiente. Por esse motivo, são utilizadas para a avaliação de risco ecotoxicológico (Meyer et al, 1982). A utilização destes organismos tem também o intuito de reduzir a geração de resíduos produzidos durante o estudo (Blaise, 1998).

Cistos de *Artemia* sp. têm sido obtidos junto ao comércio (criadores nacionais, no RN), sendo mantidos no laboratório e estando disponíveis para o uso. Para dar início aos testes foi necessária a indução da eclosão dos cistos. Para tal, os cistos foram imersos em água destilada por uma hora, descontaminados em solução de hipoclorito de sódio e água destilada por dois minutos, e posteriormente lavados em água corrente. Os cistos foram mantidos em água do mar filtrada com aeração salinidade a 35, temperatura 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 h/12 h (claro/escuro) por 48 horas, ou seja, até atingirem a fase ideal (Figura 2) para a execução dos testes (metanáuplio II). Em cada réplica, foram introduzidos dez náuplios, selecionados aleatoriamente, consistindo cada réplica em tubos de ensaio de 15 mL preenchidos com um volume de 10 mL de solução teste, e mantidos em condições controladas. As soluções que foram utilizadas para este ensaio referem-se às frações solúveis de amostras de óleos nas concentrações pré-estabelecidas.

Nos períodos de 24 e 48 horas de exposição, os organismos vivos e mortos foram observados e contados, utilizando como critério a ausência de movimento, de acordo com Veiga & Vital (2002).

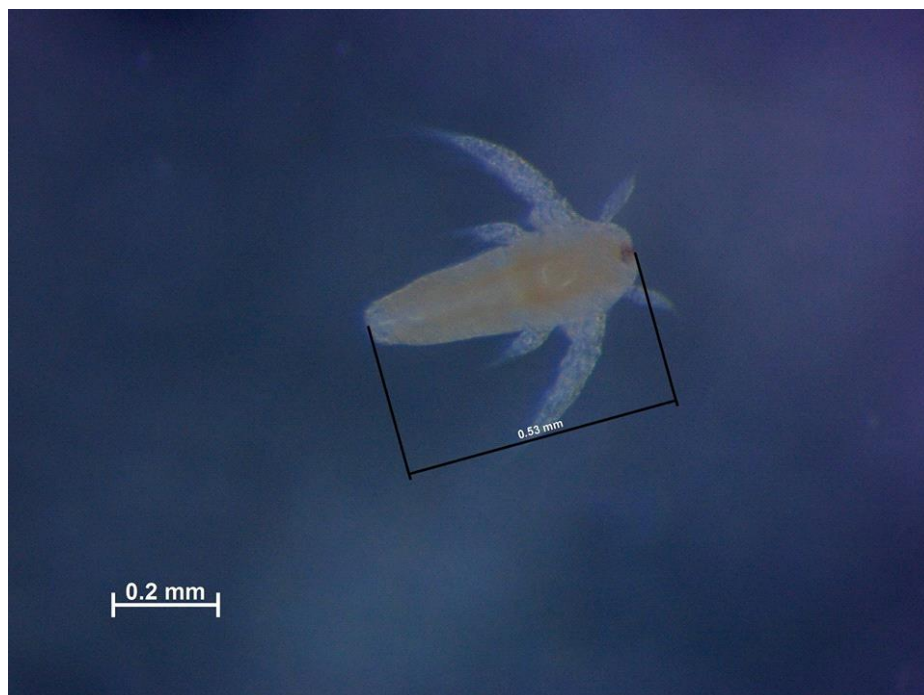


Figura 3. Náuplio de *Artemia* sp. na fase de uso para o teste de toxicidade, metanáuplio II.

2.4 Análises dos dados

Para os testes de ecotoxicidade, os experimentos foram executados em um desenho experimental de fator fixo, sendo cada uma das diluições (tratamento experimental) um nível. Os resultados de cada ensaio foram primeiramente verificados por teste F comparativo para homocedasticidade e Shapiro-Wilks para verificar a normalidade, em seguida estimada, diferenças significativas em comparação ao controle (água do mar limpa, diluição 0%) e testadas estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett o que permite encontrar a menor concentração de efeito observável (CEO) e a concentração de efeito não observável (CENO). Foram estimadas também a Concentração Efetiva a 50% dos organismos (CE50), como métrica de toxicidade. Neste caso, os dados de cada tratamento foram transformados para a escala logarítmica e modelo de regressão não-linear foi empregado para observação da relação entre as variáveis (diluição vs. efeito). As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 5. Para que por meio da estimativa de concentrações tóxicas pudéssemos observar relações entre as concentrações totais de hidrocarbonetos (alifáticos e policíclicos aromáticos) e os efeitos tóxicos medidos (% de anormalidades no desenvolvimento larval e % que causa mortalidade em *Artemia salina*).

3. Resultados

3.1 Análises químicas

Quanto às análises de hidrocarbonetos, todas as amostras apresentaram quantidades mensuráveis de hidrocarbonetos alifáticos (HA) variando entre valores de 3,31 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 17,85 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os valores identificados para cada amostra diferiram entre si para os mesmos compostos. Em questão de valores totais a amostra 3 apresenta a maior quantidade com 54,21 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em sequência a amostra 2 com 11,95 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e por fim a amostra 1 com 7,19 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Alguns grupos de HA apresentaram concentrações quantificáveis apenas para a amostra 3 como é o caso da n-C19, nC24, nC25, n-C28 e n-C30, já o nC23 somente para a amostra 2, enquanto os do grupo n-C23 e n-C29 estavam presentes em todas as amostras. E apenas a amostra 1 não obteve quantidades de HA isoladamente detectáveis em comparação com as outras. Os dados completos específicos de cada HA identificado e quantificado estão descritos na **Tabela 2**:

Tabela 2. Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (HA) quantificado para todas as frações solúveis em água (FSA) das três amostras de petróleo analisadas. (<DL = concentrações abaixo do limite de detecção).

Concentração: $\mu\text{g L}^{-1}$	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
n-C10	<DL	<DL	<DL
n-C11	<DL	<DL	<DL
n-C12	<DL	<DL	<DL
n-C13	<DL	3,43	<DL
n-C14	<DL	<DL	<DL
n-C15	<DL	<DL	<DL
n-C16	<DL	<DL	<DL
n-C17	<DL	<DL	<DL
Pristane	<DL	<DL	<DL
n-C18	<DL	<DL	<DL
Phytane	<DL	<DL	<DL
n-C19	<DL	<DL	4,93
n-C20	<DL	<DL	<DL
n-C21	<DL	<DL	<DL
n-C22	<DL	<DL	<DL
n-C23	3,31	3,67	7,02
n-C24	<DL	<DL	5,90
n-C25	<DL	<DL	8,35
n-C26	<DL	<DL	<DL
n-C27	<DL	<DL	<DL
n-C28	<DL	<DL	5,79
n-C29	4,58	4,86	4,37
n-C30	<DL	<DL	17,85
n-C31	<DL	<DL	<DL
n-C32	<DL	<DL	<DL
n-C33	<DL	<DL	<DL
n-C34	<DL	<DL	<DL
n-C35	<DL	<DL	<DL
n-C36	<DL	<DL	<DL
n-C37	<DL	<DL	<DL
ΣAHs	7,89	11,95	54,21
Limite de Detecção(DL) : $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			

Foi também quantificada a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas amostras avaliadas, cada um dos principais HPA conhecidos na literatura foram descritos com a devida quantidade encontrada e representados na **Tabela 3**. Em relação à quantidade total de HPA, a amostra 3 foi a que apresentou valores superiores em comparação às outras duas, sendo seguida em ordem decrescente pela amostra 1 e 2. Já quando referente aos tipos de HPA presentes em cada amostra, os mesmos foram o que apresentaram maior quantidade em todas as amostras sendo estes respectivamente o C2-Pireno-Fluoranteno, C2-Criseno e C1-Pireno-Fluoranteno. Apesar das diferenças em quantidade, as proporções dos hidrocarbonetos são similares, ou seja, poucos tipos de HPA se encontravam ausentes em uma amostra e presentes em outras quando relativo aos HPA de alto peso molecular. Já para os de baixo peso molecular na amostra 3 foram obtidos alguns tipos, enquanto nas outras os mesmos não foram identificados.

