



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista



**Avaliação da toxicidade de Agentes Extintores de Incêndios em
misturas com Gasolina: contribuição para o estudo do incêndio no
Terminal Petroquímico da Ultracargo (Santos, SP, Brasil)**

GABRIELA DANIEL

São Vicente – SP
2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE AQUÁTICA

Avaliação da toxicidade de Agentes Extintores de Incêndios em
misturas com gasolina: contribuição para o estudo do incêndio no
Terminal Petroquímico da Ultracargo (Santos, SP, Brasil)

Gabriela Daniel

Orientador: Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho" Campus do Litoral Paulista, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Biodiversidade Aquática, pelo Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Aquática.

**São Vicente – SP
2018**

574.5222 Daniel, Gabriela

D221

Avaliação da toxicidade de Agentes Extintores de Incêndios em misturas com Gasolina: contribuição para o estudo do incêndio no Terminal Petroquímico da Ultracargo (Santos, SP, Brasil) / Gabriela Daniel. - São Vicente, 2018.
81 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.
Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Ecotoxicologia. 2. Impacto ambiental. 3. Compostos perfluorados. 4. Agentes extintores de incêndio. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP
Campus do Litoral Paulista

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da Toxicidade de Agentes Extintores de Incêndios em misturas com gasolina: contribuição para o estudo do incêndio no Terminal Petroquímico da Ultracargo (Santos, SP, Brasil)

AUTORA: GABRIELA DANIEL

ORIENTADOR: DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

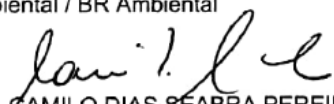
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE AQUÁTICA, área: BIODIVERSIDADE pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



DR. BAUER RODARTE DE FIGUEREDO RACHID
BR Ambiental / BR Ambiental



Prof. Dr. CAMILO DIAS-SEABRA PEREIRA
Departamento de Ciências do Mar - Campus Baixada Santista / UNIFESP

São Vicente, 20 de fevereiro de 2018

*“O homem é parte da natureza, e sua guerra
contra a natureza é inevitavelmente uma
guerra contra si mesmo.”*

Rachel Carson

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram das experiências e aprendizados vividos durante esses dois anos.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o carinho, apoio, por compreenderem meus momentos de ausência e sempre acreditarem em mim. A minha sobrinha Helena, você se tornou a luz dos meus dias!

Da mesma forma agradeço meus amigos, aos antigos e aos que fiz durante o mestrado, pela paciência, companheirismo em todos os momentos, sou muito grata por ter vocês em minha vida!!!

Ao Prof. Dr. Denis Abessa pela orientação e as valiosas contribuições para esse estudo, agradeço muito pela confiança e oportunidade.

Aos funcionários e professores da UNESP/CLP pela competência e auxílio em diversos momentos.

A família NEPEA por toda ajuda em laboratório, pelas diversas conversas produtivas, além de todos os momentos de descontração, sempre muito valiosos e energizantes.

Aos queridos da equipe do laboratório de ecotoxicologia (Lecotox) da Universidade Santa Cecília, pela parceria, prestatividade de sempre e diversas contribuições.

Aos colegas do laboratório LETAL da Universidade de Aveiro, pela receptividade e por toda ajuda com as misturas. E a Profª. Dra. Susana Loureiro, pela supervisão do estágio, por ceder o espaço e pelos conhecimentos repassados para a realização dessa pesquisa.

Ao IBAMA e ao Corpo de Bombeiros do Estado de São Paulo pelo fornecimento das amostras e informações a respeito do incêndio.

A FAPESP pelo financiamento da pesquisa no país (processo nº 2016/04768-9) e no exterior – BEPE (processo nº 2017/04461-2).

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIACÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AEI – Agentes Extintores de Incêndios

AFFF – *Aqueous Film-Forming Foam* (Espuma formadora de filme aquoso)

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

CA - Concentração de Adição

CE₅₀– Concentração que causou efeito em 50% dos organismos

CENO - Concentrações de Efeito Não Observado

CEO - Concentrações de Efeito Observado

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CI₅₀ - Concentração que causou inibição em 50% dos organismos

CL₅₀ – Concentração que causou 50% de letalidade aos organismos

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DL - *Dose Level-dependent* (Dependente da Dose)

DR - *Dose Ratio* (Dependente do Químico)

EFSA – European Food Safety Authority

FIG - Fração Insolúvel da Gasolina

FSG – Fração Solúvel da Gasolina

HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IA - Ação Independente

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IT - Isolantes Térmicos

LGE – Líquido Gerador de Espuma

MoA - Modo de Ação

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*

PFCA - Ácidos Carboxílicos Perfluorados

PFC - Compostos Perfluorados

PFOA- Ácido Perfluorooctanóico

PFOS - Ácido Perfluorooctano Sulfônico

PFSA - Ácido Sulfônico Perfluorado

SES - Sistema Estuarino de Santos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Liberação dos gametas dos indivíduos adultos de <i>Echinometra lucunter</i> ; (A) macho e (B) Fêmea.....	19
Figura 2 -	Larva de <i>Echinometra lucunter</i> em estágio pluteus. (Foto: Valéria Prósperi; Maria Milena de Araújo).....	21
Figura 3 -	(A) Eclosão de cistos de <i>Artemia</i> sp. e (B) Náuplio após 48h de eclosão.....	22
Figura 4 -	(A) Indivíduo adulto de <i>Daphnia similis</i> . Foto: Daniel Domingues/Eduardo Bertoletti; (B) Cultivo em condições controladas de <i>Daphnia similis</i>	24
Figura 5 -	Combate ao Incêndio ocorrido no Terminal Petroquímico da Ultracargo em 2015, liberação de grande volume de LGE - AFFF e Isolantes Térmicos, Santos –SP. Foto: Diego Lameiro/ Corpo de Bombeiros da PMESP.....	28
Figura 6 -	Taxa média do desenvolvimento embrio-larval (%) e os respectivos desvios padrões de <i>Echinometra lucunter</i> exposto a Fração Solúvel da Gasolina após 42h.....	29
Figura 7 -	Taxa média de sobrevivência (%) e os respectivos desvios padrões de <i>Artemia</i> sp. exposta a Fração Solúvel da Gasolina após 48h.....	30
Figura 8 -	Taxa média de organismos móveis (%) e os respectivos desvios padrões de <i>Daphnia similis</i> exposta a Fração Solúvel da Gasolina após 48h.....	33
Figura 9 -	Desenho Experimental dos testes com misturas de <i>D. similis</i> com as concentrações das soluções testes (%) dos compostos; (A) Cold Fire com Fração Solúvel da Gasolina (FSG); (B) Ageofoam com FSG; (C) Kidde Sintex 1% com FSG.....	39
Figura 10 -	Desenho Experimental dos testes com misturas de <i>Artemia</i> sp. com as concentrações das soluções testes (%) dos compostos; (A) Cold Fire com Fração Solúvel da Gasolina (FSG); (B) Ageofoam com FSG; (C) Kidde Sintex 1% com FSG.....	39
Figura 11 -	Representação gráfica (2D) da exposição de <i>Daphnia similis</i> ao Cold Fire e a FSG em mistura binária, mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B) e seus desvios.....	43

Figura 12 -	Representação gráfica (2D) da exposição de <i>Daphnia similis</i> ao Ageofoam e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B).....	44
Figura 13 -	Representação gráfica (2D) da exposição de <i>Daphnia similis</i> ao Kidde Sintex 1% e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e seus desvios; e Ação Independente - IA (B).....	45
Figura 14 -	Representação gráfica (2D) da exposição de <i>Artemia</i> sp. ao Cold Fire e a FSG em mistura binária, mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B) e seus desvios.....	46
Figura 15 -	Representação gráfica (2D) da exposição de <i>Artemia</i> sp. ao Ageofoam e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B).....	48
Figura 16 -	Representação gráfica (2D) da exposição de <i>Artemia</i> sp. ao Kidde Sintex 1% e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e seus desvios; e Ação Independente - IA (B).....	49
Figura 17 -	Localização da região de Santos - São Vicente e o Sistema Estuarino. Fonte: Google maps.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo das condições do sistema-teste utilizado para <i>Echinometra lucunter</i>	20
Tabela 2 -	Resumo das condições do sistema-teste utilizado para <i>Artemia</i> sp.....	23
Tabela 3 -	Descrição do sistema-teste utilizado para <i>Daphnia similis</i>	25
Tabela 4 -	Concentrações de inibição a 50% dos embriões de <i>Echinometra lucunter</i> (CI _{50-42h}) e Concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) dos Agentes Extintores de Incêndios.....	26
Tabela 5 -	Concentrações Letais a 50% de <i>Artemia</i> sp. após 48h de exposição (CL _{50-48h}) e Concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) dos Agentes Extintores de Incêndios.....	27
Tabela 6 -	Concentrações de imobilidade a 50% de <i>D. similis</i> (CE _{50-48h}), Concentrações de Efeito não Observável (CENO) e Concentrações de Efeito Observável (CEO), dos Agentes Extintores de Incêndios.....	28
Tabela 7 -	Parâmetros de referência dos modelos CA e IA.....	41

RESUMO

Em episódios de emergências ambientais, principalmente em incêndios causados por compostos inflamáveis, a extinção do fogo utilizando apenas água apresenta limitações. Como alternativa, nos últimos anos surgiram Agentes Extintores de Incêndios - AEI. Em 2015 no município de Santos, um grave incêndio ocorreu em tanques de gasolina e etanol. Para a extinção do fogo, foram utilizadas grandes quantidade de AEI que juntamente com os combustíveis dos tanques escorreram para os ecossistemas aquáticos adjacentes. Apesar do amplo uso desses compostos, há falta de informação sobre a composição e toxicidade das formulações, de modo que os Compostos Perfluorados (PFC) são relatados como o princípio ativo dessas substâncias. Assim, o objetivo foi avaliar os efeitos tóxicos dos diferentes AEI utilizados no incêndio e a Fração Solúvel da Gasolina (FSG) em testes isolados e em misturas. Os testes isolados foram realizados com *Echinometra lucunter*, *Artemia* sp. e *Daphnia similis*. Os testes com misturas foram realizados com *Artemia* sp. e *D. similis* utilizando os modelos conceituais de Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA) com os desvios de Sinergismo, Antagonismo, DL (dependente da dose) e DR (dependente do químico). Para *E. lucunter* os resultados de CI_{50-42h} foram de 0,11% para FSG e estiveram entre 0,0002 a 0,01% para AEI; para *Artemia* sp. os valores de CL_{50-48h} foram de 0,11% para FSG e variaram entre 0,02 e 0,2% para AEI. Para *D. similis* as CE_{50-48h} foram de 1,10% para FSG e estiveram entre 0,03 a 0,3% para AEI. Para as misturas, todos os testes foram significativamente ajustados aos modelos de referência; em alguns casos apresentando desvios, indicando ações antagônicas ou sinérgicas. Para *Artemia* sp., foram identificados efeitos antagônicos e sinérgicos, dependendo das concentrações e das combinações dos químicos; para *D. similis* observou-se efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos, também considerando fatores de concentração e combinação de cada químico na mistura. Assim, o estudo forneceu informações sobre os efeitos desses compostos no ambiente, tanto isolados quanto em misturas binárias.

Palavras-chave: AFFF; Ecotoxicologia; Emergência Química; Impacto ambiental; LGE; Misturas.

ABSTRACT

In environmental emergencies, and special in those caused by flammable compounds, extinguishing fires by using only water has some limitations, requiring the use of Fire Suppression Agents (FSA). In 2015, a severe fire occurred in gasoline and ethanol tanks from a petrochemical plant located in the Santos city. To combat that fire, lots of FSA were diluted in estuarine and applied on the tanks resulting in an “effluent” containing fuels and FSAs. There is a lack of information about the toxicity of FSA’s commercial formulations, but the major active principles in these formulations are the Perfluorinated Compounds (PFCs). The aim of this study was evaluate the toxic effects of different FSAs and Gasoline Water Soluble Fraction (GWSF) in isolated and binary mixtures tests. The isolated analyses were performed with *Echinometra lucunter*, *Artemia* sp. and *Daphnia similis*. The mixture tests were performed with *Artemia* sp. and *D. similis*, using the conceptual models for CA and IA with deviations as synergism, antagonism, DL (*Dose Level-dependent*) and DR (*Dose Ratio*). The toxicity of isolated compounds to *E. lucunter* showed IC_{50-42h} was 0.11% for GWSF and values ranging from 0.0002 to 0.01% for FSA; to *Artemia* sp. LC_{50-48h} was 0.11% for GWSF and values ranging from 0.02 to 0.2% for FSA. To *D. similis* EC_{50-48h} was 1.10% for GWSF and ranged from 0.03 to 0.3% for FSA. For mixture responses, all tests were significantly adjusted to CA (Concentration Addition) and IA (Independent Action) models, and in some cases the results showed deviations, indicating antagonistic or synergistic interactions. For *Artemia* sp. antagonistic and synergistic effects occurred, depending on the concentrations and combinations of the chemicals. *D. similis* showed additive, antagonistic and synergistic effects, in this case was also considering concentration and combination of each chemical in the mixture. This study provided information on the effects of these compounds in the environment, in isolated forms or binary mixtures.

Keywords: AFFF; Chemical Emergency; Ecotoxicology; Environmental Impact; LGE; Mixtures.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
LISTA DE ABREVIACÕES.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	15
3. Capítulo I – Ensaios de Toxicidade com Substâncias Isoladas.....	16
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1.1. Substâncias Utilizadas.....	16
3.1.1.1. Agentes Extintores de Incêndios (AEI)	16
3.1.1.2. Fração Solúvel da Gasolina (FSG)	17
3.1.2. Ensaios de Toxicidade.....	18
3.1.2.1. <i>Echinometra lucunter</i>	18
3.1.2.2. <i>Artemia</i> sp.	21
3.1.2.3. <i>Daphnia similis</i>	23
3.1.3. Análise dos Resultados.....	25
3.2. RESULTADOS.....	25
3.2.1. Agentes Extintores de Incêndios.....	26
3.2.1.1. <i>Echinometra lucunter</i>	26
3.2.1.2. <i>Artemia</i> sp.	27
3.2.1.3. <i>Daphnia similis</i>	27
3.2.2. Fração Solúvel da Gasolina.....	28
3.2.2.1. <i>Echinometra lucunter</i>	28
3.2.2.2. <i>Artemia</i> sp.	29
3.2.2.3. <i>Daphnia similis</i>	29
3.3 DISCUSSÃO.....	30
3.4. CONCLUSÃO.....	37
4. Capítulo II – Ensaios de Toxicidade com Misturas Binárias.....	38
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1.1. Substâncias Utilizadas.....	38

4.1.1.1. Agentes Extintores de Incêndios (AEI)	38
4.1.1.2. Fração Solúvel da Gasolina (FSG)	38
4.1.2. Ensaios com misturas binárias.....	38
4.1.3. Análise dos Resultados.....	40
4.2. RESULTADOS.....	41
4.2.1. <i>Daphnia similis</i>	42
4.2.1.1. Cold Fire.....	42
4.2.1.2. Ageofoam.....	43
4.2.1.3. Kidde Sintex 1%.....	44
4.1.1. <i>Artemia</i> sp.	45
4.1.1.1. Cold Fire.....	45
4.1.1.1. Ageofoam.....	47
4.1.1.1. Kidde Sintex 1%.....	48
4.3. DISCUSSÃO.....	49
4.4. CONCLUSÃO.....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
Apêndice I – Parâmetros físico-químicos dos ensaios isolados com AEI e FSG para <i>Echinometra lucunter</i>	63
Apêndice II - Parâmetros físico-químicos dos ensaios isolados com AEI e FSG para <i>Artemia</i> sp.....	65
Apêndice III - Parâmetros físico-químicos dos ensaios isolados com AEI e FSG para <i>Daphnia similis</i>	67
Apêndice IV – Resultado dos ensaios com as substâncias de referência.....	69
Apêndice V – Parâmetros físico-químicos dos ensaios com misturas de AEI e FSG para <i>Artemia</i> sp.....	70
Apêndice VI - Parâmetros físico-químicos dos ensaios com misturas de AEI e FSG para <i>Daphnia similis</i>	73
Apêndice VII – Resultados dos ensaios de <i>Daphnia similis</i> com os modelos de referência CA e IA utilizando o MIXTOX.....	76
Apêndice VIII - Resultados dos ensaios de <i>Artemia</i> sp.com os modelos de referência CA e IA utilizando o MIXTOX.....	77

1. INTRODUÇÃO

A expansão e a diversificação das atividades industriais trouxeram inúmeros benefícios para o desenvolvimento tecnológico, econômico e social, determinando enormes mudanças na forma de produção e consumo mundial. No entanto, centrais de armazenamento de produtos químicos, instalações industriais e especialmente os setores petroquímicos contribuíram no aumento e na gravidade de episódios de acidentes ambientais, exibindo um número elevado de explosões e incêndios nas últimas décadas (CHANG; LIN, 2006).

Em episódios de emergências ambientais como incêndios de grandes proporções, o combate ao fogo utilizando apenas água não é recomendado; essa abordagem apresenta algumas limitações, como a dificuldade na penetração no material em combustão devido à sua tensão superficial. Além disso, em virtude da sua baixa viscosidade, a água pode escorrer rapidamente pela superfície e em casos de incêndios causados por líquidos inflamáveis, os jatos de água podem ocasionar o extravasamento do material em combustão, e com isso, alastrar ainda mais o incêndio (FIGUEREDO et al., 1999).

Com a evolução da tecnologia, nos últimos anos foram desenvolvidas alternativas a fim de aumentar a eficiência no combate a incêndios (SÄRDQVIST, 2002). Retardantes de chama à base de PBDE (éteres de difenilas polibromadas) e seus congêneres passaram a ser empregados de modo a prevenir incêndios (PESTANA et al., 2008). Além disso, ao tratar de incêndios de alta complexidade, principalmente os causados por substâncias inflamáveis e líquidos voláteis (Classe B), tem sido requerido o uso de Agentes Extintores de Incêndios (AEI) mais eficientes, como os Líquidos Geradores de Espumas (LGE) (BOURGEOIS et al., 2015), e mais recentemente os Isolantes Térmicos (IT).

Essas formulações comerciais tem sido utilizadas em escala mundial para o combate a incêndios em indústrias (KISH et al., 2008), aeroportos (AWAD et al., 2011), florestas (BOULTON et al., 2003), instalações militares (BACKE et al. 2013), áreas portuárias e tanques de armazenamento de combustíveis (MARTINS, 2015). Nesses casos, os AEI mais comumente utilizados são do tipo LGE - AFFF (*Aqueous Film Forming Foams*) que formam espumas com um fino filme aquoso, proporcionando um recobrimento contínuo e o resfriamento da superfície do material em combustão,

suprimindo e impedindo o reinício do fogo (FIGUEREDO et al., 1999); e os Isolantes Térmicos, que por sua vez possuem maior capacidade de resfriamento, pois penetram no material em combustão e possuem agentes encapsuladores de fogo que proporcionam uma diminuição de temperatura mais efetiva, dessa forma extinguindo e detendo o reinício das chamas. Além disso, esses compostos têm a capacidade de reduzir a densidade da fumaça gerada pelo incêndio (HTC, 2013; CFTB, 2017).

Apesar da ampla utilização dos LGE e IT, as informações a respeito da composição química desses compostos não são fornecidas pelas empresas que comercializam tais produtos. Sabe-se que essas formulações comerciais incluem um conjunto de substâncias químicas, como solventes, diferentes classes de surfactantes fluorados e compostos aditivos (MOODY;FIELD, 2000; PLACE;FIELD, 2012). Diversos estudos relatam que esses produtos baseiam-se especialmente em compostos perfluorados (PFC) (MOODY; FIELD, 2000; KISH et al., 2008; BADUEL et al., 2017). Essas são substâncias que possuem forte polaridade na ligação de carbono-flúor, favorecendo assim a estabilidade das moléculas químicas (KEY, 1997), de modo que essa propriedade química pode estar associada à longa vida dos PFC (BOUDREAU et al., 2003).

Dentre o grupo dos PFC, destacam-se os PFOS (ácido perfluorooctano sulfônico) e os PFOA (ácido perfluorooctanóico), os quais são as últimas formas de degradação dos PFC (MONTAGNOLLI, 2015). Esses compostos apresentam alta persistência nos ecossistemas, com ocorrência em diversos compartimentos ambientais, incluindo locais remotos (SUJA et al., 2009). Em adição aos relatos de sua presença no ambiente, diversos estudos reportaram o potencial tóxico desses químicos aos organismos aquáticos (HAN; FANG, 2010; HUANG et al., 2010), bem como a bioacumulação em diversos grupos de animais, como répteis (SOLLA et al., 2012), mamíferos (GIESY; KANNAN 2001; KANNAN et al., 2001), peixes (GIESY; KANNAN 2001; GULKOWSKA et al., 2006), aves (GIESY; KANNAN 2001), moluscos e crustáceos (GULKOWSKA et al., 2006). Pela ampla distribuição global desses produtos químicos, eles têm sido considerados substâncias de elevado interesse ecológico.

Outro importante contaminante dos ecossistemas aquáticos são os produtos derivados do petróleo, como petróleo bruto, diesel e a gasolina. Esses compostos são constituídos por misturas bastante complexas, cujas composições químicas podem variar em relação à natureza das substâncias, quantidade de cadeias de carbono e peso

molecular (PETERSON, 1994). A maior contribuição para o aparecimento dessas substâncias no ambiente ocorre por fontes antrópicas, principalmente, por meio de acidentes em estações de armazenamento, refinarias, oleodutos e no transporte; bem como por pequenos e constantes derramamentos urbanos e no abastecimento de embarcações (GUNSTER et al., 1993; CUTTER; JI 1997; KHAN; ABASSI 1999; CHANG; LIN 2006; SOARES-GOMES et al., 2010; CETESB, 2017).

A fração solúvel dos compostos derivados do petróleo desempenha um papel importante na contaminação ambiental, já que geralmente está associada às maiores causas de toxicidade aos organismos aquáticos (ANDERSON et al., 1974). Geralmente, é nessa porção que se encontram os hidrocarbonetos de menor peso molecular (PETERSON, 1994), além disso, esta fração pode espalhar-se por regiões não atingidas inicialmente pelos derramamentos e causar efeitos adversos tempos após a sua introdução no ambiente (NAVAS et. al., 2006).

Assim, incêndios causados por combustíveis podem ter uma enorme contribuição para a contaminação dos ecossistemas, e nesses casos, a situação pode ser agravada em decorrência da introdução do combustível simultaneamente com substâncias de combate a incêndios no ambiente. Foi esse o caso do acidente ocorrido em abril de 2015 no município de Santos litoral de São Paulo – Brasil, em que um incêndio de grandes proporções ocorreu no Terminal Petroquímico de armazenamento de combustíveis da empresa Ultracargo, pertencente ao Grupo Aratu/Tequimar. Esse episódio teve duração de nove dias, sendo considerado o maior acidente do gênero já registrado no país. Em consequência, para auxiliar na supressão do fogo e resfriamento dos cinco tanques de gasolina e um de etanol que se encontravam em chamas, às equipes responsáveis pelo controle da emergência utilizaram grandes quantidades de água do Sistema Estuarino de Santos (SES), juntamente com diferentes marcas de LGE - AFFF e IT (MARTINS, 2015).

Os resíduos provenientes dessa mistura, juntamente com os combustíveis dos tanques, escorreram e atingiram os ecossistemas aquáticos adjacentes, os quais incluem uma lagoa contígua ao terminal portuário e o SES, incluindo os manguezais (CETESB, 2016). Como consequência da liberação desses efluentes, ocorreu uma mortalidade massiva de cerca de oito toneladas de peixes, pertencentes a 142 espécies, incluindo algumas que até então não haviam sido descritas para a região, além também, da mortandade de diversos invertebrados (ROTUNDO et al., 2015; VICENTINI, 2015). A

saber, em decorrência disso, os órgãos competentes emitiram uma autuação para a empresa por danos ambientais (SAP, 2015).

Com o grande aporte de substâncias químicas presentes no ambiente, constantemente o destino final dos compostos são os corpos de água doce, oceanos ou águas subterrâneas (KISHI; ARAI, 2008). Neste cenário, com a preocupação da conservação dos ecossistemas, a partir da década de 1950 houve o desenvolvimento da ecotoxicologia, como subsídio para solucionar problemas ambientais relacionados com a poluição. Esta ciência permitiu avançar no conhecimento do efeito da interação das substâncias com os organismos, em diferentes níveis biológicos (RAND et al., 1995; SOUSA, 2002). Dessa forma, os ensaios ecotoxicológicos passaram a serem solicitados para avaliação da poluição na legislação brasileira pelas Resoluções CONAMA nº357/2005 (BRASIL, 2005) e nº430/2011 (BRASIL, 2011).

Dentro da Ecotoxicologia, uma abordagem importante que vem sendo utilizada diz respeito ao estudo da interação de misturas de substâncias químicas, de modo que quando diferentes compostos são liberados concomitantemente no ambiente, seus efeitos biológicos combinados podem ser variados. Sendo a exposição às misturas químicas uma realidade, essa consciência vem trazendo um crescente interesse por parte dos pesquisadores e dos órgãos reguladores em estudos sobre os potenciais riscos das exposições combinadas de substâncias nos últimos anos, de modo que devem ser reconhecidas como parte da avaliação do risco ambiental e da proteção a saúde pública (GROTON, 2000).

Com base nisso, para as abordagens com misturas surgiram modelos de predição do comportamento das substâncias químicas, com aporte em modelos matemático de Concentração de Adição (CA); esse modelo parte do princípio de que os químicos possuem o mesmo Modo de Ação (MoA), portanto, o mesmo local de ação no organismo (LOEWE; MUISCHNEK, 1926) e o modelo de Ação Independente (IA); que é baseado no conceito de que os químicos possuem diferentes MoA, ou seja, seus efeitos ocorrem em sítios de ação diferentes (BLISS, 1939). Ainda, as respostas para esses modelos podem ser de adição, onde o efeito combinado é igual à soma dos efeitos das substâncias isoladas; ou ainda, apresentarem desvios como Sinergismo onde o efeito observado é superior ao esperado; Antagonismo em que o efeito é inferior ao esperado; além disso, os efeitos podem ser dependentes da dose - DL (*Dose Level-dependent*) em que a toxicidade depende da dose dos compostos; ou ocorrer em razão das doses - DR

(*Dose Ratio*) em que a toxicidade depende da composição da mistura (JONKER et al., 2005).

O uso de modelos considerando as toxicidades de misturas binárias e/ou complexas proporciona um melhor entendimento das interações entre os compostos. Estudos abordando misturas de substâncias interagindo no ambiente são ainda incipientes, embora nos últimos anos tenha aumentado o número de trabalhos publicados abordando a interação de compostos como herbicidas (PEREZ et al., 2011), inseticidas (PAVLAKI et al., 2011), metais (FIGUEREDO et al. 2016), agentes antimicrobianos e fungicidas (SILVA et al., 2015).

Entretanto, estudos tratando sobre a toxicidade das misturas de compostos como a gasolina e Agentes Extintores de Incêndios são nulas. Em virtude disso, a avaliação da disposição in natura das formulações comerciais dos AEI e da gasolina e a interação desses compostos em misturas são relevantes, já que essas substâncias possuem potencial em causar impactos ambientais e de ocorrerem concomitantemente no ambiente. Nesse sentido, na tentativa de sanar a lacuna de informações a respeito dessas substâncias, o presente estudo foi realizado em dois capítulos: I. Ensaio de Toxicidade com Substâncias Isoladas e II. Ensaio de Toxicidade com Misturas Binárias.

2. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade de diferentes marcas de Líquidos Geradores de Espumas (LGE – AFFF) e Isolantes Térmicos (IT); além da Gasolina em sua fração solúvel (FSG), sobre invertebrados aquáticos, tanto em ensaios com as substâncias isoladas quanto em misturas binárias dos Agentes Extintores de Incêndios com a FSG.

3. Capítulo I – Ensaios de Toxicidade com Substâncias Isoladas

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados utilizando diferentes invertebrados aquáticos, os animais foram escolhidos como modelos experimentais por serem representantes dos ecossistemas em que há a ocorrência ou a possibilidade do aparecimento de substâncias químicas provenientes da utilização dos LGE e IT, bem como de hidrocarbonetos derivados do petróleo. Compreendendo dessa forma o ambiente marinho com embriões de ouriço do mar *Echinometra lucunter* e náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp.; e o ambiente dulcícola com neonatos do microcrustáceo *Daphnia similis*.

3.1.1. Substâncias Utilizadas

As soluções-teste foram preparadas pela diluição dos compostos comerciais em água do mar (sal. 35 ± 1) filtrada em membranas de poliéster de 0,45 μm para *E. lucunter* e *Artemia* sp. e água doce dura (meio ASTM) para *D. similis*.

Além disso, foram realizados ensaios de sensibilidade em paralelo aos testes, com as substâncias de referência Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) para *Artemia* sp., Sulfato de Zinco (ZnSO_4) para *E. lucunter* e Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) para *D. similis*.

3.1.1.1. Agentes Extintores de Incêndios (AEI)

Foram utilizadas amostras de Líquidos Geradores de Espumas - AFFF e de Isolantes Térmicos, em suas formulações comerciais empregados no combate ao incêndio do Terminal Petroquímico de armazenamento de combustíveis da empresa Ultracargo.

Para os ensaios com *E. lucunter* e *Artemia* sp. foram utilizadas as amostras fornecidas pelo IBAMA consistindo nos LGE - AFFF: Argus Prime 26E AFFF 1% HCTP1; Ageofoam 2133/NB; Kidde Sintex AFFF/ARG 1% x 3%; Kidde Sintex AFFF/ARC 3% x 6%; Liovac AFFF Hc/AR 3/3 AG e “Unknown” (amostra de marca desconhecida obtida junto às equipes de técnicos, durante os rescaldos do incêndio) e os isolantes térmicos Cold Fire Suppressant Agent e F500 Fire Suppression.

Nos ensaios com *D. similis* as formulações comerciais utilizadas foram os LGE - AFFF: Ageofoam 2133/NB; Kidde Sintex AFFF/ARG 1% x 3%; e os isolantes

térmicos Cold Fire Suppressant Agent e F500 Fire Suppression. Os respectivos AEI foram selecionados por terem apresentado maior toxicidade em ensaios realizados previamente com *E. lucunter* e *Artemia* sp.

Todos os AEI foram diluídos a 10% em água destilada de modo a proporcionar uma melhor dissolução dos químicos, a partir disso, foram realizadas as séries de diluição das soluções-teste para cada ensaio.

3.1.1.2. Fração Solúvel da Gasolina (FSG)

A gasolina comum (tipo C) sem chumbo foi adquirida comercialmente em postos de combustível das franquias *Shell* (Brasil) e *Repsol* (Portugal). As amostras de gasolina foram acondicionadas em frascos apropriados para a sua preservação.

Em laboratório, a gasolina foi submetida à extração da fração solúvel para a realização dos ensaios. Na avaliação da toxicidade dos derivados do petróleo, a utilização da fração solúvel tem sido frequente, já que esta apresenta maior quantidade de constituintes dissolvidos e dispersos de forma estável na água (GIRLING et al., 1992).

Para a separação da Fração Solúvel da Gasolina (FSG) e da Fração Insolúvel da Gasolina (FIG), foram realizados procedimentos baseados em RODRIGUES et al. (2010) com modificações em relação ao tempo de preparação de diluição da gasolina na água: estes autores prepararam a FSG em 22h, enquanto que nesse estudo, o tempo foi estendido para um período de 24h, pois segundo GIRLING et al. (1992), as concentrações dos constituintes dissolvidos nas fases solúveis e insolúveis se equilibraram mais adequadamente após esse período.

Desse modo, a gasolina foi diluída na proporção de 1:4, sendo uma parte de gasolina comercial para quatro partes de água do mar filtrada para *E. lucunter* e *Artemia* sp. e de água Ultrapura para *D. similis*. Após a diluição, iniciou-se a agitação do conteúdo por meio de agitador magnético. Decorrido o tempo de 24h, o agitador foi desligado e a gasolina ficou em repouso por cerca de 40 min, após esse período, foi visível a diferenciação das duas fases: a FIG e a FSG. Com isso, a FIG foi retirada manualmente com auxílio de uma pipeta e descartada, iniciando-se assim o ensaio utilizando apenas a FSG.

Todos os procedimentos foram realizados em local ausente de luz desde o início até a inoculação dos organismos, para minimizar assim a perda e/ou degradação dos compostos.

3.1.2. Ensaios de Toxicidade

Em todos os testes foram analisadas as variáveis físico-químicas no início e final. Para os ensaios com *E. lucunter* e *Artemia* sp. foram analisadas as variáveis: teor de Oxigênio Dissolvido (OD), pH, salinidade e teor de nitrogênio amoniacal (NH₃) pelo método de VERDOUW et al. (1978) com modificações para leitura em microplaca; para os ensaios com *D. similis* foram analisadas as variáveis: OD, pH, condutividade e NH₃ por Hach kit pelo método Nessler.