Tabela 3. Concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) quantificado nas frações solúveis em água (FSA) das três amostras de petróleo analisadas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (<DL = concentrações abaixo do limite de detecção).

Baixo peso molecular	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Naftaleno	0,02	<DL	<DL
2-Metil-naftaleno	0,03	<DL	0,02
1-Metil-naftaleno	0,02	<DL	0,03
C2-Naftaleno	<DL	<DL	0,26
C3-Naftaleno	<DL	<DL	0,59
C4-Naftaleno	<DL	<DL	0,91
Acenaftileno	0,07	0,04	0,24
Acenafteno	<DL	<DL	<DL
Fluoreno	<DL	<DL	0,06
C1-Fluoreno	<DL	<DL	0,35
C2-Fluoreno	<DL	<DL	1,03
C3-Fluoreno	<DL	<DL	3,24
Dibenzotiofeno	0,03	0,01	0,15
C1-Dibenzotiofeno	0,10	<DL	0,27
C2-Dibenzotiofeno	0,54	<DL	0,80
C3-Dibenzotiofeno	0,10	0,06	4,93
Fenantreno	0,03	<DL	0,25
C1-Fenantreno-Antraceno	0,24	0,08	1,18
C2-Fenantreno-Antraceno	0,66	0,24	3,84
C3-Fenanthrene-Antraceno	1,39	0,85	7,66
C4-Fenantreno-Antraceno	2,65	1,71	13,48
Antraceno	0,05	0,03	0,25
Fluoranteno	0,08	0,05	0,31
Total	6,01	3,07	39,85

Alto peso molecular	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Pireno	2,12	1,07	11,19
C1-Pireno-Fluoranteno	6,72	3,18	29,53
C2-Pireno-Fluoranteno	20,20	8,38	86,83
Benz[a]antraceno	1,10	0,52	5,80
Criseno	0,38	0,34	2,71
C1-Criseno	2,40	1,49	13,81
C2-Criseno	9,92	5,33	49,50
Benzo[b]fluoranteno	0,83	0,47	5,32
Benzo[k]fluoranteno	0,29	0,18	1,08
Benzo[e]pireno	2,10	1,32	10,86
Benzo[a]pireno	2,16	0,91	9,73
Perileno	0,58	0,22	2,65
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,32	0,14	1,43
Dibenz[a,h]antraceno	0,64	0,28	2,67
Benzo[ghi]perileno	1,36	0,84	6,23
Total	51,12	24,67	239,34
Σ EPA Prioritários-HPA	9,45	4,88	47,28
Σ HPA	57,12	27,75	279,19
Limite de Detecção (DL): 0,005 µg L ⁻¹			

3.2 Testes de ecotoxicidade

Echinometra lucunter

Para os embriões de *E. lucunter* expostos às diferentes concentrações encontradas na **Tabela 1**, após 36 horas, foram observadas diferenças estatísticas significativas na taxa de desenvolvimento dos indivíduos em comparação ao controle (Figura 4).

Quanto à menor concentração com efeito observável (CEO), para as amostras 1 e 3 foi a concentração de 100%, enquanto para a amostra 2 a CEO foi de 50%. Já o resultado avaliando a concentração inibitória em 50% dos organismos (CI50) para as amostras 1 estão na **Tabela 4**; não foi possível calcular a CI50 para a amostra 2 e 3. Também foi calculada a concentração inibitória para 10% dos organismos, e os valores 1,787% e 20,14% foram encontrados para as amostras 1 e 3. Os parâmetros físico-químicos estão apresentados nos anexos 5, 6 e 7.

Tabela 4. Dados estatísticos de concentrações inibitória para 10% e 50% dos organismos (C.L10 e C.L50) com seus respectivos intervalos de confiança (I.C.) e concentração de efeito observável e não observável (CEO e CENO) para o desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* nas diferentes diluições de FSA realizadas com as amostras 1, 2 e 3. (nd = não determinável)

Amostra	CL10 (I.C. %)	CL50 (I.C.) %	CENO	CEO
Amostra 1	1,787 (0.5502 - 5.802)	15,94 (3,84 - 66,11)	10%	100%
Amostra 2	nd	nd	10%	50%
Amostra 3	20,14 (7.246 - 56.01)	nd	50%	100%

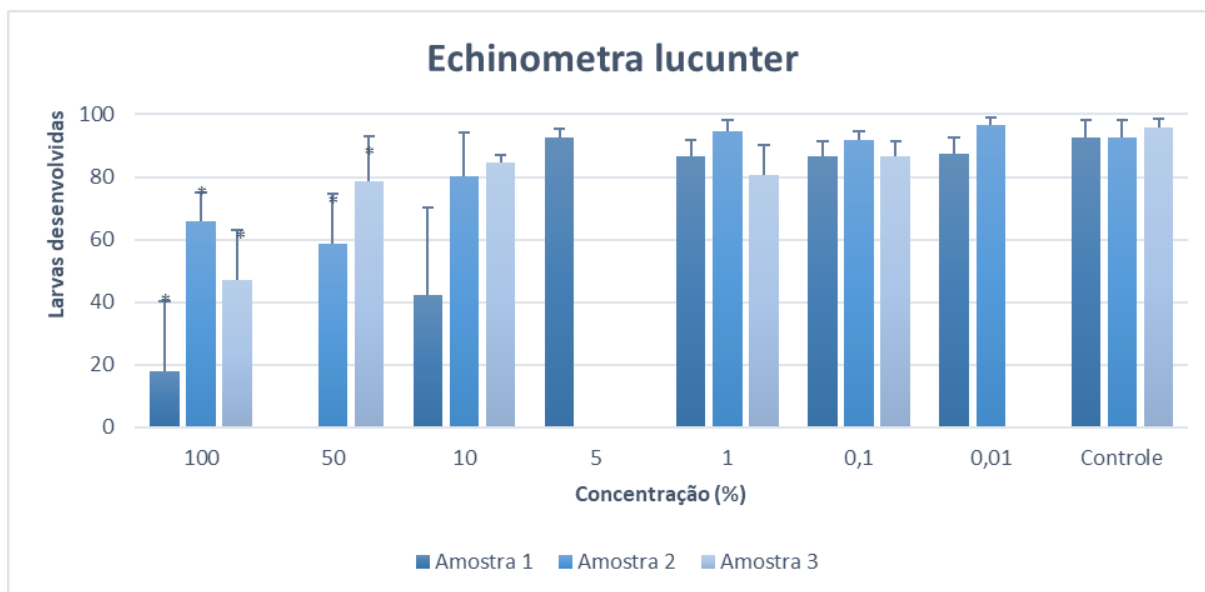


Figura 4. Desenvolvimento embrionário do ouriço *Echinometra lucunter* nas diferentes diluições de FSA. Asterisco (*) significa diferença significativa com o controle ($p < 0.05$).