Os ensaios foram validados quando os parâmetros físico-químicos permaneceram na faixa recomendada, a sensibilidade dos organismos estava no intervalo (testes com substância de referência) e os organismos no controle estavam de acordo com a aceitabilidade estabelecida para cada metodologia de ensaio.

Devido ao curto período de ensaio, o sistema-teste utilizado foi do tipo estático, de modo que os organismos ficaram expostos à mesma solução durante todo o período do ensaio, sem a renovação ou adição de substância.

As concentrações utilizadas nos testes definitivos foram definidas a partir de ensaios preliminares conduzidos no laboratório, utilizando a razão de diluição de 10. Posteriormente essas concentrações foram adequadas em fatores de diluição menores (i.e. maior precisão). Sendo assim, para os ensaios com *E. lucunter* os organismos foram expostos às concentrações nominais de AEI 0,0001; 0,001; 0,005; 0,01 e 0,05% e para a FSG entre 0,005; 0,025; 0,05; 0,25 e 0,50%. Para os ensaios com *Artemia* sp. os organismos foram expostos às concentrações nominais de AEI 0,01; 0,10; 0,30; 0,50 e 0,70% e para a FSG de 0,01; 0,05; 0,15; 0,30 e 0,75%. Para os ensaios de AEI com *D. similis*, os organismos foram expostos às concentrações nominais de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,02 e 0,03% para F-500; de 0,01; 0,03 e 0,04; 0,05 e 0,07% para Cold fire; de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05 e 0,1% para Ageofoam; e de 0,15; 0,25; 0,35; 0,45 e 0,6% para Kidde Sintex 1%. Para a FSG, os organismos foram expostos às concentrações nominais de 0,25; 1,25; 2,5; 3,75 e 7,5%.

3.1.2.1. *Echinometra lucunter*

Os ensaios de toxicidade crônica de curta duração com embriões de *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) foram realizados em parceria com o Laboratório de Ecotoxicologia Professor Caetano Belliboni (Lecotox), sediado na Universidade Santa Cecília. Os testes foram executados seguindo-se o protocolo descrito pela norma

NBR 15350 (ABNT, 2012), utilizando como *endpoint* o desenvolvimento embrionário até a larva pluteus.

Os ouriços são animais de hábito sésil, sendo representativos de ambientes costeiros e geralmente encontrados aderidos a substratos como as rochas (RUPPERT et al., 2005). A espécie *Echinometra lucunter* foi selecionada como modelo experimental por tratar-se de um ensaio com estágio inicial de vida (embriões), sendo essa fase considerada sensível aos organismos apresentando respostas satisfatórias nos testes, e, além disso, por esses organismos apresentarem sensibilidade a diversas classes de poluentes de ambientes marinhos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008).

Os indivíduos adultos de *E. lucunter* foram coletados em costões rochosos na Ilha das Palmas, Guarujá-SP, por meio de mergulho livre, sendo imediatamente envolvidos em macroalgas do local para a menor interferência possível na saúde dos animais. Em seguida, esses foram levados ao laboratório onde foram mantidos em tanques com aeração constante em água do mar em condições controladas até o início dos ensaios.

Para a obtenção dos gametas, os ouriços foram submetidos a estímulos com choque elétrico em circuito de corrente alternada (35V) e posteriormente choque osmótico, com injeção de 1 a 3 mL de KCl (0,5M) na cavidade celomática dos animais, seguindo-se metodologia descrita por PRÓSPERI e ARAÚJO (2002). Em seguida, os gametas foram liberados e o dimorfismo identificado conforme a coloração, sendo os óvulos alaranjados e os espermatozóides esbranquiçados. O processo seguinte ocorreu apoiando a fêmea com a região aboral voltada para baixo em um béquer totalmente preenchido com cerca de 400 mL de água do mar, permitindo assim a deposição dos óvulos diretamente na água (Fig. 1).

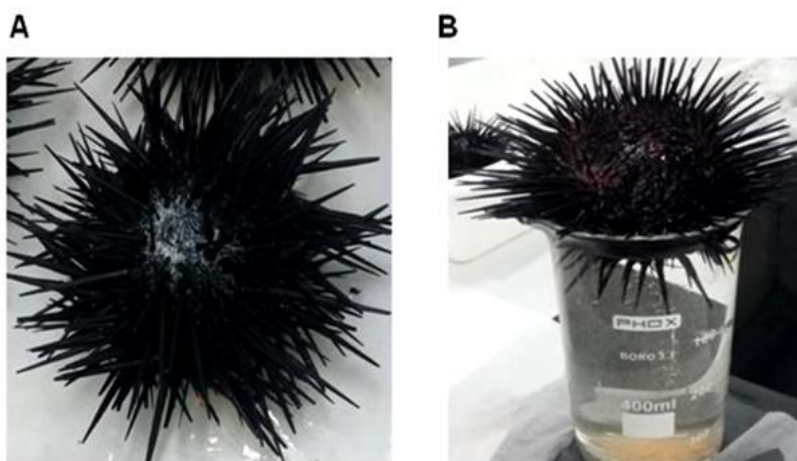


Figura 1 – Liberação dos gametas dos indivíduos adultos de *Echinometra lucunter*; (A) macho e (B) fêmea.

Em seguida, os óvulos foram analisados em microscópio para a verificação do estágio de maturação e morfologia e com isso definir a viabilidade para uso no teste: óvulos adequados devem ser arredondados, com tamanho homogêneo e aspecto liso. Após a confirmação de viabilidade, iniciou-se o processo de eliminação de impurezas por meio de adição de água do mar com posterior agitação e decantação por três vezes, além de ter sido realizada filtração em malha de 150 μm .

O líquido espermático coletado foi separado e acondicionado em um béquer e mantido em gelo. Para o início da fecundação, os espermatozóides foram ativados com adição de água, na proporção de 0,5 mL de esperma para 24,5 mL de água do mar, sendo posteriormente adicionado um volume de 1 a 2 mL dessa solução à solução de óvulos, agitando-se continuamente por aproximadamente 2h. Após esse processo, observou-se uma taxa de fecundação mínima de 80% por meio de análise da formação da membrana de fecundação, em microscópio, em seguida, uma alíquota de solução de ovos recém-fecundados foi adicionada a cada réplica.

O sistema-teste (Tab. 1) foi mantido em condições controladas de temperatura ($26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16h claro; 8h escuro) em câmara de germinação, ausente de alimentação e aeração.

Tabela 1 – Resumo das condições do sistema-teste utilizado para *Echinometra lucunter*.

Sistema-teste <i>Echinometra lucunter</i>	
Tipo de teste	Estático
Recipiente de ensaio	Tubos de ensaio
Água de diluição	Água do mar
Temperatura	$26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
Fotoperíodo	16h:8h (claro:escuro)
Aeração e Alimentação	Ausente
Volume da solução	10 mL
Replicatas por concentração	Quatro
Organismos por concentração	500 a 300 ovos recém fecundados
Expressão do resultado	$\text{CI}_{50-42\text{h}}$
Efeito observado	Desenvolvimento embrio-larval
Aceitabilidade do ensaio	80% de larvas desenvolvidas no controle

Decorrido o tempo de 36 a 42h de exposição às substâncias, os ensaios foram encerrados com a adição de 500 μL de formaldeído a 37% (tamponado com bórax em pH 7,0) em cada tubo de ensaio.

Para a verificação do estágio de desenvolvimento dos embriões, retirou-se uma alíquota de 1mL da solução de cada réplica, a qual foi transferida para uma câmara de SEDGEWICK-RAFTER e feita observação em microscópio, sob aumento de 40X. Para cada réplica foram contadas as primeiras 100 larvas, sendo contabilizadas as larvas com desenvolvimento normal (i.e. em estágio pluteus) (Fig. 2) e larvas com desenvolvimento anormal (i.e. ausência de desenvolvimento, deformações morfológicas ou desenvolvimento retardado).



Figura 2 – Larva de *Echinometra lucunter* em estágio pluteus. (Foto: Valéria Prósperi; Maria Milena de Araújo).

3.1.2.2. *Artemia* sp.

Os ensaios de toxicidade aguda com náuplios de *Artemia* sp. (Linnaeus, 1758), foram realizados no Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA), sediado no Instituto de Biociências (IB) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, no Campus do Litoral Paulista (CLP). Os testes foram executados seguindo-se o protocolo descrito pela norma NBR 16530 (ABNT, 2016a) e pelo método proposto por VEIGA e VITAL (2002), utilizando como *endpoint* a letalidade dos organismos após 48h.

As artêmias são microcrustáceos que ocorrem em ambientes de águas salgadas e salinas que podem apresentar flutuações sazonais (RUPPERT et al., 2005). Esses são animais cosmopolitas com características eurialinas, que apresentam alta tolerância a variações de salinidade (entre 3,5 a mais de 70,) tornando-as adequadas para ensaios que apresentem amplitude de salinidade, bem como a baixos níveis de oxigênio (1 a 2 mg/L) (VEIGA; VITAL, 2002). Além disso, são animais com bastante importância como organismo-alimento para diversas espécies de peixes.

Ainda, pela fácil obtenção dos cistos, a eclosão dos náuplios em laboratório e pelo ciclo de vida conhecido desses organismos, este teste torna-se de simples realização. Por esse motivo, esses animais são muito comuns em avaliações de

toxicidade, respondendo de forma satisfatória a exposições a determinados contaminantes, ao qual estão incluídos compostos como os surfactantes (ROTINI et al. 2015). Conforme as características apresentadas torna-se justificável a escolha desses organismos para os ensaios de toxicidade nesse estudo.

Para a obtenção dos náuplios, foram colocados para a eclosão cistos de *Artemia* sp., esses foram obtidos comercialmente e mantidos em água do mar autoclavada na salinidade 35 com aeração constante por 48h, de modo a facilitar a eclosão e o desencapsulamento dos náuplios até atingirem a fase de execução dos ensaios (náuplio II) (Fig. 3).

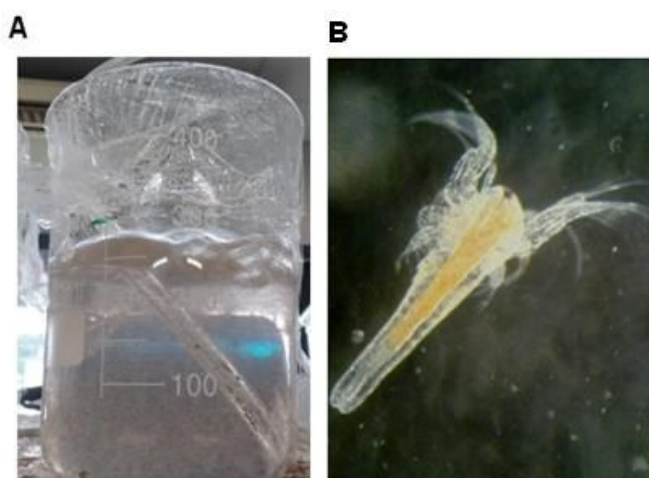


Figura 3 – (A) Eclosão de cistos de *Artemia* sp. e (B) Náuplio após 48h de eclosão.

Após o período de 48h, os animais foram capturados manualmente com auxílio de uma pipeta de vidro e de lupa, e assim foram inoculados 10 organismos por réplica aos tubos de ensaio, contendo 10 mL da solução-teste em cada tratamento.

O sistema-teste (Tab. 2) foi mantido em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) e fotoperíodo (16h claro; 8h escuro) em câmara de germinação, ausente de alimentação e aeração.

Tabela 2 – Resumo das condições do sistema-teste utilizado para *Artemia* sp..

Sistema-teste <i>Artemia</i> sp.	
Tipo de teste	Estático
Recipiente de ensaio	Tubos de ensaio
Água de diluição	Água do mar
Temperatura	25 ± 2 °C
Fotoperíodo	16h:8h (claro:escuro)
Aeração e Alimentação	Ausente
Volume da solução	10 mL
Replicatas por concentração	Quatro
Organismos por concentração	10
Expressão do resultado	CL _{50-48h}
Efeito observado	Letalidade
Aceitabilidade do ensaio	90% de sobrevivência no controle

Decorrido o tempo de 48h de exposição aos químicos, os tubos de ensaio foram observados com auxílio de lupa para a contagem do número de organismos que apresentaram sobrevivência e/ou mortalidade.

3.1.2.3. *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade aguda com neonatos de *D. similis* foram realizados no Grupo de Ecologia Aplicada e Ecotoxicologia, do Departamento de Biologia & Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, na Universidade de Aveiro – Portugal. Os ensaios foram executados seguindo o protocolo descrito por OECD (2004) e pela norma técnica NBR 12713 (ABNT, 2016b) para *Daphnia* spp., utilizando como *endpoint* a imobilidade dos organismos após 48h.

A espécie *D. similis* (Claus, 1876) é cultivada em laboratório, sendo em média 25 organismos por aquário contendo 800 mL do meio artificial ASTM (água dura): esta água é confeccionada baseando-se em ASTM (1980). Os cultivos de *D. similis* são mantidos em condições controladas de temperatura (20 ± 1 °C) e fotoperíodo (16h:8h claro:escuro) em sala aclimatada, sem aeração (Fig. 4) e com alimentação ofertada três vezes por semana, constituída pela alga *Raphidocelis subcapitata* (na proporção de 3 × 10⁵ cel.mL⁻¹) e suplemento de extrato orgânico.

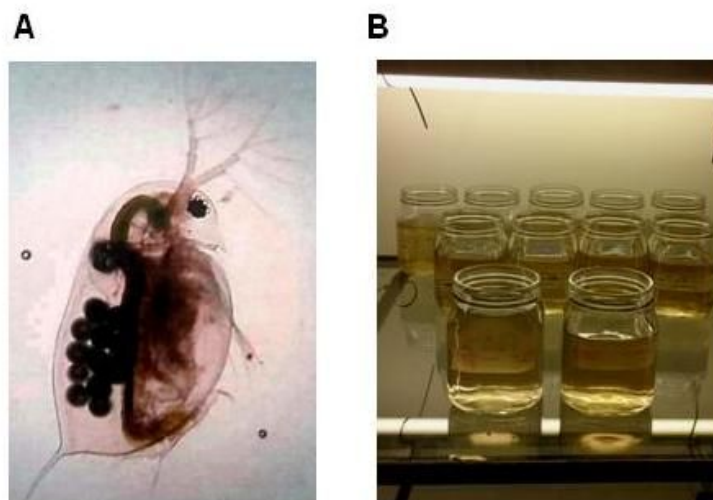


Figura 4 – (A) Indivíduo adulto de *Daphnia similis*. Foto: Daniel Domingues/Eduardo Bertoletti; (B) Cultivo em condições controladas de *Daphnia similis*.

Daphnia spp. é um grupo de microcrustáceos considerados bastante representativos da comunidade de ambientes dulcícolas (RUPPERT et al., 2005). A escolha da espécie *D. similis* para os ensaios ocorreu por esse motivo, e principalmente, pelo fato da espécie possuir uniformidade genética das populações, decorrente de sua reprodução partenogenética com desenvolvimento direto. Além disso, são organismos de fácil cultivo em laboratório, com rápido ciclo de vida e com características bem estabelecidas na literatura, e por isso, organismos desse gênero são amplamente utilizados em ensaios de toxicidade (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

Para utilização nos ensaios de toxicidade, foram selecionados organismos jovens (neonatos) com até 24h obtidos por partenogênese a partir da terceira até a quinta postura de fêmeas com idade de aproximadamente 14 a 26 dias. Após esse período, as culturas mães foram renovadas para o iniciar novamente o ciclo.

O sistema-teste (Tab. 3) foi mantido em condições controladas de temperatura (20 ± 1 °C) e fotoperíodo (16h claro; 8h escuro) em sala de teste aclimatada, ausente de alimentação e aeração.

Tabela 3 - Descrição do sistema-teste utilizado para *Daphnia similis*.

Sistema-teste <i>Daphnia similis</i>	
Tipo de teste	Estático
Recipiente de ensaio	Frascos de vidro
Água de diluição	Meio ASTM (água dura)
Temperatura	20 ± 1 °C
Fotoperíodo	16h:8h (claro:escuro)
Aeração e Alimentação	Ausente
Volume da solução	50 mL
Organismos por concentração	Cinco
Expressão do resultado	CE _{50-48h}
Efeito observado	Imobilidade
Aceitabilidade do ensaio	90% de organismos móveis no controle

Decorrido o tempo de 48h de exposição os frascos foram observados para a contagem do número de organismos imovéis e móveis. Para a análise do *endpoint*, foram considerados imóveis os organismos que demonstraram incapacidade de movimentação por um período de até 15s (ausência de movimento após a agitação do recipiente).