Artemia salina

Os resultados dos testes da fração solúvel da amostra 1 preliminares e com o intuito de analisar o padrão de toxicidade das amostras de óleo coletadas nas praias do nordeste estão logo em sequência. As análises estatísticas dos dados apresentaram homocedasticidade e normalidade. Os parâmetros físico-químicos (salinidade, oxigênio dissolvido e pH) foram coletados e estavam dentro dos padrões estabelecidos pela norma ABNT/NBR 16.530 de 09/2021.

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa entre as mortalidades no controle e as concentrações de FSA abaixo de 1% de diluição. Após 24 horas de exposição, houve mortalidade significativa na diluição de 10% e, após 48 horas de exposição, houve toxicidade nas concentrações de 5 e 10% (Figura 5). Os valores da concentração letal para 10% dos organismos se encontram na **Tabela 5**.

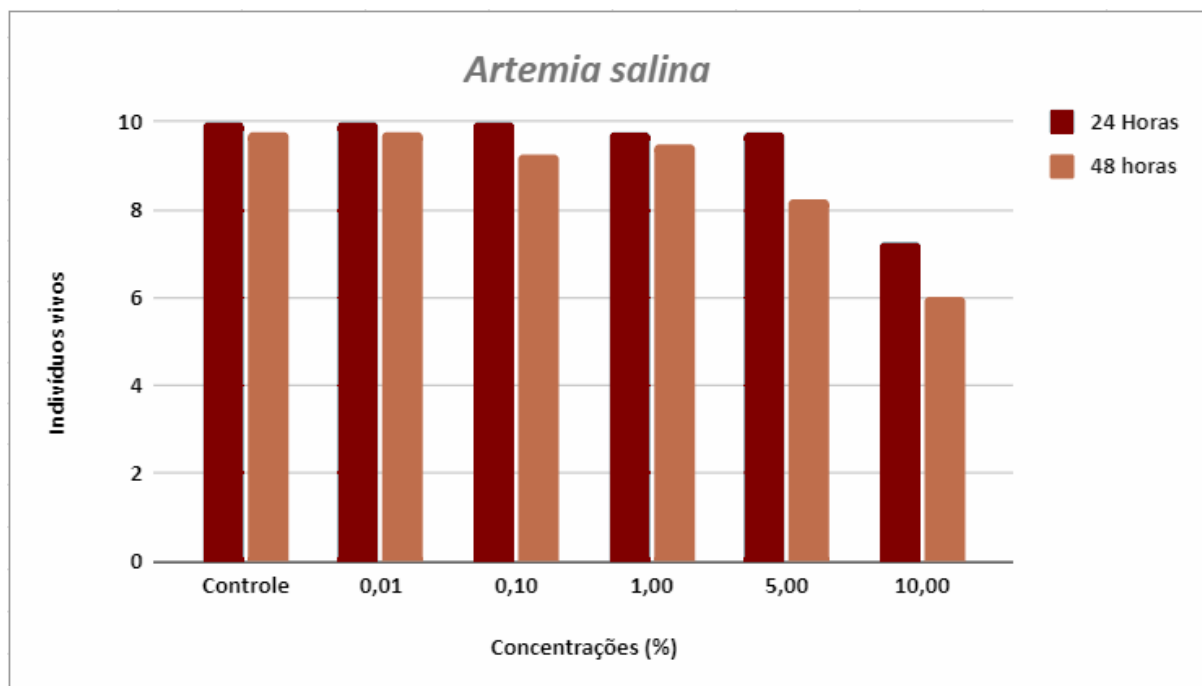


Figura 5. Taxa de sobreviventes de *Artemia salina* nas diferentes diluições de FSA realizadas com a amostra 1 em 24 e 48 horas. Asterisco (*) indica diferença significativa com o controle dentro do mesmo tempo de exposição ($p < 0.05$).

Tabela 5. Concentrações letais em 10% dos organismos e concentrações de efeito observável e não observável nos diferentes períodos de exposição, obtidas no teste de toxicidade com náuplios de *Artemia* sp exposta a fração solúvel de óleo encontrado na Bahia. (nd= não determinável)

Tempo de exposição	CL10 (C.I.)	CENO	CEO
24 hs	nd	5%	10%
48 hs	2,155 (0.09833 - 47.22)	1%	5%

4. Discussão e Conclusões:

A composição das frações solúveis foi predominantemente de hidrocarbonetos de alto peso molecular, que em geral possuem baixa solubilidade e alta hidrofobicidade. Por isso, é pressuposto que haverá maior concentração de hidrocarbonetos de baixo peso molecular nas frações solúveis. Contudo, o petróleo bruto e óleos mais pesados, já tem maior concentração de HPA de alto peso molecular, liberado-os nas frações solúveis geradas por esses mesmos compostos. Quando comparada com a quantidade total presente na fração solúvel, outros trabalhos obtiveram uma quantidade maior de hidrocarbonetos totais de baixo peso molecular, como naquelas em que a extração foi feita com óleos que passaram por um processo de destilação diferente, como é o caso do diesel marítimo (Santana et al, 2021). Assim também foi achado em trabalhos que buscaram avaliar diferentes tipos de petróleo e seus derivados bem como sua composição como da gasolina (Saeed e Al-Mutairi, 1998) e óleo cru Kuwait, ou outros que puderam quantificar os hidrocarbonetos identificando as suas diferenças quanto à composição, tendo maior presença de compostos de baixo peso molecular (Saeedu e Al-Mutairi, 2000; Richika et al, 2022; Zanardi-Lamardo, et al; Magalhães et al, 2022)

Um trabalho avaliou a presença de hidrocarbonetos em amostras de água de praias nordestinas afetadas pelo óleo derramado em 2019 (Campelo et al, 2021). Nesse estudo, conduzido na região de Tamandaré-PE, em outubro de 2019, foram verificadas gotículas de óleo, com volume médio individual de $315,55 \mu\text{m}^3$, sendo que nas áreas estuarinas houve a maior quantidade, com valores médios que alcançaram 97.30 ± 84.70 gotículas por metro cúbico. Esses valores são equiparáveis aos encontrados nas amostras avaliadas no presente trabalho. Lima et al (2021), por sua vez, realizaram coleta de amostras de água em uma área recifal com presença de placas de óleo em uma praia de difícil acesso, onde possivelmente o material ficou por um maior período até ser retirado. Cinco dos HPA mais presentes foram o Naftaleno (4,9 mg/L) 2 Metilnaftaleno (9,7 mg/L), fenantreno (300 mg/L), fluoreno (6,8 mg/L) e Pireno (10,9 mg/L). Estes estudos corroboram com os dados encontrados no presente estudo, com valores muito maiores no que diz respeito à presença de HPAs solúveis a partir do óleo que atingiu o NE das três amostras avaliadas, que apresentaram toxicidade para os organismos demonstrando o seu potencial tóxico para os organismos marinhos que habitam as regiões atingidas pelo acidente.

Contudo, sabe-se que com a dinâmica marinha as frações de óleo podem se dissipar mais ou menos rápido. Segundo Vitorio et al (2022) as quantidades de hidrocarbonetos dissolvidos não diminuíram um ano após o ocorrido, a partir do estudo feito com amostras

coletadas no Rio Formoso, também no município de Tamandaré-PE. Estas quantidades são compatíveis com as concentrações testadas no presente estudo, estando na faixa em que se observou toxicidade para náuplios de *A. salina* e embriões de *E. lucunter*. Como estes estudos indicam a presença do óleo em longo prazo, há evidências de que mesmo após meses da remoção do material, os níveis de hidrocarbonetos na água podem ser suficientes para causar toxicidade nos organismos avaliados.

A resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005 estabelece valores limites para a qualidade de águas salinas, para algumas substâncias tóxicas, como o benzo(a)pireno e outros HPA, estabelecendo valores máximos de $0,018 \mu\text{gL}^{-1}$ para águas de classe 1 onde ocorra pesca e aquicultura. Nas amostras de FSA houve níveis acima desses limites legais para a maioria dos hidrocarbonetos quantificados, inclusive para o benzo(a)pireno, principalmente na amostra 3. Alguns estudos também propõe valores de linha de base para águas costeiras tropicais e não tropicais estabelecendo quantidades que estão de $0,06 \mu\text{gL}^{-1}$ (Zanardi-Lamardo e Schettini, 2022) para o primeiro e entre $10 \mu\text{gL}^{-1}$ e $500 \mu\text{gL}^{-1}$ no segundo (Hook et al, 2020). Assim, tanto os dados do presente estudo quanto aqueles da literatura indicam que o óleo foi capaz de causar contaminação da água por hidrocarbonetos solubilizados, em concentrações que ultrapassaram os limites legais. Além disso, as amostras de FSA analisadas causaram efeito significativo aos organismos-teste, desde a concentração de 50%.

A diversidade de condições e o tipo de óleo além da composição irá refletir na natureza e no comportamento da frações aquosas, mesmo as amostras tendo demonstrado, através dos marcadores de petróleo, que possuem a mesma fonte de origem, as condições a que eles foram expostas variam de um lugar para o outro. As amostras 1 e 2 se encontravam com mais sedimento agregado e menos viscosidade, enquanto a amostra 3 tinha maior viscosidade e menor presença de sedimento, o que pode gerar uma variação na quantidade dos hidrocarbonetos liberados nas frações aquosas. Neste estudo a amostra 3 apresentou tanto a maior quantidade de HPA quanto de HA em comparação com as outras amostras avaliadas.

Outra implicação da presença do óleo, decorre do fato dele ficar preso no sedimento, podendo ser ressuspensionado e formar frações dissolvidas. Na última vistoria realizada pelo IBAMA, em março de 2020, muitas praias ainda apresentavam manchas de óleo vestigiais. A retirada destes materiais era em locais de difícil acesso, o que impedia sua retirada completa. Sendo o óleo um material resistente, do qual 1 litro pode se espalhar por 10000 m em questão de horas, e uma parte desse óleo na forma dissolvida e suscetível ao intemperismo pode apresentar risco para os organismos expostos. (Huetteli et al, 2022)

No caso do presente estudo, as amostras apresentaram toxicidade sobre o desenvolvimento larval de *E. lucunter*, sendo que a amostra 1 apresentou maior toxicidade enquanto a terceira amostra demonstrou menor potencial tóxico para *E. lucunter*. As três amostras de fração solúvel também apresentaram valores relativamente diferentes no total de hidrocarbonetos poliaromáticos (THP) e no total de Hidrocarbonetos alifáticos (TA) sendo a terceira amostra a apresentar maiores quantidades em relação a todas. *Artemia salina* apresentou sensibilidade ao óleo (amostra 1) em menores concentrações em comparação aos embriões de ouriço-do-mar, demonstrando maior sensibilidade pelos parâmetros de análise de variância aqui realizados. Apesar disso, a toxicidade para *Artemia salina* não mostrou valores absolutos expressivos de mortalidade, ou seja, mesmo apresentando diferença significativa com o controle, a sobrevivência não foi menor que 50% dos indivíduos expostos.

Alguns trabalhos como o de Andrade et al (2022) avaliaram a sobrevivência de copepoditos de *Tisbe biminiensis* em 9 pontos amostrais em praias pernambucanas. As amostras incluíam águas intersticiais e de águas superficiais durante os períodos de mar/21 e out/21 sendo a primeira apresentando pontos com maior redução da sobrevivência dos organismos em relação à segunda. Estes resultados demonstram a sensibilidade dos organismos ao óleo presente nas águas em que ocorreu o derramamento e corroboram com os dados encontrados no presente estudo que apresentaram toxicidade para o crustáceo *Artemia salina*.

Entre os efeitos que os componentes do óleo podem causar aos invertebrados marinhos, como os crustáceos, e que geram a sua mortalidade, podemos citar a ingestão e/ou adsorção dos hidrocarbonetos e acumulação em seus tecidos. Por sua vez, a bioacumulação de hidrocarbonetos em crustáceos, como os copépodos, também pode gerar a contaminação de larvas de peixes que se alimentam destes organismos. Zhang et al (2022) avaliaram as concentrações de HPAs em organismos de uma região estuarina de aquicultura, obtendo concentrações entre 68,43 a 536,20 ng g⁻¹ em pepinos do mar. Em crustáceos, as concentrações totais de HPAs variaram de 358,95 a 396,46 ng/g. Entre as substâncias mais encontradas estavam o fenantreno e o naftaleno, a primeira tendo uma das maiores proporções encontradas nas três amostras avaliadas no presente trabalho. Essas substâncias podem se acumular em organismos ao longo da cadeia trófica, assim como causar efeitos tóxicos na biota, como observado em *Artemia salina* e embriões de *Echinometra lucunter*.

As múltiplas substâncias que compõem o petróleo e seus derivados torna complexa a compreensão sobre os mecanismos de ação que geram a toxicidade do petróleo. Alguns estudos, como os descritos na **Tabela 6**, buscaram avaliar algumas substâncias presentes no petróleo, de modo isolado, para entender como se dão tais efeitos. Um dos compostos com maior presença

nas amostras avaliadas neste estudo foi o Fenantreno, este pode afetar o crescimento, as taxas de gordura corporal e causar atraso na muda em larvas de invertebrados com concentração letal de 1,21 mg L⁻¹ e alta taxa de absorção, às vezes 100% para os *Chironomus sancticaroli* (Richardi et al, 2018) avaliados no experimento. Concentrações mais altas foram encontradas na amostra 3 para Fenantreno-Antraceno na solução inicial.

Tabela 6. Estudos sobre toxicidade de frações solúveis de petróleo ou seus derivados, utilizando organismos marinhos.