3.1.3. Análise dos Resultados

Após a análise dos *endpoints* dos respectivos ensaios, foram estimadas as concentrações de efeito ou letais a 50% dos organismos expostos (CE₅₀, CI₅₀ e CL₅₀ respectivamente) por meio de regressão não linear, com os respectivos intervalos de confiança a 95%, por meio do *Software GraphPad Prism*, Inc.

Os conjuntos de dados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidades pelo teste de Bartlett, utilizando também o *Software GraphPad Prism*. Sendo confirmada tal condição, os resultados dos testes de toxicidade obtidos em cada tratamento foram comparados com os respectivos controles, por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste *post hoc* de Dunnett. Deste modo, foram estimadas a CEO (Concentração de Efeito Observado) e a CENO (Concentração de Efeito Não Observado).

3.2. RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos analisados nos ensaios com *E. lucunter*, *Artemia* sp. e *D. similis* apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis para as espécies

(Apêndice I, II e III). Os ensaios com as substâncias de referência apresentaram-se dentro da faixa de sensibilidade definida para cada espécie (Apêndice IV) e os valores referentes à sobrevivência e desenvolvimento dos controles apresentaram valores superiores aos limites definidos para as espécies, apresentados separadamente para cada ensaio.

Assume-se assim, que as variáveis relatadas não foram fatores de interferência nos resultados obtidos.

3.2.1. Agentes Extintores de Incêndios

3.2.1.1. *Echinometra lucunter*

Os testes com os embriões do ouriço do mar *E. lucunter* apresentaram valores médios de desenvolvimento embrionário normal de 83% nos controles, segundo a norma da ABNT (2012) esses valores devem estar acima de 80%.

As concentrações que causaram inibição em 50% dos organismos (CI_{50}), as concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações de inibição a 50% dos embriões de *Echinometra lucunter* (CI_{50-42h}) e Concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) dos Agentes Extintores de Incêndios.

AEI	CENO (%)	CEO (%)	CI_{50-42h} (%)
F-500	<0,0001	0,0001	-
Cold Fire	<0,0001	0,0001	0,0002 (0,0001 – 0,0002)
Kidde Sintex 1%	<0,0001	0,0001	0,0004 (0,0002 – 0,001)
Ageofoam	<0,0001	0,0001	0,001 (0,0006 – 0,002)
“Unknown”	0,0001	0,001	0,003 (0,001 – 0,01)
Kidde Sintex 3%	0,001	0,01	0,01 (0,002 – 0,02)
Liovac	0,001	0,01	0,01 (0,006 – 0,01)
Argus Prime	0,001	0,01	0,01 (0,007 – 0,02)

(-) Indica que não foi possível calcular.

As maiores concentrações que não apresentaram efeito significativo em comparação com o controle (CENO) foram inferiores à menor concentração utilizada, para as marcas F-500, Cold Fire, Kidde Sintex 1% e Ageofoam, já que desde a menor concentração testada foram observados efeitos tóxicos significativos para a espécie (CEO), de modo que a partir da primeira concentração (0,0001%) houve um

comprometimento do desenvolvimento embrionário, causando aumento na incidência de anormalidades nos embriões de ouriço.

Além disso, não foi possível a estimativa da CL_{50-48h} para o isolante térmico F-500, já que este apresentou uma inibição de 100% no desenvolvimento dos embriões observados em todas as concentrações testadas.

3.2.1.2. *Artemia* sp.

Os testes com náuplios de *Artemia* sp. apresentaram valores médios de 96% de sobrevivência dos controles; segundo ABNT (2016) esses valores devem estar acima de 90%.

As concentrações que causaram letalidade em 50% dos organismos (CL_{50}), as concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações Letais a 50% de *Artemia* sp. após 48h de exposição (CL_{50-48h}) e Concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) dos Agentes Extintores de Incêndios.

AEI	CENO (%)	CEO (%)	CL_{50-48h} (%)
F-500	<0,001	0,001	-
Cold Fire	0,01	0,1	0,02 (0,01 – 0,03)
Ageofoam	0,01	0,1	0,1 (0,05 – 0,1)
Kidde Sintex 1%	0,01	0,1	0,1 (0,05 – 0,20)
“Unknow”	0,01	0,1	0,1 (0,10 – 0,17)
Kidde Sintex 3%	0,1	0,3	0,1 (0,06 – 0,2)
Liovac	0,1	0,3	0,2 (0,08 – 0,3)
Argus Prime	0,1	0,3	0,2 (0,1 – 0,3)

(-) Indica que não foi possível calcular.

A CENO foi inferior à menor concentração utilizada para F-500, já que para essa marca foram observados efeitos quanto à toxicidade desde a menor concentração utilizada (0,001%). Além disso, não foi possível estimar CL_{50-48h} , já que o F-500 apresentou uma letalidade de 100% dos organismos em todas as concentrações testadas.

3.2.1.3. *Daphnia similis*

Os testes com neonatos de *D. similis* apresentaram valores médios de 100% de sobrevivência dos controles, e de acordo com o protocolo (OECD, 2004) esses valores devem estar acima de 90%.

As concentrações que causaram imobilidade em 50% dos organismos (CE_{50}), as concentrações de Efeito não Observável (CENO) e de Efeito Observável (CEO) e estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações de imobilidade a 50% de *D. similis* (CE_{50-48h}), Concentrações de Efeito não Observável (CENO) e Concentrações de Efeito Observável (CEO), dos Agentes Extintores de Incêndios.

AEI	CENO (%)	CEO (%)	CE_{50-48h} (%)
F-500	<0,0001	0,0001	-
Cold Fire	0,02	0,03	0,03 (0,02 – 0,1)
Ageofoam	0,02	0,03	0,04 (0,03 – 0,1)
Kidde Sintex 1%	0,2	0,3	0,3 (0,1 – 0,3)

(-) Indica que não foi possível calcular.

Neste ensaio, novamente a CENO foi inferior à menor concentração utilizada para F-500, já que foram observados efeitos em 100% dos organismos expostos desde a menor concentração utilizada. Assim também não foi possível calcular a CE_{50-48h} .

3.2.2. Fração Solúvel da Gasolina

3.2.2.1. *Echinometra lucunter*

Os ensaios com embriões do ouriço do mar *E. lucunter* apresentaram valores médios de 84% no desenvolvimento embrionário normal nos controles, estando dentro da faixa de sobrevivência aceitável (ABNT, 2012).

Na figura 5 estão apresentadas a CENO, a CEO e a taxa de sobrevivência dos organismos no controle. Houve um decréscimo no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* com o aumento das concentrações após a exposição por 42h a FSG.

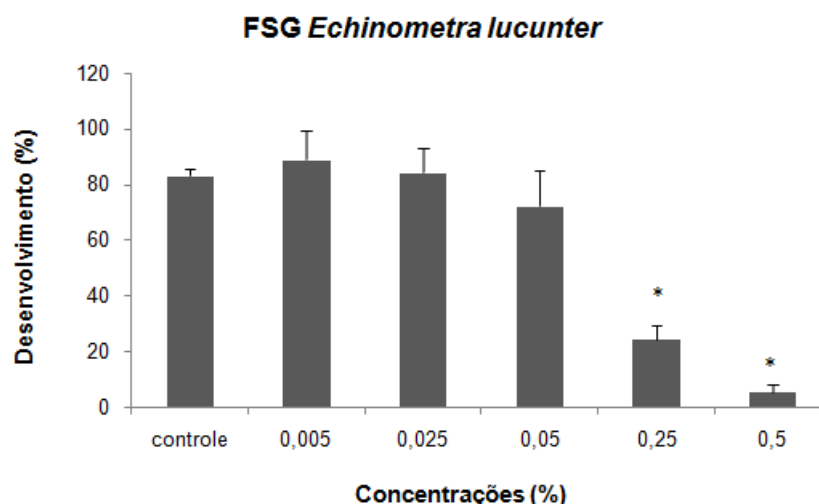


Figura 5 – Taxa média do desenvolvimento embrio-larval (%) e os respectivos desvios padrões de *Echinometra lucunter* exposto a Fração Solúvel da Gasolina após 42h.

A maior concentração que não apresentou efeito significativo (CENO) em comparação com o controle foi 0,05% e a menor concentração que apresentou efeito significativo foi de 0,25%. A concentração que causou inibição no desenvolvimento embrionário em 50% dos organismos (CI_{50-42h}) foi de 0,11% (0,07 – 0,2%).

3.2.2.2. *Artemia* sp.

O ensaio com *Artemia* sp. apresentou valor médio de sobrevivência de 97% no controle, dentro faixa estabelecida pela ABNT (2016).

Na figura 6 estão apresentadas a CENO (0,05%), a CEO (0,15%) e a taxa de sobrevivência dos organismos no controle. A CL_{50-48h} foi de 0,11% (0,07 – 0,2%). Houve aumento da letalidade dos náuplios de *Artemia* sp. com o aumento das concentrações, após a exposição por 48h a FSG.

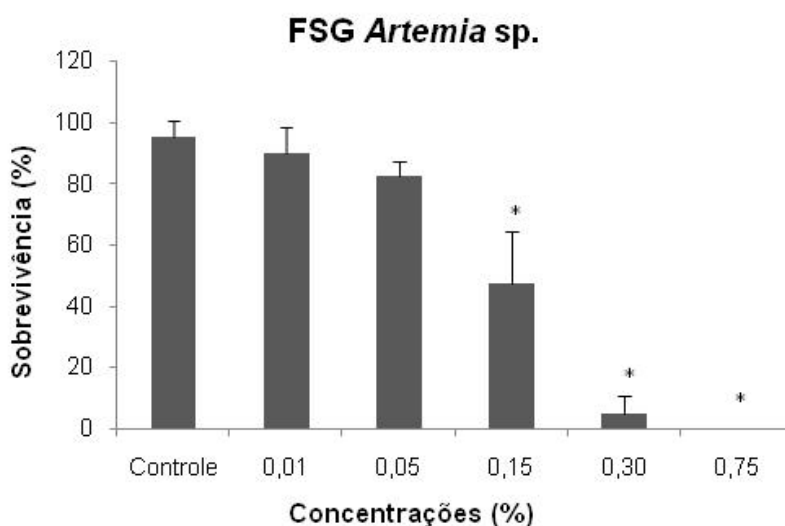


Figura 6 – Taxa média de sobrevivência (%) e os respectivos desvios padrões de *Artemia* sp. exposta a Fração Solúvel da Gasolina após 48h.

3.2.2.3. *Daphnia similis*

O ensaio com *D. similis* apresentou valor médio de sobrevivência de 100% no controle.

Na figura 7 estão apresentados os resultados obtidos no experimento. O resultado do teste foi bimodal, e neste caso, optou-se por uma interpretação dos resultados mais conservadora. Como foram observados efeitos significativos em 0,25% e 2,5% após exposição, com ausência de toxicidade na concentração intermediária (1,25%), foi considerada a concentração de 0,25% como CEO, e a CENO não pôde ser calculada (<0,25%). A estimativa da CE_{50-48h} para *D. similis* foi de 1,10% (0,60 - 2,0%).

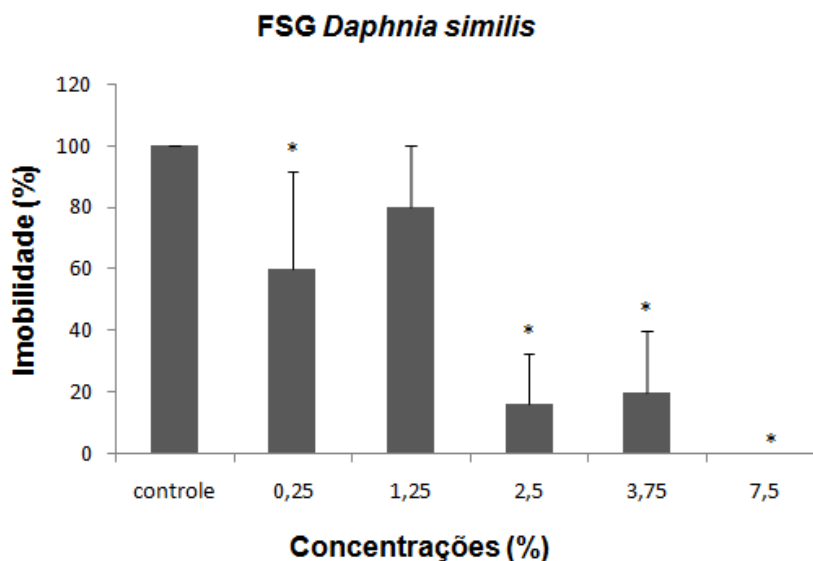


Figura 7 - Taxa média de organismos móveis (%) e os respectivos desvios padrões de *Daphnia similis* exposta a Fração Solúvel da Gasolina após 48h.

3.3. DISCUSSÃO

A persistência de substâncias no ambiente depende da espécie química e dos ciclos de vida característicos de cada composto. Essa condição traz uma preocupação em relação aos princípios ativos encontrados nas formulações comerciais dos AEI, já que alguns PFC têm como característica possuir a dispersão nos ecossistemas e permanecer ativo após longos períodos interagindo com a biota, conforme mencionado anteriormente por BOUDREAU et al. (2003) e SUJA et al. (2009).

A avaliação da interação dos organismos com esses compostos químicos no ambiente são muito relevantes, já que há a ocorrência dessas substâncias em diversos ambientes, e como relatado na literatura, com capacidade em bioacumular em amplos grupos de animais. Estudos abordando a toxicidade crônica dos PFC foram realizados por diversos grupos de pesquisa, SOLLA et al. (2012) encontraram compostos fluorados como os PFSA (ácidos sulfônicos perfluorados) e PFCA (ácidos carboxílicos perfluorados) e seus produtos de degradação (destacando-se os PFOS) no plasma de tartarugas em lagos no Canadá. Ainda, diversos pesquisadores observaram a ocorrência desses químicos em tecidos de vários grupos de animais (GIESY; KANNAN 2001; GULKOWSKA et al., 2006, AWAD et al., 2011), além da presença em fígado e sangue (KANNAN et al., 2001).

Estudos considerando *endpoints* de toxicidade agudos são extremamente importantes para analisar os impactos imediatos da liberação desses compostos no ambiente, e dessa forma, estimar as concentrações que causam efeitos adversos aos organismos e consequentemente ao equilíbrio dos ecossistemas. Nesse sentido, o presente estudo trouxe respostas sobre a toxicidade das formulações comerciais utilizadas para combate a incêndios aos organismos marinhos (*Artemia* sp. e *Echinometra lucunter*) e dulcícola (*Daphnia similis*).

De um modo geral, observou-se que as marcas de AEI que apresentaram um maior grau de toxicidade à todas as espécies testadas foram os Isolantes Térmicos F-500 e Cold Fire, considerando tanto os *endpoints* de letalidade quanto de imobilização e inibição do desenvolvimento. Ainda, deve ser destacado que a formulação de marca F-500 causou efeitos adversos desde a menor concentração utilizada, impossibilitando o cálculo das CE, CL e CI_{50} ; apresentando, portanto, caráter extremamente tóxico aos organismos em todos os ensaios.

Para os organismos marinhos, a concentração estimada que causou toxicidade para *E. lucunter* (CI_{50-42h}) compreendeu o intervalo de 0,0002 a 0,01% (para a formulação mais tóxica – Cold Fire e para a formulação menos tóxica - Argus Prime, respectivamente); para *Artemia* sp. (CL_{50-48h}) os resultados compreenderam o intervalo de 0,02 a 0,2% (para a formulação mais tóxica – Cold Fire e para a formulação menos tóxica - Argus Prime, respectivamente).

Na literatura há uma lacuna em estudos de toxicidade utilizando organismos de ambientes marinhos expostos às formulações comerciais dos AEI, porém, dados fornecidos no ano de 1980 por meio de relatório da empresa 3M, fabricante das AFFF FC-203 e 206 na época, realizaram testes com estágio larval do molusco *Crassostrea virginica*, esses apresentaram uma CL_{50-48h} de 47 mg/L e para o crustáceo *Palaemonetes pugio* os resultados foram CL_{50-96h} 510 mg/L após exposição ao composto FC-203. Para a formulação FC-206, os resultados para o molusco *Crassostrea virginica* (estágio larval) foram CL_{50-48h} de 100 a 240 mg/L e para o crustáceo *Palaemonetes vulgaris* CL_{50-96h} de 280 mg/L (SALAZAR, 1985). Esses estudos demonstraram menor toxicidade aos compostos fabricados na época para os modelos experimentais utilizados.