Organismo	Autor, ano	CL50/CENO-CEO	Tipo de óleo	Tempo de exposição (h)	Endpoint
<i>Artemia franciscana</i>	Philibert et al., 2022	3.2 µmol/L	Fenantreno		Mortalidade
<i>Gadus morhua</i> (peixe)	Aranguren-Abadía et al., 2022	4,02 e 4,15 µg/L Σ PAH (CL10)	Petróleo bruto		Mortalidade
<i>Artemia salina</i>	Qin et al., 2022	0,974 mg/L	Fenantreno		Mortalidade
<i>Tigriopus japonicus</i>	Qin et al., 2022	2,126 mg/L	Fenantreno		Fertilização
<i>Litonapeus Vannamei</i>	Qin et al., 2022	0,265 mg/L	Fenantreno		Mortalidade
<i>Acartia Tonsa</i>	Hafez et al., 2022	74%,52%,40%	IFO100 - óleo pesado com óleo gasoso	48, 72, 96 h	Mortalidade
<i>Acartia tonsa</i>	Hafez et al., 2022	100%, 74%, 52%	Óleo naftênico	48, 72, 96 h	Mortalidade
<i>Acartia tonsa</i>	Hafez et al., 2022	34%,10%,8%	MGO -óleo combustível	48, 72, 96 h	Mortalidade
<i>Artemia salina</i>	Este estudo	5%	Óleo intemperizado	48 h	Mortalidade
<i>Echinometra lucunter</i>	Este estudo	100%,10%,100%	Óleo intemperizado	36 h	Desenvolvimento

Os níveis de contaminação e toxicidade após um acidente podem reduzir ou não, sendo específicos em cada caso. Acidentes amplamente estudados, como é o caso da DeepWater Horizon, mostram uma recuperação da abundância da macrofauna bentônica (Carassou et al, 2015) ao longo do tempo. O mesmo pôde ser observado no caso do Hebel Spirit, onde a concentração de HPA diminuiu drasticamente após um mês do acidente na Coreia do Sul (Yin

et al, 2017). Contudo, foram observados no Golfo do México aumento dos encalhes de tartarugas, diminuição da abundância de larvas de peixes pelágicos, e aumento no surgimento de lesões cutâneas em peixes demersais (Hook et al, 2020). No caso do acidente com o Exxon Valdez, esperava-se uma melhor recuperação da abundância de organismos (Peterson et al, 2003). Devido à longa exposição dos organismos ao óleo sequestrado do sedimento os efeitos tóxicos foram mais persistentes. Já para o caso do navio Prestige os compostos de alto peso molecular persistiram por mais de dois anos afetando a saúde de mexilhões que foram expostos.(Hook et al, 2020) Os fenômenos envolvendo a toxicidade das frações solúveis de óleo em água do mar aos organismos marinhos expostos envolvem uma complexa dinâmica à qual estudos como este auxiliam a entender como os organismos marinhos se comportam quando expostos a diferentes tipos de óleo, ajudando a compreender melhor os efeitos causados pelos derramamentos.

Com isso, podemos afirmar que as amostras de petróleo coletadas nas praias nordestinas apresentavam quantidades mensuráveis de HPA, predominantemente de alto peso molecular, principalmente C2-Pireno-Fluoranteno, C2-Criseno e C1-Pireno-Fluoranteno. Sendo assim, registrou-se a presença de compostos reconhecidamente tóxicos associados ao óleo que chegou à costa. As frações solúveis em água, obtidas a partir de fragmentos do óleo, apresentaram toxicidade para os organismos expostos. Para a amostra a qual foi exposta, *Artemia salina* apresentou toxicidade em menores concentrações em comparação com *Echinometra lucunter*, cuja sensibilidade foi menor quando exposto a amostra 1, tendo diferenças entre as amostras a qual não foi possível comparar através da IC50, tendo efeitos majoritariamente observados em altas concentrações (50% e 100%), o que condiz com outros exemplos reportados na literatura, onde após derramamentos de óleo foram observados efeitos deletérios diversos em invertebrados marinhos. Estas diferenças entre as amostras poderiam ser justificadas tanto pela presença de materiais não avaliados no presente estudo quanto por diferenças no estado de intemperismo, nesse sentido, mais estudos precisam ser realizados para averiguar estas questões. Portanto, conclui-se que o óleo que atingiu as praias brasileiras no ano de 2019 apresentava condições para contaminar a coluna d'água, pela solubilização de hidrocarbonetos, e afeta negativamente as populações de invertebrados marinhos após a exposição às frações solúveis deste óleo.

5. Referências

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 16530. *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Artemia sp (Crustacea, Brachiopoda)*.09/2021.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15350. *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*. p. 2-17. 201
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15469:2007. Preservação e preparo de amostras. 2007.
- AMARAL, A.C.Z.; JABLONSKI, S. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1), Julho 2005
- ANDRADE, N.V.M. Ecotoxicidade de áreas recifais impactadas por petróleo em pernambuco (NE Brasil) Utilizando o *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpaticóida). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE. 2022.
- ARANGUREN-ABADÍA, L.; YASETIE, F.; DONALD, C.E.; SØRHUS, E.; MYKLATUN, L.E.; ZHANG, X.; LIE, K.K.; PERRICHON, P.; NAKKEN, C.L.; DURIF, C.; SHEMA, S.; BROWMAN, H.I.; SKIFTESVIK, A.B.; GOKØYR, A.; MEIER, S.; KARLSEN, O.A. Photo-enhanced toxicity of crude oil on early developmental stages of Atlantic cod. *Science of the Total Environment*, 807, 150697. 2022.
- BAKER, J.M. Causes and classification of oil spills. In: Cairns Jr, J. (org). *Ecoaccidents. Proceedings of a NATO Advanced Research Workshop on Ecoaccidents*. September 19-25, 1983. Nordwijkerhout, the Netherland. Plenum Press, New York, USA. p. 100-116. 1985 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-9450-5_7
- BLAISE, C. Microbiotesting: an expanding field in aquatic toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1-2), 115-119. 1998.
- BRASIL, República Federativa. Lei Federal Nº 9.966, de 28 de abril de 2000. Dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2000. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9966.htm
- BRASIL. Resolução CONAMA Nº 398/2008 - Dispõe sobre o conteúdo mínimo do Plano de Emergência Individual para incidentes de poluição por óleo em águas sob jurisdição nacional, originados em portos organizados, instalações portuárias, terminais, dutos, sondas terrestres, plataformas e suas instalações de apoio, refinarias, estaleiros, marinas, clubes náuticos e instalações similares, e orienta a sua elaboração. *Diário Oficial da União*, 111 (12/06/2008), p.101-104. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre>.

- BRASIL, República Federativa. Decreto Nº 4.871, de 6 de Novembro de 2003. Dispõe sobre a instituição dos Planos de Áreas para o combate à poluição por óleo em águas sob jurisdição nacional e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2003. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/D4871.htm
- BRASIL, República Federativa. Decreto Nº 8.127, de 22 de outubro de 2013. Institui o Plano Nacional de Contingência para Incidentes de Poluição por Óleo em Águas sob Jurisdição Nacional, altera o Decreto nº 4.871, de 6 de novembro de 2003, e o Decreto nº 4.136, de 20 de fevereiro de 2002, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2013. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2013/Decreto/D8127.htm#art30
- CARLS, M.G.; MEADOR, J.P. A perspective on the toxicity of petrogenic PAHs to developing fish embryos related to environmental chemistry. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 15(6), 1084-1098. <https://doi.org/10.1080/10807030903304708>. 2009
- CAMPELO, R.P.S.; LIMA, C.D.M.; SANTANA, C.V.; SILVA, A.J.; NEUMANN-LEITÃO, S.; FERREIRA, B.P.; SOARES, M.O.; JUNIOR, M.M; MELO, P.A.M.C. Oil spills: The invisible impact on the base of tropical marine food webs. *Marine Pollution Bulletin*, 167, 112281. 2021.
- CARASSOU, L.; HERNANDEZ, F.J.; GRAHAM, W.M. Change and recovery of coastal mesozooplankton community structure during the Deepwater horizon oil spill. *Environmental Research Letters*, 9(12), 124003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/12/124003>. 2015.
- DISNER, G.R.; TORRES, M. The environmental impacts of 2019 oil spill on the brazilian cost: Overview. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental Sustentável*, 7(15), 241-255. 2020.
- EUZEBIO R. C.; RANGEL G. S.; MARQUES R. C. Derramamento de petróleo e seus impactos no ambiente e na saúde humana. *RBCIAMB*. n.52. jun 2019. 79-98 - ISSN 2176-9478
- FERREIRA, C.M.; RINCON, V.J.; AUREA, E. Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach. *Química Nova*, 23(1). 2000.
- FIORAVANTI, C. Os caminhos da mancha. Pesquisa FAPESP. Available from: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2019/12/03/os-caminhos-da-mancha/>>. Accessed on: Mar. 10, 2020. 2019.
- GESAMP - IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. *Reports and Studies GESAMP*, n.50, 180p.
- HAFEZ, T.; BILBAO, D.; ETXEBARRIA, N.; DURAN, R.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M. Application of a biological multilevel response approach in the copepod *Acartia tonsa* for toxicity testing of three oil water accommodated fractions. *Marine Environmental Research*, 169, 105378. 2021.
- HAN, J.; KIM, H.-S.; KIM, I.-C.; KIM, S.; HWANG, U.-K.; LEE, J.-S. Effects of water accommodated fractions (WAF) of crude oil in two congeneric copepods *Tigriopus sp.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 511-517. 2017.
- HYLLAND, K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(1-2), 109–123. 2006.

- HÖFER, T. Tankships in the marine environment. *Environmental Science & Pollution Research*, 5(2), 97-104. 1998.
- HOOK, S.E. Beyond Thresholds: A Holistic Approach to Impact Assessment Is Needed to Enable Accurate Predictions of Environmental Risk from Oil Spills. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(6), 813-830. 2020.
- HUIJER, K. *Trends in oil spills from tanker ships*, 1995–2004. London, 2005.
- HUETTEL, M. Oil pollution of beaches. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 36, 100803, 2022.
- IBAMA. Portal - Mancha no Litoral. 2019b. Available from: <<https://brasil.gov.br/manchanolitoral/>>. Accessed on: Dec. 15, 2019.
- IBAMA. Cartilha informativa sobre a trajetória do acidente/Desmobilização. 2019c. Available from: <<http://www.ibama.gov.br/manchasdeoleo-desmobilizacao>>. Accessed on: Dec. 15, 2019.
- IBAMA. Manchas de óleo no litoral. (<https://www.ibama.gov.br/manchasdeoleo?fbclid=IwAR3p6mNQmnlGvJ8ujb9g2yJdRyWZthHXumCYdQK4ZRfuBk-dQ5Vd8Z2TwZk> acesso: 01.04.2020). 2020.
- IMO/UNEP. *IMO/UNEP Guidance Manual on the Assessment and Restoration of Environmental Damage following Marine Oil Spills*. 2009 Edition. London, UK, 104p. 2009.
- INCARDONA, J.P.; COLLIER, T.K.; SCHOLZ, N.L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2), 191–205. 2004.
- IPIECA/IOGP. *Impacts of oil spills on marine ecology: Good practice guidelines for incident management and emergency response personnel*. International Association of Oil & Gas Producers. IOGP Report 525. London, UK. 56p. 2015.
- ISLAM, Md. S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 624-649. 2004.
- JEE, J.-H.; KANG, J.-C. Effect of phenanthrene on haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 35(14), 1310–1317. 2004.
- LEE, R.F.; WONG, C.S.; CRETNEY, W.J.; WHITNEY, F.A. PARSONS, T.R.; LALLI, C.M.; WU, J. Microbial response to crude oil and Corexit 9527: Seafluxes enclosure study. *Microbial Ecology*, 11, 337-351. 1985.
- LEE, K.; SHIM, W.J.; YIM, U.H.; KANG, J. Acute and chronic toxicity study of the water accommodated fraction (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of crude oil and dispersant in the rock pool copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere*, 92, 1161–1168. 2013.
- LIMA, M.O.; BIANCHINI, A.; CARVALHO, P.S.M.; INOJOSA, F.C.P. Desastres Ambientais no Brasil: Mineração, Óleo, Queimadas/Mesa-redonda. Ecotox 2021.
- LIU, Y.; KUJAWINSKI, E.B. Chemical Composition and Potential Environmental Impacts of Water-Soluble Polar Crude Oil Components Inferred from ESI FT-ICR MS. *PLOS One*, 10(9), e0136376. doi:10.1371/journal.pone.0136376. 2015.

- LOURENÇO, R.A.; TANIGUCHI, S.; SILVA, J.; GALLOTTA, F. D.C.; BÍCEGO, M.C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine mammals: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 171, 112699, 2021.
- MAGALHAES K.M., CARREIRA R.S., FILHO J. S. R., ROCHA P.A., SANTANA F.M., YOGUI G.T.. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. *Marine Pollution Bulletin* 175 (2022) 113334
- MAGRIS, R.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 153, 110961, 2020.
- MARTINS, C.C.; BÍCEGO, M.C.; MAHIQUES, M.M.; FIGUEIRA, R.C.L.; TESSLER, M.G.; MONTONE, R.C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): Sources and depositional history. *Marine Pollution Bulletin*, 63, 452-458. 2011.
- MEYER, B.N., et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45.05., 31-33. 1982.
- MIRANDA, R.J.; PINTO, T.K.D.; LOPES, R.V.R.; SANTOS, J.W.; SAMPAIO, C.L.S.; CARDOSO, A.T.C.; MALHADO, A.C.M.; LADLE, R.J. Oil Spill Disaster in Southwest Atlantic Coast: an Evaluation of Short-Term Effects on Coral Reef Benthic Assemblages. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94 (Supl. 2). 2022.
- NASRI SISSINI, M.; BERCHEZ, F.; HALL-SPENCER, J.; GHILARDI-LOPES, N.; CARVALHO, V.F.; SCHUBERT, N.; HORTA, P.A. Brazil oil spill response: Protect rhodolith beds. *Science*, 367(6474), 156–156. 2020.
- NRC - National Research Council. *Oil in the Sea: inputs, fates, and effects*. Washington: National Academy Press, 1985.
- NRC - National Research Council. *Oil in the Sea III: inputs, fates, and effects*. Washington: National Academy Press, 2003.
- NEWMAN, M.C.; UNGER, M.A. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Second Edition. Boca Raton, USA, Lewis Publishers. 2002.
- NORDTUG, T.; OLSEN, A.J.; ALTIN, D.; MEIER, S.; OVERREIN, I.; HANSEN, B.H.; JOHANSEN, Ø. Method for generating parameterized ecotoxicity data of dispersed oil for use in environmental modelling. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 2106–2113. 2011.
- NUNES, J.M.C.; MATOS M.R.B. *Litoral norte da Bahia: caracterização ambiental, biodiversidade e conservação*, Salvador, BA, EDUFBA, 455 p. 2017.
- OLIVEIRA, M.; REDIEL, S. P.; ROMERO, F. A.; ABESSA, D. M. S. Problemas associados ao diagnóstico dos recursos biológicos na elaboração de cartas de sensibilidade ambiental ao óleo no Brasil. *Brazilian Applied Science Review*, 6(2), 465-486. 2022.
- PARVIAINEN, T.; GOERLANDT, F.; HELLE, F.; HAAPASAARI, P. KUIKKA, S. Implementing Bayesian networks for ISO 31000:2018-based maritime oil spill risk management: State-of-art, implementation benefits and challenges, and future research directions. *Journal of Environmental Management*, 278. 111520. 2021.
- PAUL, J.H.; HOLLANDER, D.; COBLE, P.G.; DALY, K.; MURASKO, S.; ENGLISH, D.; BASSO, J.; DELANEY, J.; McDANIEL, L.; KOVACH, C.W. Toxicity and mutagenicity of Gulf of Mexico waters during and after the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental Science & Technology*, 47(17), 9651-9659. 2013.