Com relação a organismos de ambientes dulcícolas, os resultados obtidos nesse estudo para *D. similis* compreenderam o intervalo de CE_{50-48h} 0,03 a 0,3% (para a formulação mais tóxica – Cold Fire e para a formulação menos tóxica – Kidde Sintex

1%, respectivamente). McDONALD et al. (1997) conduziram ensaios expondo o anfípode *Hyalella azteca* ao AFFF Phos-Chek WD-881, obtendo CL_{50-96h} 10 mg/L em água mole e de 22 mg/L em água dura. Resultados encontrados por SAFETY DATA SHEET (2007) para o crustáceo *Daphnia magna*, o peixe *Leuciscusidus* e as algas *Scenedesmus subspicatus*, demonstraram efeitos em diferentes intervalos após exposição ao AFFF ArticFoam 203, com $CE_{50-48h} = 1,05$ g/L; $CL_{50-96h} = 2,1$ g/L; $CE_{50-72h} = 5,5$ g/L, respectivamente.

As concentrações encontradas na literatura e nesse estudo são consideradas estimativas de toxicidade para as formulações comerciais, como observado, os dados expostos estão relacionados a diferentes espécies respondendo a distintas marcas dos produtos. Nesse sentido, é importante ressaltar que as informações existentes sobre a toxicidade aos organismos apresentaram efeitos adversos em baixas concentrações. Sendo assim, esses compostos demandam uma preocupação ambiental, pois todas as informações disponíveis sobre a toxicidade dos AEI, incluindo as produzidas nessa pesquisa, demonstram alta toxicidade dessas formulações comerciais aos organismos aquáticos.

Os Isolantes Térmicos tiveram destaque nesse estudo, pois esses compostos são considerados eficientes na supressão do fogo, em contrapartida, foram os que causaram maior toxicidade a todos os organismos testados. A hipótese para as diferenças nas toxicidades dos AEI podem ser explicadas pelas características químicas de cada produto e seu mecanismo de ação. Os IT possuem como comportamento a penetração no material em combustão, e dessa forma, a solubilidade dos IT torna-se mais elevada, podendo explicar em partes, um possível aumento na assimilação desses compostos pelos animais, já que essa capacidade para os LGE é reduzida ou ausente. Assim, é importante salientar que os IT tem potencial em causar maiores impactos a biota aquática.

De qualquer modo, a despeito de aspectos relacionados ao sigilo industrial dos componentes das formulações comerciais, estudos devem ser conduzidos para disponibilizar as formulações químicas dos AEI e avaliar as toxicidades e riscos ambientais de seus diferentes constituintes, de forma a subsidiar o desenvolvimento de formulações eficientes e com menores riscos ecológicos.

Segundo informações fornecidas pelo IBAMA sobre o incêndio ocorrido em Santos – SP no Terminal Petroquímico da Ultracargo estima-se que foram utilizados mais de 60 mil litros de diferentes marcas dos AEI durante o combate a emergência

(Fig. 8), os quais foram diluídos em água estuarina antes do uso. As diluições recomendadas de uso pela NBR 15511 em água doce, salobra ou do mar, variam entre 1%, 3% e 6% (ABNT, 2008), conforme especificações de cada marca/fabricante do produto. Assim, é importante salientar a grande quantidade desses compostos liberados no ambiente aquático sem tratamento em apenas um caso específico, e os impactos agudos observados durante o ocorrido; e ainda, o problema relacionado aos impactos potencialmente crônicos pelos princípios ativos das AEI e seus produtos de degradação.



Figura 8 – Combate ao Incêndio ocorrido no Terminal Petroquímico da Ultracargo em 2015, liberação de grande volume de LGE - AFFF e Isolantes Térmicos, Santos –SP. Foto: Diego Lameiro/ Corpo de Bombeiros da PMESP.

AWAD et al. (2011) estudaram as concentrações encontradas no ambiente após incêndio ocorrido em um aeroporto no Canadá. Nesse episódio, 22 mil litros de AFFF foram liberados nas proximidades do aeroporto, nessa avaliação, o PFOS foi encontrado em todas as amostras de água, apresentando 690 ng/L após três anos e 290 ng/L após nove anos do ocorrido.

Devido à persistência dos PFOS no ambiente e nos animais, nos anos 2000, a empresa 3M decidiu interromper a produção de produtos baseados nesses compostos, incluindo as AFFF (MOODY; FIELD, 2000; SONTAKE et al., 2014). A partir de disso, mudanças estão sendo estudadas utilizando novas formulações de AEI, como

alternativa, a empresa Dupont criou as AFFF Forafac®1157 e Forafac®1157N. Em estudos conduzidos por HAGENAARS et al. (2011), após exposição da espécie de peixe *Scophthalmus maximus* a essas formulações, os autores concluíram, a princípio, que esses compostos são menos tóxicos do que o PFOS.

De um modo geral, os efeitos das formulações utilizadas nesse estudo trazem uma preocupação pelo escasso monitoramento do despejo in natura no ambiente, trazendo grande risco ambiental, desse modo, é necessário a implementação de medidas mitigadoras para os efeitos causados pelos incêndios, de maneira que a necessidade de uso dessas substâncias venha concomitantemente com o monitoramento ambiental e um possível tratamento prévio ao lançamento nos corpos de água.

Além da presença desses compostos no ambiente, corriqueiramente há a entrada de compostos derivados do petróleo nos ecossistemas aquáticos. Lamentavelmente, episódios de vazamentos ou acidentes envolvendo derivados do petróleo não são incomuns (GUNSTER et al., 1993; CUTTER; JI 1997; KAN; ABASSI 1999; POFFO et al., 2001; CHANG; LIN 2006; SOARES-GOMES et al., 2010; CETESB, 2017).

Em relação à gasolina, os componentes geralmente encontrados em sua parte solúvel são os hidrocarbonetos de menor peso molecular, como os alcanos, naftalenos, benzenos, olefinas e naftênicas (PETERSON, 1994). Dentre essas substâncias, as principais responsáveis pela toxicidade dos organismos aquáticos são os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e os monoaromáticos (como por exemplo, os BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) característicos por conterem um ou mais anéis benzênicos em sua estrutura (LEE; PAGE, 1997; ANDERSON et al., 1974; MURRAY et al., 1984; SOARES-GOMES et al., 2010), de modo que esses componentes são mais facilmente solubilizados em água tornando-se biodisponíveis, e dessa forma, podem levar a efeitos tóxicos graves aos organismos aquáticos.

No presente estudo foram observadas $CI_{50-42h} = 0,11\%$ para embriões do ouriço *Echinometra lucunter* e CL_{50-48h} e também de $0,11\%$ para náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp., representando forte evidência de toxicidade aos organismos marinhos em baixas concentrações da FSG. Há ainda uma série de estudos realizados expondo organismos marinhos a FSG. MOHAMMED et al. (2005), observou $CL_{50-96h} = 0,01\%$ para o misidáceo *Metamysidopsis insularis*, representando uma alta toxicidade desses compostos. Em estudo realizado por RODRIGUES et al. (2010) foi observado $CL_{50-96h} =$

5,48% para estágios larvais do peixe *Odontesthes argentinensis*. Ainda, efeitos relacionados a respostas a alterações histológicas foram observadas, RODRIGUES et al. (2010) relatou uma variedade de lesões nas larvas de *O. argentinensis* após 96h, como hiperplasia epitelial nas brânquias, pseudobrânquias e esôfago além de alterações hepáticas como dilatação sinusóides, citomegalia, degeneração bi-nucleada e nuclear de hepatócitos.

Já para organismos de água doce, no presente estudo foram encontrados valores de toxicidade aguda de $CE_{50-48h} = 1,10\%$ para os neonatos do microcrustáceo *Daphnia similis*. GALVAN (2015) observou uma ordem de magnitude maior para os peixes *Danio rerio* e *Astyanax altiparanae* resultando em CL_{50-96h} de 20% e 15% respectivamente. Os resultados obtidos com os peixes apresentaram uma tolerância mais elevada ao químico, no entanto, o estudo conduzido pelos autores utilizou animais adultos, o que contribui para a diminuição da sensibilidade à exposição. Em efeitos relacionados a respostas genéticas, bioquímicas e fisiológicas, SIMONATO et al. (2013) conduziram uma avaliação expondo o peixe *Prochilodus lineatus* em até 96h a FSG na concentração de 5%, assim, foi observado a ocorrência de hemólise, hiperglicemia como resposta ao estresse e alterações no equilíbrio iônico das brânquias, resultando em aumento da densidade das células-cloreto. Em outro estudo, FEDATO et al. (2010) encontraram danos no material genético na espécie de molusco *Corbicula fluminea* também após exposição de até 96h a concentração de 5%.

Os dados encontrados na literatura e os resultados dessa pesquisa, embora utilizando *endpoints* distintos (desde efeitos letais até respostas crônicas), revelaram o potencial tóxico da FSG aos organismos aquáticos. Os níveis de efeito reportados na literatura foram em geral próximos aos obtidos nesse estudo. Quando observados os resultados após exposição à FSG entre as espécies utilizadas nesse estudo, é possível verificar a diferença de toxicidade em relação aos organismos marinhos com a gasolina adquirida no Brasil, ao qual apresentaram respostas similares, com alta toxicidade; e o teste com água doce realizado com a gasolina adquirida em Portugal, ao qual em comparação, apresentou toxicidade 10 vezes menor.

De certo modo, a resposta de sensibilidade dos organismos com diferentes *endpoints* não costuma ser comparada, porém, algumas explicações podem ser atribuídas a esse fato, como as diferenças na origem do petróleo bruto, podendo ser bastante variado em termos de substâncias químicas, peso molecular e diferentes cadeias de carbono (PETERSON, 1994). Além disso, nesse caso é possível considerar

as diferenças na comercialização da gasolina, o que pode acarretar e/ou influenciar na assimilação dos químicos pelos organismos, causando diferenças nas respostas das espécies. Sabe-se que a gasolina comercial brasileira apresenta na sua composição uma porcentagem relativamente alta de álcool etílico (entre 20 e 30%, aproximadamente), esse composto faz com que a solubilidade dos compostos hidrofóbicos (como os hidrocarbonetos) presentes na gasolina aumente, podendo assim aumentar a absorção pelos organismos e causar uma maior toxicidade (COURSEUIL; FERNANDES, 1999).

Para minimizar a ocorrência de episódios dessa categoria, e esclarecer regras, surgiram convenções internacionais para a prevenção da poluição por óleo no ecossistema marinho decorrente de fatores operacionais ou acidentais causados por navios – MARPOL (IMO, 1973). Ainda, no Brasil, há a legislação nº 9966/2000 que dispõe sobre a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleos, substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional (BRASIL, 2000) e a legislação nº 4.136/2002, que dispõe sobre as sanções aplicáveis ao lançamento das substâncias previstas na lei anteriormente citada e dá outras providências (BRASIL, 2002). Além da Resolução CONAMA 273/2000, que estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição, e consideram ainda, os riscos de incêndios, explosões e contaminações ambientais (CONAMA, 2000).

A situação de acidentes causados por hidrocarbonetos traz uma importante preocupação ambiental, pois quando esses compostos entram no meio ambiente, acabam sofrendo processos de dispersão, transformação e acumulação em determinados compartimentos ambientais, que assim determinam as concentrações do contaminante e seus possíveis impactos nos ecossistemas (MARINEL et al. 2008). Em casos de acidentes ambientais, a fração solúvel dos compostos derivados do petróleo permanece na água, rapidamente causando toxicidade aos organismos aquáticos além de efeitos crônicos, já que há uma relação entre a presença dos HPA nos ecossistemas aquáticos com a bioacumulação nos organismos (SOARES-GOMES et al., 2010).

3.4. CONCLUSÃO

Todas as substâncias isoladas testadas nessa etapa da pesquisa apresentaram efeitos tóxicos elevados aos organismos, destacando as formulações comerciais dos Isolantes Térmicos F-500 e Cold Fire; e do LGE - AFFF Kidde Sintex 1%.

Em ordem de efeitos, esses foram os compostos que apresentaram maior toxicidade para todos os organismos (*Echinometra lucunter*, *Artemia* sp. e *Daphnia similis*), demonstrando alta toxicidade para diferentes os *endpoints* utilizados nesse estudo, como letalidade e inibição do desenvolvimento embrionário tanto para os organismos marinhos quanto para a espécie dulcícola.

4. CAPITULO II – ENSAIOS DE TOXICIDADE COM MISTURAS BINÁRIAS

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados utilizando como modelos experimentais dois invertebrados aquáticos: náuplios do microcrustáceo marinho *Artemia* sp. e neonatos do microcrustáceo dulcícola *Daphnia similis*.

4.1.1. Substâncias Utilizadas

As soluções-teste foram preparadas pela diluição dos compostos comerciais em água do mar (sal. 35 ± 1), filtrada em membranas de poliéster de 0,45 μm para *Artemia* sp. e água doce dura (meio ASTM) para *D. similis*.

As concentrações utilizadas nos testes com as misturas foram definidas para cada espécie a partir dos resultados obtidos com as substâncias isoladas.

4.1.1.1. Agentes Extintores de Incêndios (AEI)

Os ensaios com as misturas binárias foram realizados com os Líquidos Geradores de Espuma - AFFF de marcas Ageofoam 2133/NB e Kidde Sintex AFFF/ARG 1% x 3% e o Isolante Térmico de marca Cold Fire Suppressant Agent.

A escolha dos compostos ocorreu por esses terem apresentado a maior toxicidade entre todas as formulações anteriormente testadas nos testes isolados (Capítulo I). Porém, apesar da alta toxicidade apresentada pelo IT F-500, nessa etapa optou-se pela não utilização dessa formulação, pois para esse composto as menores concentrações já apresentaram toxicidade em 100% dos organismos testados, impossibilitando assim o cálculo da CE e CL_{50} , sendo esse um dos requisitos para a análise dos ensaios com as misturas binárias.

4.1.1.2. Fração Solúvel da Gasolina (FSG)

A preparação foi similar à descrita no item 3.1.1.2. do Capítulo I.

4.1.2. Ensaio com misturas binárias

Em todos os testes foram analisadas as variáveis físico-químicas no início e final (Apêndice V e VI). Para *Artemia* sp., foram analisados os teores de Oxigênio Dissolvido (OD), pH, salinidade e teores de nitrogênio amoniacal (NH_3) pelo método de

VERDOUW et al. (1978); para *D. similis* foram analisados OD, pH, condutividade e NH_3 por Hach kit pelo método Nessler. Para a validação dos ensaios, foram analisados os parâmetros físico-químicos, observando se variaram na faixa recomendada. Em relação aos organismos-teste, o critério foi considerar se a sobrevivência dos organismos no grupo controle esteve acima de 90%.

Os ensaios consistiram em utilizar três réplicas com cinco organismos cada no caso de *D. similis* e 10 organismos cada para *Artemia* sp.. Para isso, foram repetidas as mesmas cinco concentrações utilizadas nos testes previamente realizados com as substâncias isoladas. Desse modo, foram testadas as cinco concentrações de cada químico com as cinco concentrações da FSG, totalizando 25 combinações por ensaio. As soluções-teste foram preparadas em balão volumétrico, em que previamente o fundo da vidraria foi preenchido com a água de diluição e posteriormente foi adicionada a combinação de concentração dos químicos, seguindo-se o desenho experimental mostrado na figura 9 para *D. similis* e na figura 10 para *Artemia* sp..

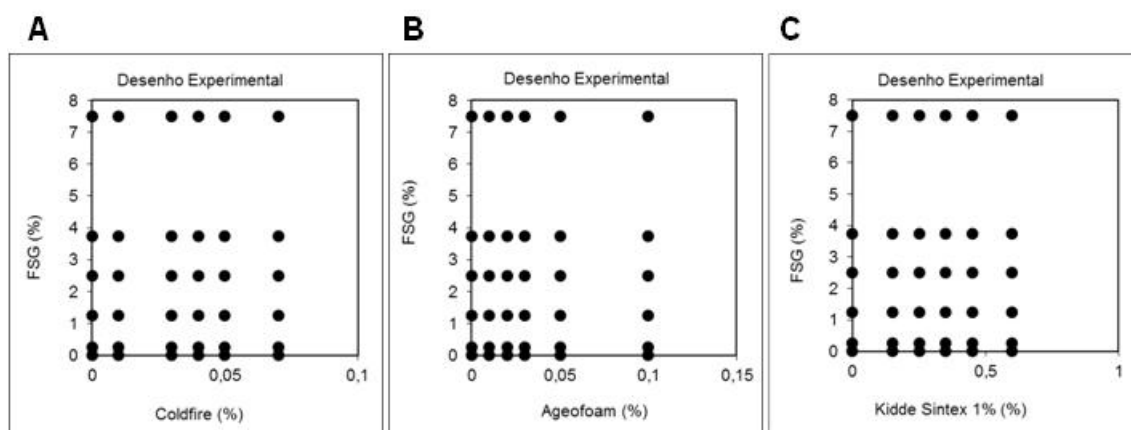


Figura 9 - Desenho Experimental dos testes com misturas de *D. similis* com as concentrações das soluções testes (%) dos compostos; (A) Cold Fire com Fração Solúvel da Gasolina (FSG); (B) Ageofoam com FSG; (C) Kidde Sintex 1% com FSG.

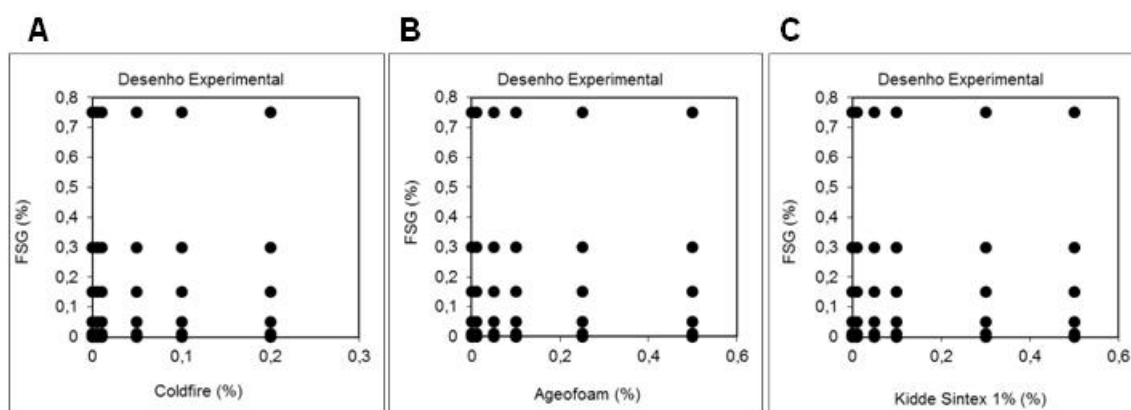


Figura 10 - Desenho Experimental dos testes com misturas de *Artemia* sp. com as concentrações das soluções testes (%) dos compostos; (A) Cold Fire com Fração Solúvel da Gasolina (FSG); (B) Ageofoam com FSG; (C) Kidde Sintex 1% com FSG.

4.1.3. Análise dos Resultados

Após a análise dos *endpoints* dos respectivos ensaios, foram estimadas as concentrações de exposições (CE_{50} e CL_{50}) e a dose-resposta (referida como parâmetro *b*) por regressão logística de três parâmetros. Esses resultados foram obtidos pelo *Software SigmaPlot 12.5*.

Os dados foram analisados no processo seguinte, em que foi feita a comparação do efeito tóxico observado com o efeito esperado (calculado com base nos dados das toxicidades de substâncias isoladas) com o intuito de prever a toxicidade das misturas. Para isso, utilizou-se a ferramenta MIXTOX, na qual os dados de toxicidade de cada composto combinado foram analisados pelos modelos conceituais. Tendo como base que para muitas substâncias químicas o Modo de Ação (MoA) é desconhecido ou incompleto, nesse estudo optou-se por utilizar dois modelos de referência bem estabelecidos: 1) Concentração de Adição (CA), que assume que os produtos químicos têm o mesmo MoA, portanto, o mesmo local de ação no organismo; e 2) Ação Independente (IA), que assume que os produtos químicos possuem MoA diferente, ou seja, sítios de ação diferentes no organismo.

Quando os dados foram ajustados significativamente ($p < 0,05$) para ambos os modelos conceituais, foram verificados seus desvios para um melhor entendimento das interações entre as substâncias, conforme indicado por JONKER et al. (2005) (Tab. 7). O melhor ajuste escolhido ocorreu pela comparação do nível de significância (valor de *p*) e a soma dos quadrados (resíduos). Assim, os resultados puderam ser verificados quanto aos efeitos. Os termos utilizados nesse estudo para inferir os resultados foram: Aditividade (quando há a soma de toxicidade dos testes isolados); Sinergismo (quando o efeito é mais severo do que o esperado) ou Antagonismo (quando o efeito é mais baixo do que o esperado) (S/A); efeitos dependentes da dose (*Dose Level-dependent - DL*); ou ainda razão da dose dos componentes da mistura (*Dose Ratio-DR*). Os resultados obtidos foram plotados em gráfico de isobologramas (*2D counter*) para uma melhor observação dessa interação.

Tabela 7 – Parâmetros de referência dos modelos CA e IA. Adaptado de JONKER et al. (2005).

Desvio	Parâmetro	CA	IA	Significado	
Sinergismo	a	< 0	< 0	Sinergismo	
Antagonismo	b	> 0	> 0	Antagonismo	
Razão das Doses (DR)	a	> 0	> 0	Antagonismo, exceto para as misturas na qual o valor de b for negativo, indicando sinergismo.	
		< 0	< 0	Sinergismo, exceto para as misturas na qual o valor de b for positivo, indicando antagonismo.	
	b	> 0	> 0	Antagonismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico i .	
		< 0	< 0	Sinergismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico i .	
	Dose dependente (DL)	a	> 0	> 0	Antagonismo em doses baixas e sinergismo em doses altas.
			< 0	< 0	Sinergismo em doses baixas e antagonismo em doses altas.
b		> 1	> 2	Desvio em concentrações inferiores a CL/CE_{50}	
		$= 1$	$= 2$	Desvio nas concentrações da CL/CE_{50}	
		$0 < b_{DL} < 1$	$1 < b_{DL} < 2$	Desvio em concentrações superiores a CL/CE_{50}	
		< 0	< 1	Sem desvios, entretanto a magnitude do S/A é dependente da dose para CA e nível de efeito para IA.	

4.2. RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos analisados nos ensaios com misturas para *Artemia* sp. e *D. similis* apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis para as espécies (Apêndice V e VI) e os valores referentes à sobrevivência e desenvolvimento dos controles apresentaram valores superiores aos limites definidos para as espécies, apresentados separadamente para cada ensaio.

Os valores estimados da CI e CL_{50-48h} realizados nos testes isolados, concomitantemente aos testes com as misturas, apresentaram valores em acordo com os resultados obtidos nos testes isolados apresentados no capítulo I. Esses valores estão mencionados separadamente no texto para as diferentes marcas de AEI.

4.2.1. *Daphnia similis*

O ensaio com *D. similis* apresentou 100% de sobrevivência entre os organismos do controle. Os gráficos foram definidos com base nos dados calculados pela ferramenta MIXTOX considerando os modelos CA e IA, estes estão demonstrados nas figuras 11, 12 e 13. O detalhamento dos resultados obtidos encontra-se no Apêndice VII.

4.2.1.1. Cold Fire

Os resultados das CI_{50-48h} para Cold Fire e FSG apresentaram valores de 0,03 e 1,87% respectivamente. A toxicidade da mistura de Coldfire e da FSG foi significativamente ajustada pelos resultados do MIXTOX para Ação Independente (IA) e Adição de Concentração (CA), para os dois modelos ocorreu o ajuste no desvio DL, esses resultados foram então comparados aos parâmetros de referência propostos por JONKER et al. (2005).

Os dados obtidos para o modelo CA foram: uma soma de resíduos quadrados (SS) =69,62; o nível de significância (valor p) = $5,15 \times 10^{-69}$ e o coeficiente de regressão (r^2) =0,82. Posteriormente, esses dados foram avaliados quanto aos possíveis desvios; para isso, os resultados de CA foram plotados nos desvios, sendo assim, após análise, o modelo DL mostrou o melhor ajuste dos dados, sendo esse o modelo escolhido com resultados de SS =23,15; p valor =0,003; $r^2 = 0,94$ e o parâmetro dos desvios $a = -0,09$ e $b = -50,37$.

Os dados obtidos para o modelo IA foram: SS =142,60; p valor = $2,84 \times 10^{-53}$, r^2 =0,64. Na busca de possíveis desvios, o padrão de DL também mostrou ser o melhor ajuste: os resultados foram SS =22,37; p valor =0,0001; r^2 =0,94 e o parâmetro dos desvios $a = -0,39$ e $b = -153,37$.

O padrão DL apresentou o melhor ajuste para ambos os modelos, e as respostas foram parecidas, mesmo tratando-se de modelos matemáticos distintos, o que parece confirmar tais resultados. Nesse caso, o parâmetro a para o modelo de CA mostrou-se <0 , esse resultado significa que o sinergismo pode ocorrer em baixos níveis da dose e o antagonismo pode ocorrer em níveis mais elevados; já o parâmetro complementar b foi <0 , neste caso o resultado também significa que a magnitude do sinergismo ou antagonismo depende dos níveis de dose dos produtos químicos, ou seja, essas respostas são dependentes da dose dos compostos. Além disso, quando o modelo IA é considerado, os resultados foram semelhantes: os parâmetros a e b foram <0 , indicando

que a magnitude das interações é dependente do nível das doses, ou seja, o sinergismo pode ocorrer em baixos níveis da dose e antagonismo em níveis elevados, em relação ao resultado esperado em comparação aos dados observados nos testes isolados. Dessa forma, a magnitude do sinergismo ou antagonismo nesse caso é relacionada as concentrações de cada químico presente na mistura.

Ainda assim, os resultados podem ser observados na figura 11, em que os gráficos de isoblograma confirmam que o sinergismo foi o padrão principal relacionado aos efeitos combinados entre a FSG e o AEI Coldfire. Nos casos de sinergismo, os efeitos são potencializados, portanto, a toxicidade resultante é maior do que a esperada. Por isso, do ponto de vista da avaliação de risco, esses dados indicam um cenário muito prejudicial para o meio ambiente.

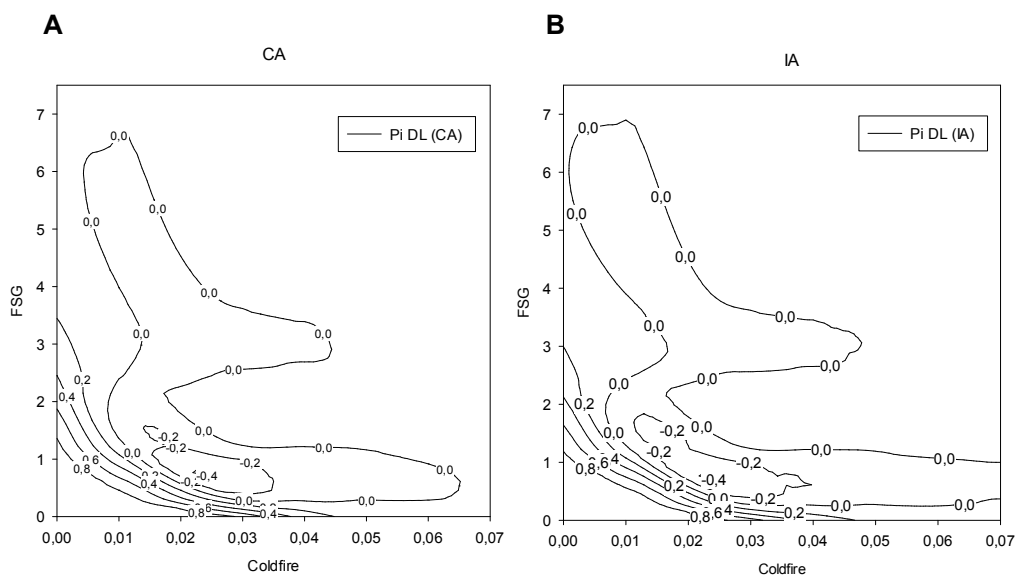


Figura 11 – Representação gráfica (2D) da exposição de *Daphnia similis* ao Cold Fire e a FSG em mistura binária, mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B) e seus desvios.

4.2.1.2. Ageofoam

Os resultados das CI_{50-48h} para Ageofoam e FSG apresentaram valores de 0,06 e 1,64% respectivamente. A toxicidade da mistura da Ageofoam e da FSG foi significativamente ajustada pelos resultados do MIXTOX aos modelos IA e CA. Entretanto, uma vez que não foram encontrados desvios para ambos os modelos, esses resultados sugerem que os efeitos dos compostos da mistura foram aditivos, em que o efeito tóxico combinado é igual à soma dos efeitos tóxicos das substâncias isoladas.

Os dados obtidos para o modelo CA foram: uma soma de resíduos quadrados (SS) = 47,25; o nível de significância (valor p) = $4,37 \times 10^{-66}$ e o valor do coeficiente de regressão (r^2) = 0,87.

Os resultados para o modelo IA foram SS= 36,77; p valor= $2,38 \times 10^{-68}$ e r^2 = 0,90. Resultados aditivos usando o mesmo modelo de predição foram encontrados por FIGUEREDO et al. (2016), que ao avaliarem a toxicidade combinada de zinco e níquel afirmaram que esses produtos químicos causaram efeitos aditivos. O gráfico de isoblograma (Fig. 12) confirma que não houve padrão de sinergismo ou antagonismo para os compostos.

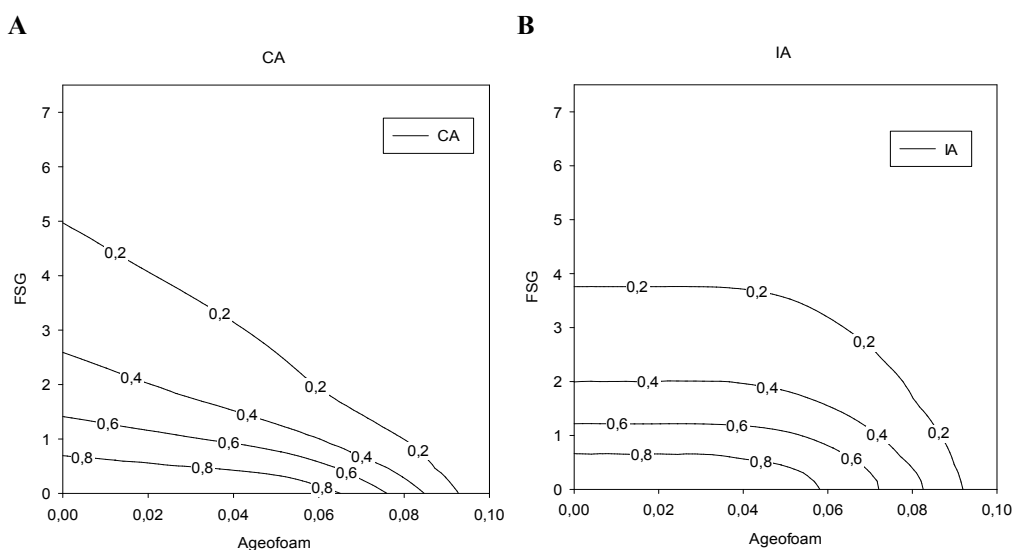


Figura 12 – Representação gráfica (2D) da exposição de *Daphnia similis* ao Ageofoam e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B).

4.2.1.3. Kidde Sintex 1%

Os respectivos resultados de CI_{50-48h} para Kidde Sintex 1% e FSG apresentaram valores de 0,21 e 2,16%. Os dados foram ajustados significativamente para os modelos IA e CA, porém apenas o modelo CA apresentou desvio para DR.

Os dados obtidos para o modelo CA foram: SS = 51,47; p valor = $1,10 \times 10^{-63}$ e valor de r^2 = 0,85; continuando a avaliação para os desvios, o padrão DR mostrou ser o melhor ajuste, os resultados foram: SS = 36,90; p valor = 0,02; r^2 = 0,89 e o parâmetro dos desvios $a = 1,15$ e $b = -0,13$. Em definição, o parâmetro $a > 0$ indica antagonismo, com exceção das proporções da mistura onde o parâmetro b negativo está indicando sinergismo. Esta definição sugere que as respostas dependem da composição da mistura, sendo que os efeitos podem ser antagônicos ou sinérgicos, dependendo das

combinações testadas. Nesse caso, os dados representam o antagonismo em geral, mas também é possível observar o sinergismo causado pelo Kidde Sintex 1% (Fig. 13).

Para o modelo IA, os resultados foram: uma soma de resíduos quadrados (SS) = 40,10; o nível de significância (valor p) = $3,90 \times 10^{-66}$ e o valor do coeficiente de regressão (r^2) = 0,88. Os dados foram significativamente ajustados ao modelo IA e nenhum desvio foi encontrado; nesse caso, representaram uma resposta de adição dos efeitos das substâncias isoladas.