- PENA, P.G.L.; NORTHCROSS, A.L.; LIMA, M.A.G.; RÊGO, R.C.F. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. *Cadernos de Saúde Pública*, 36(2)e00231019. 2020.
- PETERSON, C.H.; RICE, S.D.; SHORT, J.W.; ESLER, D.; BODKIN, J.L.; BALLACHEY, B.E.; IRONS, D.B. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302, 2082–2086. 2003.
- POFFO, I.R.F.; XAVIER, J.C.D.M.; SERPA, R.R. A história dos 27 anos de vazamento de óleo no litoral norte do estado de São Paulo (1974-2000). *Revista Meio Ambiente Industrial*, 30, 98-104. 2001.
- PREUSS, R.; ANGERER, J.; DREXLER, H. Naphthalene--an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health*, 76(8), 556-76. 2003
- QIN L.; PENG LI; GAO C.; FU P.; WANG D.; WANG J. Development of seawater quality criteria for phenanthrene based on toxicity data of native species in the Bohai Sea. *Marine Pollution Bulletin* 183. 114045. 2022.
- RAMSEUR, J.L. *Deepwater Horizon Oil Spill: The Fate of the Oil*. Congressional Research Service, 2010. Disponível em: <http://www.fas.org/sgp/crs/misc/R41531.pdf>. Acesso em 28 jun. 2012.
- RICHARDI, V.S.; VICENTINI, M.; MORAIS, G.S; REBECHI, D.; DA SILVA, T.A.; FÁVARO, I.F.; NAVARRO-SILVA, M.A. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae). *Environmental Pollution*, 242, 277-287. 2018
- RISHIKA V, LAKSHMIPATHI M.T.; SAMPATH KUMAR B. Analysis of water soluble fractions of crude oil by gas chromatography: Mass spectroscopy. *The Pharma Innovation Journal*. SP-11(4): 1119-1122 . 2022.
- SAEED T. e AL-MUTAIRI M. Chemical compositions of the water soluble fraction of the leaded gasolines in seawater. *Environment International*, Vol. 25, No. 1, pp. 117-129. 1999.
- SAEEDU T. e AL-MUTAIRI M. Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble-fractions on different kuwaiti crude oils. *Advances in Environmental Research* 4 (2000) 141-145
- SHIU, Y.L.; HSIEH, S.L.; GUEI, W.C.; TSAI, Y.T.; CHIU, C.H.; LIU, C.H. Using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet 466 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Hamilton). *Aquaculture Research*, 46(6), 1403-1416. 2015.
- SHEN, H.T.; YAPA, P.D. Oil slick transport in Rivers. *J. Hydraul*, [Reston], Eng., 114(5): 529-543. 1988.
- SILVA, A.C.C.F.Y. Dano por derramamento de óleo no mar: responsabilidade e reparação. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PROCAM). São Paulo, SP . 2019.
- SOARES, M.O.; TEIXEIRA, C.E.P.; BEZERRA, L.E.A.; PAIVA, S.V.; TAVARES, T.C. L.; GARCIA, T.M.; ARAÚJO, J.T.; CAMPOS, C.C.; FERREIRA, S.M.C.; MATTHEWS-CASCON, H.; FROTA, A.; MONT'ALVERNE, T.C.F.; SILVA, S.T.; RABELO, E.F.; BARROSO, C.X.; FREITAS, J.E.P.; MELO JÚNIOR, M.; CAMPELO, R.P.S.; SANTANA, C.S.; CARNEIRO, P.B.M.; MEIRELLES, A.J.; SANTOS, B.A.;

- OLIVEIRA, A.H.B.; HORTA, P.; CAVALCANTE, R.M. Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. *Marine Policy*, 115, 2020.
- SORHUS, E.; DONALD, C. E.; SILVA, D.; THORSEN, A.; KARLSEN, O.; MEIER, S.; Untangling mechanisms of crude oil toxicity: Linking gene expression, morphology and PAHs at two developmental stages in a cold-waterfish. *Science of the Total Environment*, 757, 143896. 2021.
- UNCTAD - United Nations Conference on Trade and Development. Review of Maritime Transport. *United Nations Publications*. New York, USA. 102p. 2018.
- USEPA. *Evaluation of dredged material proposed for discharge in waters of the U.S.-Testing Manual*. EPA-823-B-98-004, Washington, DC. 1998.
- USEPA. *Understanding oil spills and oil spill response*. United States Environmental Protection Agency, 1999.
- VEIGA, L.F.; VITAL, N. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.* In: I.A. Nascimento, E.C.P.M., Sousa & M. Nipper (ed.), *Métodos em ecotoxicologia marinha*. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122. 2002
- VITÓRIO E.L.R.; ROJÁS L.A.V. ; ZANARDI-LAMARDO E. Hidrocarbonetos de petróleo dissolvidos e/ou dispersos nas águas da região de Tamandaré-PE. *Tropical Oceanography*, Recife, v. 49, n. ESPECIAL, p. 28-31, 2022.
- XIE, H., GUETZLOFF, T.F.; RICE, J.A. Fractionation of pesticide residues bound to humin. *Soil Sciences*, 162: 421–429. 1997.
- WEELINK, S.A.B., VAN EEKERT, M.H.A., STAMS, A.J.M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(4), 359–385. 2010.
- ZANARDI-LAMARDO E.; SCHETTINI C. A. F; VIEIRA-CAMPOS A. A. Intratidal variability and transport of petroleum aromatic hydrocarbons in an anthropized tropical estuarine system: the Suape estuary (8.4S 35W). *Brazilian journal of oceanography*, 66(1):47-57;2018
- ZHANG, J.; ZHANG, X ; HU, T.; XU, X., ZHAO, D.; WANG, X.; LI, L; YUAN, X., SONG, C. ZHAO, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and antibiotics in oil-contaminated aquaculture areas: Bioaccumulation, influencing factors, and human health risks. *J ournal of Hazardous Materials*, 437, 129365. 2022.

ANEXOS

Anexo 1. Lei federal nº 5.357/1967



Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos

[LEI Nº 5.357, DE 17 DE NOVEMBRO DE 1967.](#)

[Revogada pela Lei nº 9.966, de 2000](#)

Estabelece penalidades para embarcações e terminais marítimos ou fluviais que lançarem detritos ou óleo em águas brasileiras, e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, faço saber que o CONGRESSO NACIONAL decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art. 1º As embarcações ou terminais marítimos ou fluviais de qualquer natureza, estrangeiros ou nacionais, que lançarem detritos ou óleo nas águas que se encontrem dentro, de uma faixa de 6 (seis) milhas marítimas do litoral brasileiro, ou nos rios, lagoas e outros tratos de água ficarão sujeitos às seguintes penalidades:

a) as embarcações, à multa de 2% (dois por cento) do maior salário-mínimo vigente no território nacional, por tonelada de arqueação ou fração;

b) os terminais marítimos ou fluviais, à multa de 200 (duzentos) vêzes o maior salário-mínimo vigente no território nacional.

Parágrafo único. Em caso de reincidência a multa será aplicada em dobro.

Art. 2º A fiscalização desta Lei fica a cargo da Diretoria de Portos e Costas do Ministério da Marinha, em estreita cooperação com os diversos órgãos federais ou estaduais interessados.

Art. 3º A aplicação da penalidade prevista no art. 1º e a contabilidade da receita dela decorrente far-se-ão de acordo com o estabelecido no Regulamento para as Capitânicas de Portos.

Art. 4º A receita proveniente da aplicação desta Lei será vinculada ao Fundo Naval, para cumprimento dos programas e manutenção dos serviços necessários à fiscalização da observância desta Lei.

Art. 5º Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 6º Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, 17 de novembro de 1967; 146º da independência e 79º da República.

A. COSTA E SILVA
José Moreira Maia

Este texto não substitui o publicado no DOU de 20.11.1967

Anexo 2. Lei federal nº 9.966/2000

Capítulo III

do transporte de óleo e substâncias nocivas ou perigosas

Art. 10. As plataformas e os navios com arqueação bruta superior a cinquenta que transportem óleo, ou o utilizem para sua movimentação ou operação, portarão a bordo, obrigatoriamente, um livro de registro de óleo, aprovado nos termos da Marpol 73/78, que poderá ser requisitado pela autoridade marítima, pelo órgão ambiental competente e pelo órgão regulador da indústria do petróleo, e no qual serão feitas anotações relativas a todas as movimentações de óleo, lastro e misturas oleosas, inclusive as entregas efetuadas às instalações de recebimento e tratamento de resíduos.

Art. 11. Todo navio que transportar substância nociva ou perigosa a granel deverá ter a bordo um livro de registro de carga, nos termos da Marpol 73/78, que poderá ser requisitado pela autoridade marítima, pelo órgão ambiental competente e pelo órgão regulador da indústria do petróleo, e no qual serão feitas anotações relativas às seguintes operações:

I – carregamento;

II – descarregamento;

III – transferências de carga, resíduos ou misturas para tanques de resíduos;

IV – limpeza dos tanques de carga;

V – transferências provenientes de tanques de resíduos;

VI – lastreamento de tanques de carga;

VII – transferências de águas de lastro sujo para o meio aquático;

VIII – descargas nas águas, em geral.

Art. 12. Todo navio que transportar substância nociva ou perigosa de forma fracionada, conforme estabelecido no Anexo III da Marpol 73/78, deverá possuir e manter a bordo documento que a especifique e forneça sua localização no navio, devendo o agente ou responsável conservar cópia do documento até que a substância seja desembarcada.

§ 1º As embalagens das substâncias nocivas ou perigosas devem conter a respectiva identificação e advertência quanto aos riscos, utilizando a simbologia prevista na legislação e normas nacionais e internacionais em vigor.

§ 2º As embalagens contendo substâncias nocivas ou perigosas devem ser devidamente estivadas e amarradas, além de posicionadas de acordo com critérios de compatibilidade com outras cargas existentes a bordo, atendidos os requisitos de segurança do navio e de seus tripulantes, de forma a evitar acidentes.

Anexo 3. Decreto nº60/95

DECRETO LEGISLATIVO Nº 60, DE 1995

Aprova o texto da Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios de 1973, de seu Protocolo de 1978, de suas Emendas de 1984 e de seus Anexos Opcionais III, IV e V.

O Congresso Nacional decreta:

Art. 1º. São aprovados os textos da Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios de 1973, de seu Protocolo de 1978, de suas Emendas de 1984 e de seus Anexos Opcionais III, IV e V.

Parágrafo único. São sujeitos à apreciação do Congresso Nacional quaisquer atos que impliquem revisão dos referidos compromissos internacionais, bem como quaisquer ajustes complementares que, nos termos do art. 49, I, da Constituição Federal, acarretem encargos ou compromissos gravosos ao patrimônio nacional.

Art. 2º. Este Decreto Legislativo entra em vigor na data de sua publicação.

Senado Federal, em 19 de abril de 1995

Senador JOSÉ SARNEY
Presidente do Senado Federal

Anexo 4. Decreto nº 2.508/98

DECRETO Nº 2.508, DE 4 DE MARÇO DE 1998

Promulga o Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição Causada por Navios, concluída em Londres, em 2 de novembro de 1973, seu Protocolo, concluído em Londres, em 17 de fevereiro de 1978, suas Emendas de 1984 e seus Anexos Opcionais III, IV e V.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 84, inciso VIII, da Constituição Federal,

Considerando que a Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição Causada por Navios foi concluída em Londres, em 2 de novembro de 1973, e seu Protocolo foi concluído em Londres, em 17 de fevereiro de 1978;

Considerando que o Congresso Nacional aprovou os atos multilaterais em epígrafe, suas Emendas de 1984 e seus Anexos Opcionais III, IV e V, por meio do Decreto Legislativo nº 60, de 19 de abril de 1995;

Considerando que o Governo brasileiro depositou o instrumento de ratificação da Convenção, de seu Protocolo, de suas Emendas e de seus Anexos Opcionais em 4 de janeiro de 1996, passando os mesmos a vigorar para o Brasil em 4 de abril de 1996;

DECRETA:

Art. 1º. A Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição Causada por Navios, concluída em Londres, em 2 de novembro de 1973, o seu Protocolo, concluído em Londres, em 17 de fevereiro de 1978, suas Emendas de 1984 e seus Anexos Opcionais III, IV e V serão executados e cumpridos tão inteiramente como neles se contém.

Art. 2º. Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Anexo 5. Parâmetros físico químicos do teste de desenvolvimento embrio larval de *Echinometralucunter* com a amostra 1.

Diluição (%)	Salinidade		pH		OD (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
100	35	36	8,07	8,10	5,08	4,40
50	35	37	8,09	8,09	4,79	4,99
10	35	38	7,82	7,99	5,22	5,52
1	35	36	8,02	8,14	4,49	4,92
0,10	35	35	7,78	8,01	5,21	5,31
0,01	35	35	7,75	8,00	6,11	4,93
Controle	35	35	8,09	8,31	5,10	4,90

Anexo 6. Parâmetros físico químicos do teste de desenvolvimento embrio larval de *Echinometralucunter* com a amostra 2.

Diluição (%)	Salinidade		pH		OD (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
100	35	40	7,84	8,00	5,48	5,80
50	35	37	7,85	7,94	5,42	5,45
10	35	35	7,89	7,92	5,69	5,49
1	35	34	7,92	7,87	4,97	5,46
0,10	35	35	7,93	7,44	5,38	6,42
Controle	30	33	7,86	7,86	5,11	5,59

Anexo 7. Parâmetros físico químicos do teste de desenvolvimento embrio larval de *Echinometralucunter* com a amostra 3.

Diluição (%)	Salinidade		pH		OD (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
100	35	37	8,34	7,90	5,67	4,81
50	35	37	8,06	8,12	5,62	5,12
10	35	37	8,15	8,24	5,80	4,64
1	35	37	7,86	8,26	5,90	5,01
0,01	35	37	8,15	8,30	5,98	5,26
Controle	35	37	8,11	8,17	6,54	6,81

Anexo 8. Parâmetros físico químicos do teste de agudo com *Artemia salina* com a amostra 1 diluída em 10 vezes (14-16/06/2021)

Diluição (%)	Salinidade		pH		OD (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
100	20	20	7,62	7,11	7,82	7,10
50	25	30	7,76	7,15	7,43	7,15
10	35	35	7,68	7,68	7,13	7,23
1	35	36	7,54	7,54	6,87	7,64
0,10	35	35	7,45	7,45	8,04	7,56
Controle	35	37	7,18	7,18	7,18	6,85