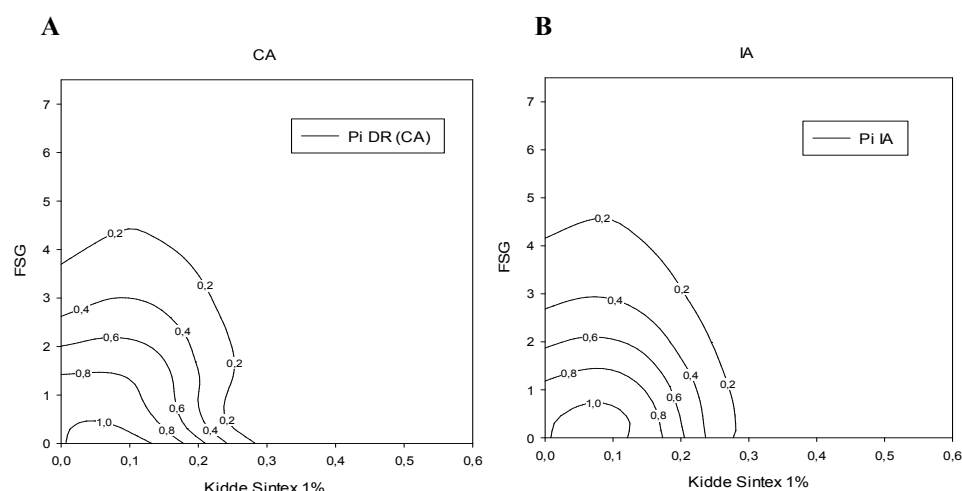


Figura 13 – Representação gráfica (2D) da exposição de *Daphnia similis* ao Kidde Sintex 1% e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e seus desvios; e Ação Independente - IA (B).

4.1.1. *Artemia* sp.

O ensaio com *Artemia* sp. apresentou sobrevivência média de 95% para os organismos no controle. Os gráficos (Fig. 14, 15 e 16) foram definidos com base em dados de concentrações de efeito calculados com a ferramenta MIXTOX, e mostram a projeção dos resultados das misturas de ambos os produtos químicos no sistema de teste, considerando os modelos CA e IA. O detalhamento dos resultados encontra-se no Apêndice VIII.

4.1.1.1. Cold Fire

Os valores de CL_{50-48h} para Cold Fire e FSG foram de 0,01 e 0,24% respectivamente. Os dados foram ajustados significativamente para os modelos IA e CA, para ambos os modelos ocorreu o ajuste no desvio DR, esses dados foram então comparados aos parâmetros de referência propostos por JONKER et al. (2005).

Para o modelo CA, os resultados foram: soma de resíduos quadrados (SS) = 170,85; nível de significância (valor p) = $2,49 \times 10^{-117}$ e o valor do coeficiente de regressão (r^2) = 0,76. Continuando a avaliação para encontrar os potenciais desvios, o padrão DR mostrou ser o melhor ajuste, e os seus resultados foram: SS = 62,94; p valor = $7,7 \times 10^{-08}$; r^2 = 0,91 e o parâmetro dos desvios $a = 4,73$ e $b = -10,08$.

Para o modelo IA, os resultados foram: SS = 184,34; p = $2,06 \times 10^{-114}$ e o valor do coeficiente de regressão (r^2) = 0,74, os dados foram também significativamente ajustados ao desvio DR, sendo os resultados: SS = 72,03; p = 1×10^{-09} ; r^2 = 0,90 e o parâmetro dos desvios $a = 9,22$ e $b = -35,18$.

Os parâmetros de referência do desvio DR $a > 0$ e $b < 0$, em definição nesse caso o parâmetro a indica antagonismo exceto quando o valor de b for negativo, o que ocorreu nesse caso. Ou seja, esta definição sugere que as respostas dependem da composição da mistura, podendo ser antagônicas ou sinérgicas, dependendo da proporção das combinações testadas. Nesse caso, os dados representam o antagonismo em geral, mas também é possível observar o sinergismo causado pelo químico Cold Fire (figura 14).

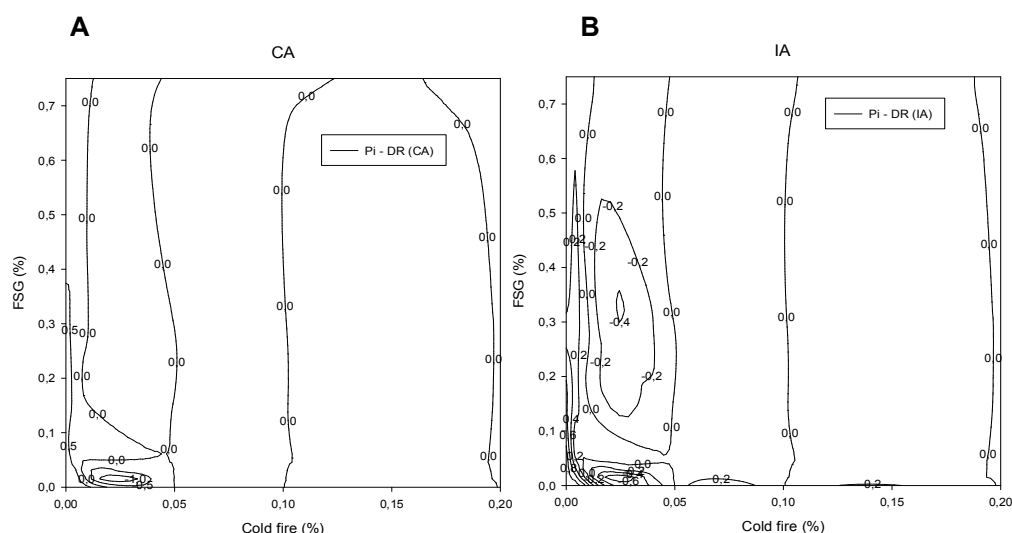


Figura 14 – Representação gráfica (2D) da exposição de *Artemia* sp. ao Cold Fire e a FSG em mistura binária, mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B) e seus desvios.

4.1.1.1. Ageofoam

As respectivas CL_{50-48h} estimadas para Ageofoam e FSG foram de 0,14 e 0,16%. Os dados foram ajustados significativamente para os modelos CA e IA, e para os dois modelos ocorreu ajuste no desvio DR e DL respectivamente.

Para o modelo CA, os resultados mostraram $SS = 80,75$; valor $p = 1,41 \times 10^{-166}$ e $r^2 = 0,90$. Nesse modelo, o desvio DR mostrou ser o melhor ajuste, com $SS = 60,70$; p valor $= 4,4 \times 10^{-05}$; $r^2 = 0,93$ e parâmetros dos desvios $a = 2,52$ e $b = -6,40$. O parâmetro de referência DR em definição indicou $a > 0$ e $b < 0$, nesse caso indicando antagonismo em geral, exceto pelo valor de b ter sido negativo, que pode indicar que em algumas concentrações do químico Ageofoam houve sinergismo (efeito mais severo). Ou seja, as respostas dependem da composição da mistura. Sendo assim, a análise desses dados refere que antagonismo é o padrão geral, mas também é possível observar o sinergismo causado pelo químico Ageofoam em baixas doses do composto, como demonstrado na figura 15.

Para o modelo IA, os resultados mostraram $SS = 98,85$; $p = 1,17 \times 10^{-162}$ e $r^2 = 0,88$, os dados foram significativamente ajustados para o desvio DL, apresentando resultados de $SS = 58,02$; $p = 0,0003$; $r^2 = 0,93$, com o parâmetro $a = -0,10$ e $b = -145,06$. O parâmetro a mostrou valor < 0 , esse resultado significa que o sinergismo pode ocorrer em baixos níveis da dose e o antagonismo pode ocorrer em níveis mais elevados; o parâmetro b também foi < 0 , neste caso os resultados significam que a magnitude do sinergismo ou antagonismo depende dos níveis de dose dos químicos. Sendo assim, o sinergismo pode ocorrer em baixas doses e o antagonismo em doses mais elevadas (Fig. 15). Assim, conforme LOUREIRO et al. (2010) relatam, a toxicidade depende de cada concentração química presente na mistura e da relação de dose dos compostos.

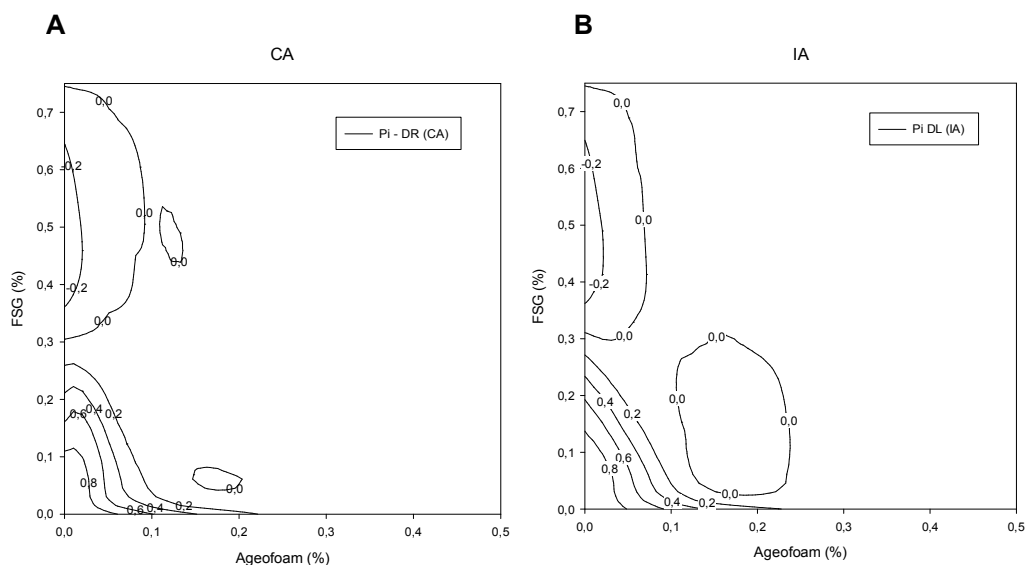


Figura 15 – Representação gráfica (2D) da exposição de *Artemia* sp. ao Ageofoam e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e Ação Independente - IA (B).

4.1.1.1. Kidde Sintex 1%

Por fim, para Kidde Sintex 1% e FSG, os resultados das CL_{50-48h} apresentaram valores de 0,13 e 0,15% respectivamente. Os dados foram significativamente ajustados para os modelos IA e CA, para ambos ocorreu o ajuste no desvio DR.

Para o modelo CA, os resultados foram $SS = 105,73$; valor $p = 1,49 \times 10^{-159}$ e $r^2 = 0,87$. Para esse modelo, o desvio DR apresentou o melhor ajuste dos dados, com $SS = 88,85$; p valor $= 0,0002$; $r^2 = 0,89$, com o parâmetro dos desvios $a = 4,21$ e $b = -8,10$.

Para o modelo IA, os resultados foram: $SS = 105,78$; $p = 1,53 \times 10^{-159}$ e o valor do coeficiente de regressão (r^2) $= 0,87$. Ainda, os dados foram significativamente ajustados ao desvio DR, os resultados foram $SS = 82,37$; $p = 8,2 \times 10^{-06}$; $r^2 = 0,90$ e os parâmetros $a = 4,82$ e $b = -12,93$.

Para os dois modelos matemáticos, o desvio que melhor se ajustou foi o DR com $a > 0$ e $b < 0$. Nesses casos, indicando antagonismo para o parâmetro a , porém com o valor de $b < 0$, a mistura Kidde Sintex 1% apresentou sinergismo. Ou seja, esta definição refere que as respostas são dependentes da composição da mistura, sendo que os efeitos foram antagonísticos ou sinérgicos, dependendo das combinações testadas. Nesse caso, os dados representam o antagonismo em geral, mas também é possível observar o sinergismo causado pelo Kidde Sintex 1% (Fig.16).

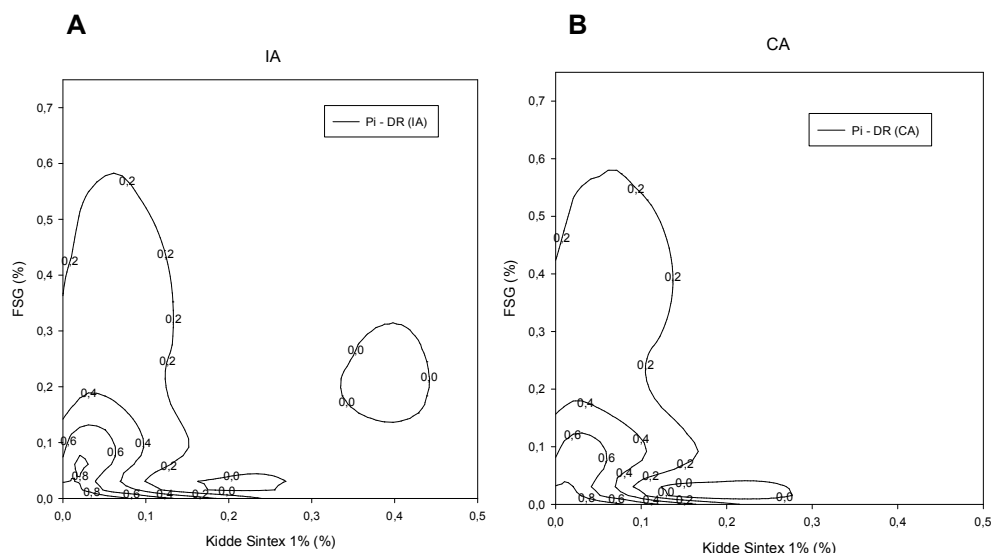


Figura 16 – Representação gráfica (2D) da exposição de *Artemia* sp. ao Kidde Sintex 1% e a FSG em mistura binária mostrando um ajuste aos Modelos de Concentração - CA (A) e seus desvios; e Ação Independente - IA (B).

4.3. DISCUSSÃO

Os AEI são produzidos especificamente para o combate a incêndios, por esse motivo possuem uma série de substâncias químicas presentes em suas formulações a fim de auxiliar na supressão do fogo. Embora não haja informações claras sobre a toxicocinética das formulações vendidas comercialmente, a interação não-alvo desses compostos com a biota presente nos ecossistemas pode causar o aparecimento de químicos como os PFC em células sanguíneas de diversos animais, inclusive em seres humanos (GIESY; KANNAN 2001; SOLLA et al., 2012; WEIß et al., 2012; TOMS et al., 2014). Alguns estudos relatam que a presença desses compostos pode afetar a comunicação celular, a geração de energia, o transporte de membrana e causar a proliferação peroxissômica (SOHLENIUS et al., 1993; UPHAM et al., 1998).

Em relação aos combustíveis provenientes do refinamento do petróleo, alguns estudos indicam que as substâncias presentes na gasolina, sobretudo em sua parte solúvel, podem acarretar em alterações enzimáticas (BETTINI, et al., 2016), danos ao material genético (FEDATO et al., 2010), atuando também em alterações fisiológicas, por apresentar um papel como um disruptor endócrino (BOLDEN et al., 2015).

Tendo como base que para muitas substâncias químicas o verdadeiro mecanismo toxicológico raramente é reconhecido em uma determinada mistura ou mesmo por grande parte de seus componentes (GROTE et al., 2001), o conhecimento

em relação ao modo de ação torna-se desconhecido ou incompleto aos organismos. Conforme as informações obtidas na literatura referente aos químicos utilizados nesse estudo, há um indicativo de que essas substâncias tenham MoA diferentes.

Segundo a EFSA (2014), é aconselhável a utilização do modelo de referência CA por ser considerado mais conservativo para explicar a mistura de compostos. No entanto, LOUREIRO et al. (2010) sugerem utilizar os dois modelos de referência (CA e IA) em casos de incertezas quanto aos MoA dos químicos. Levando em consideração os resultados obtidos para ambos os modelos de referência, é possível aceitar que tanto o modelo CA quanto o IA podem explicar os dados de misturas gerados nesse estudo. Por esse motivo, para alcançar uma maior estimativa do risco do uso dessas substâncias, nesse estudo optou-se por utilizar ambos os modelos de referência.

Respostas de interações sobre a gasolina e os AEI representam uma lacuna de dados publicados na literatura. Ainda assim, MONTAGNOLLI et al. (2017) conduziram um estudo para análise da interação dos hidrocarbonetos BTEX juntamente com PFC, utilizando como abordagem a biodegradação. Os resultados mostraram que esses compostos podem promover alterações nos padrões de degradação microbiológica dos BTEX, o que pode implicar na redução da capacidade de biodegradação e consequentemente, esses compostos químicos permanecerem por períodos ainda mais longos no meio ambiente por conta dessa interação.

Os dados obtidos sobre os efeitos da interação dos AEI com a FSG aos organismos aquáticos *D. similis* e *Artemia* sp. trouxeram respostas muito importantes, que podem ser esclarecedores sobre a interação desses compostos no ambiente, como no impacto ambiental ocorrido no grave incêndio na região portuária de Santos (Fig. 17). Já que como observado, essa interação indicou uma possível redução potencial da toxicidade em determinadas situações e aumento na maioria dos casos nas combinações avaliadas.

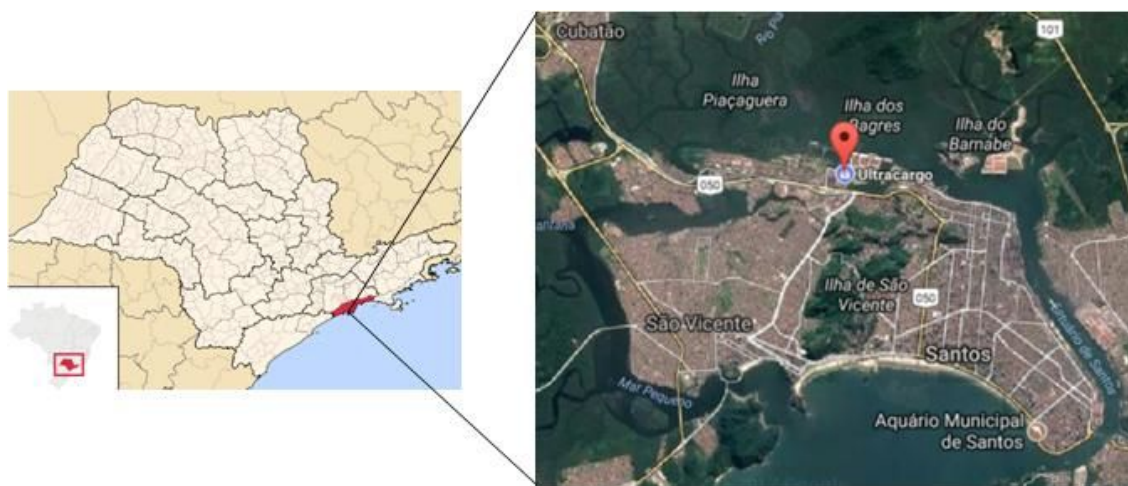


Figura 17– Localização da região de Santos-São Vicente e o Sistema Estuarino. Fonte: Google maps.

Como agravante ao acidente em questão, este ocorreu no Sistema Estuarino de Santos, incluindo o ecossistema manguezal. Esse ecossistema é conhecido por possuir um alto aporte de animais em estágios de vida iniciais, que se destaca por ser um ambiente costeiro de alta complexidade e vulnerabilidade (MIRANDA et al., 2002).

Em virtude da alta densidade demográfica encontrada próximo ao SES, da presença de diversas indústrias e do maior porto da América Latina, essa região tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, pois esse ambiente apresenta elevada atividade antrópica, com vasto histórico de poluição ambiental que antecede ao incêndio. De modo que estudos relatam os impactos causados pelo aporte constantes de resíduos e efluentes contaminados, provocando assim um quadro de degradação ambiental (CETESB, 2001; ABESSA et al., 2008). Dessa forma o incêndio em questão agravou, ao menos temporariamente, a situação da qualidade ambiental do SES, pelo descarte de grandes quantidades de substâncias altamente tóxicas.

Levando em conta de que raramente os contaminantes ocorrem de forma isolada no ambiente, como exposto, no caso dos AEI e hidrocarbonetos ocorrerem simultaneamente no ambiente, os impactos nos ecossistemas poderão ser potencializados. Além disso, ainda que acidentes desse tipo sejam relativamente pouco frequentes, incêndios e explosões fazem parte considerável da estatística de acidentes no setor petroquímico (CHANG; LIN 2006), nesses casos, o uso de aditivos químicos como os LGE e IT é requerido, devido à gravidade dessas ocorrências com consequentes danos ambientais.

Especialmente ao se tratar do terminal portuário de Santos, em que nos últimos cinco anos foram relatados variados episódios de incêndios, associado à mortandade de

diversas espécies de animais (GURJÃO; JOVITO, 2016). A possibilidade de uso dos LGE e IT para o combate a esses incêndios é considerada, nesse sentido, produzir conhecimentos sobre as composições químicas das formulações comerciais, assim como dados ecotoxicológicos e de risco ambiental tornam-se importantes, não só para a avaliação de impactos, bem como para subsidiar as formulações e regras adequadas de uso desses compostos, e o desenvolvimento de produtos menos tóxicos atrelado a eficiência no controle a emergências ambientais.

Portanto, os experimentos forneceram algumas informações relevantes sobre a predição do comportamento desses compostos em misturas. As diferentes marcas apresentaram tanto a redução da toxicidade bem como o seu aumento, em relação aos resultados esperados após a interação com a FSG, tanto para *D. similis* quanto para *Artemia* sp.

4.4. CONCLUSÃO

- ✓ Para o organismo dulcícola *D. similis* o sinergismo foi o principal padrão observado na mistura do IT Cold Fire e a FSG tanto para CA quanto para IA;
- ✓ O LGE - AFFF Ageofoam mostrou-se ajustado a ambos os modelos de referência IA e CA, apresentando efeitos aditivos quando combinado com a FSG;
- ✓ Para as misturas de Kidde Sintex 1% com FSG, os efeitos foram antagônicos ou sinérgicos, dependendo das concentrações das combinações testadas.

- ✓ Já os resultados para *Artemia* sp. com a mistura entre Cold Fire e a FSG, houveram efeitos antagônicos em geral, mas também foi possível observar o sinergismo em algumas concentrações tanto para CA quanto para IA;
- ✓ A mistura entre FSG e LGE - AFFF Ageofoam mostrou toxicidade ajustada para o modelo CA apresentando o antagonismo em geral e o sinergismo em algumas situações, e para o modelo IA apresentando sinergismo quando em baixas doses e o antagonismo em doses mais elevadas;
- ✓ Para Kidde Sintex 1% com FSG, os efeitos foram também antagônicos ou sinérgicos, dependendo das concentrações das combinações testadas tanto para CA quanto para IA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aporte de combustíveis líquidos e de substâncias utilizadas para inibir a formação de chamas é comum em treinamentos e acidentes, porém os efeitos de tais aportes para o ambiente são pouco conhecidos. O presente estudo forneceu evidências sobre o risco do despejo in natura dos Líquidos Geradores de Espumas (LGE), Isolantes Térmicos (IT) e Gasolina nos ecossistemas, destacando-se o papel dos LGE e dos IT, pois esses compostos causaram elevada toxicidade aos organismos aquáticos. Além disso, a exposição à fração solúvel da gasolina (FSG), com seus consequentes efeitos tóxicos nos organismos aquáticos, também foi destacada, de modo que a FSG também deve ser considerada como um importante contaminante ambiental, capaz de causar efeitos adversos para a biota aquática.

Os resultados mostraram também os riscos potenciais advindos da exposição combinada a Agentes Extintores de Incêndios e Fração Solúvel da Gasolina, tendo sido demonstrado que a interação gerou, em certas situações, a potencialização de toxicidade, trazendo riscos aos ecossistemas.

Por tratar-se de substâncias com importante utilização em situações de emergência, é necessário levar em consideração a relação de eficiência das formulações comerciais atrelada aos potenciais efeitos adversos aos organismos aquáticos. Portanto, para auxiliar na tomada de decisão do uso desses compostos do ponto de vista ecotoxicológico, inicialmente para o combate aos incêndios, poderia ser considerado o uso de formulações que apresentaram menor toxicidade aos organismos. Em adição, durante ações de emergência, é desejável a adoção de medidas de contenção e captação desses produtos antes de chegarem ao ambiente, se possível permitindo o encaminhamento das substâncias para algum tipo de tratamento posterior, de modo a evitar ou mitigar os impactos ambientais.

Além disso, mais estudos fazem-se necessários, visando avaliar misturas complexas contendo três ou mais formulações, pois em geral as ações de combate ao fogo acabam utilizando diferentes tipos de agentes, de marcas, composições e toxicidades diferentes, levando a uma situação complexa de contaminação ambiental.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; SOUSA, E.C.P.M.; RACHID, B. R. F.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; PINTO, Y. A.; BÍCEGO, M. C.; HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E.; MUNIZ, P. 2008. Integrative Ecotoxicological Assessment of Contaminated Sediments in a Complex Tropical Estuarine System. In: T. N. Hofer (Ed.), *Marine Pollution: New Research: Nova Science Publishers* p. 125-312.
- ABNT NBR 15350 (2012). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração –Método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata: Echinoidea).
- ABNT NBR 16530 (2016a) - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda
Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustacea, Brachiopoda).
- ABNT NBR 12713 (2016b) Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Aguda
Método de Ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera).
- ANDERSON, J.W.; NEFF, J.M.; COX, B.A.; TATEM, H.E.; & HIGHTOWER, G.M. (1974). Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine biology*, 27(1), 75-88.
- ARAGÃO, M.A; ARAÚJO, R.P.A(2008) Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. 2 ed., São Carlos: RiMa Editora. 486p. 2008.
- ASTM (1980) Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. (Unpublished Rep. E-729- 90). American Standards for Testing and Materials. Philadelphia
- AWAD, E.; ZHANG, X.; BHAVSAR, S.P.; PETRO, S.; CROZIER, P.W.; REINER, E.J.; FLETCHER, R.; TITTELMIER, S.A.; BRAEKEVELT, E. (2011). Long-term environmental fate of perfluorinated compounds after accidental release at Toronto airport. *Environmental Science & Technology*. 45 (19), 8081-8089.
- BACKE, W. J.; DAY, T. C.; FIELD J. A. (2013) Zwitterionic, Cationic, and Anionic Fluorinated Chemicals in Aqueous Film Forming Foam Formulations and Groundwater from U.S. Military Bases by Non-aqueous Large-Volume Injection HPLC-MS/MS. *Environmental Science and Technology*, 47 (10), 5226-5234.
- BADUEL, C., MUELLER, J. F., ROTANDER, A., CORFIELD, J., GOMEZ-RAMOS, M. J. (2017). Discovery of novel per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) at a fire fighting training ground and preliminary investigation of their fate and mobility. *Chemosphere*, 185, 1030-1038.
- BETTIM, F. L., GALVAN, G. L., CESTARI, M. M., YAMAMOTO, C. I., & DE ASSIS, H. C. S. (2016). Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere*, 144, 1467-1474.

- BOLDEN, A. L., KWIATKOWSKI, C. F., & COLBORN, T. (2015). New look at BTEX: are ambient levels a problem?. *Environmental science and technology*, 49 (9), 5261-5276.
- BOULTON, A.J.; MOSS, G.L.; SMITHYMAN, D. (2003) Short-term effects of aerially-applied fire-suppressant foams on water chemistry and macroinvertebrates in streams after natural wild-fire on Kangaroo Island, South Australia. *Hydrobiologia*, 498(1-3), 177-189.
- BLISS, C. I. (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, 26 (3), 585-615.
- BRASIL. Lei Federal nº 430, de 13 de maio de 2011. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Visualizado em 12/05/2015.
- BRASIL – Presidência da República (2000). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=366>. Acessado em: 27/01/2018.
- BRASIL – Presidência da República (2012). Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4136.htm. Acessado em: 15/01/2018.
- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Visualizado em 12/05/2015.
- BOUDREAU, T.M., SIBLEY, P.K., MABURY, S.A., MUIR, D.G.C., SOLOMON, K.R.(2003) laboratory Evaluation of the Toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *aphnia magna*, and *Daphnia pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, (44), 307–313.
- BOURGEOIS, A.; BERGENDAHL, J.; RANGWALA, A. (2015) Biodegradability of fluorinated fire-fighting foams in water. *Chemosphere*, (131), 104-109.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2001). Sistema Estuarino Santos-São Vicente. Relatório técnico.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2016). Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/blog/2016/03/18/ultracargo-paga-16-milhoes-de-multa-por-danos-ambientais/>. Acessado em: 24/10/2016.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2017) Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/emergencia/relatorio.php>. Visualizado em: 03/02/2017.

- CFTB – Cold Fire Technical Book (2017). Disponível em: <http://www.firefreeze.com/wp-content/uploads/2017/03/Cold-Fire-Technical-Book>. Acessado em: 04/12/2017.
- CHANG, J. I., & LIN, C. C. (2006). A study of storage tank accidents. *Journal of loss prevention in the process industries*, 19(1), 51-59.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (2000) Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=271>. Acessado em: 20/12/2017.
- CORSEUIL, H. X., & FERNANDES, M. (1999). Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, 4(1), 71-75.
- CUTTER, S. L., & JI, M. (1997). Trends in US hazardous materials transportation spills. *The Professional Geographer*, 49(3), 318-331.
- DOMINGUES, D.F; BERTOLETTI, E. (2008) Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. 2 ed., São Carlos: RiMa Editora. 486p. 2008.
- EFSA – European Food Safety Authority (2014). Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-784>. Visualizado em: 23/02/2018.
- FEDATO, R.P.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700 (1), 80-85.
- FIGUEREDO, L.P., NILIN, J., DA SILVA, A.Q., DAMASCENO, É.P., LOUREIRO, S., & COSTA-LOTUFO, L.V. (2016). Zinc and nickel binary mixtures act additively on the tropical mysid *Mysidopsis juniae*. *Marine and Fresh water Research*, 67 (3), 301-308.
- FIGUEREDO, R. C., RIBEIRO, F. A., & SABADINI, E. (1999). Ciência de espumas - aplicação na extinção de incêndios. *Química Nova*, 22 (1), 126-130.
- GALVAN, G. L. *Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores*. Curitiba, 2015. 194-p. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação) – Programa de Pós-Graduação em ecologia e conservação, Universidade Federal do Paraná.
- GIESY J.P.; KANNAN K 2001 Global distribution of perfluorooctane sulfonate and related compounds in wildlife. *Environmental Science and Technology* (35), 1339–1342.

- GIRLING, A. E., MARKARIAN, R. K., & BENNETT, D. (1992). Aquatic toxicity testing of oil products-some recommendations. *Chemosphere*, 24(10), 1469-1472.
- GROTEN, J. P. 2000. Mixtures and interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 38, S65-S71.
- GROTEN, J. P., FERON, V. J., & SÜHNEL, J. (2001). Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in pharmacological sciences*, 22(6), 316-322.
- GULKOWSKA, A.; JIANG, Q.; SO, M.K.; TANIYASU, S.; LAM, P.K.; YAMASHITA, N. (2006) Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China. *Environmental Science and Technology*, 40(12), 3736-3741.
- GUNSTER, D. G., GILLIS, C. A., BONNEVIE, N. L., ABEL, T. B., & WENNING, R. J. (1993). Petroleum and hazardous chemical spills in Newark Bay, New Jersey, USA from 1982 to 1991. *Environmental Pollution*, 82 (3), 245-253.
- GURJÃO, H; JOVITO, M. (2016) - Cooperaportos Ambiental Contingências Ambientais – GT ABEPH – Os novos procedimentos do Porto de Santos. Disponível em: <http://portal.antaq.gov.br/wp-content/uploads/2016/12/Plano-de-Aux%C3%ADlio-M%C3%BAtu%E2%80%93PAM.pdf>. Acessado: 30/02/2018.
- HCT – Hazard Control Technologies (2013). Disponível em: http://www.hct-world.com/wpcontent/uploads/2013/08/Standard%20Operating%20Guidelines/SOG_F5_AM_00-F-500%20SOG%20Manual_V2. Acessado em: 22/11/2017.
- HAGENAARS, A., MEYER, I. J., HERZKE, D., PARDO, B. G., MARTINEZ, P., PABON, M., & KNAPEN, D. (2011). The search for alternative aqueous film forming foams (AFFF) with a low environmental impact: Physiological and transcriptomic effects of two Forafac® fluorosurfactants in turbot. *Aquatic toxicology*, 104(3), 168-176.
- HAN, J., & FANG, Z. (2010). Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in ovoviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquatic toxicology*, 99(2), 281-290.
- HUANG, H., HUANG, C., WANG, L., YE, X., BAI, C., SIMONICH, M. T., & DONG, Q. (2010). Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctane sulphonic acid (PFOS). *Aquatic Toxicology*, 98(2), 139-147.
- KANNAN K.; KOISTENEN J.; BECKMAN K.; EVANS T.; GORZELANY J.; JONES P.D.; GIESY J.P. (2001) Accumulation of Perfluorooctane Sulfonate in Marine Mammals. *Environmental Science and Technology* 35(8):1593–1598.

- IMO – International Maritime Organization (1973). Disponível em: [http://www.imo.org/en/about/conventions/listofconventions/pages/international-convention-for-the-prevention-of-pollution-from-ships-\(marpol\).aspx](http://www.imo.org/en/about/conventions/listofconventions/pages/international-convention-for-the-prevention-of-pollution-from-ships-(marpol).aspx). Acessado em: 15/01/2018.
- JONKER, MJ.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, JJM.; BONGERS M.; KAMMENG A. JE. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:2701–2713.
- KANNAN K.; KOISTENEN J.; BECKMAN K.; EVANS T.; GORZELANY J.; JONES P.D.; GIESY J.P. (2001) Accumulation of Perfluorooctane Sulfonate in Marine Mammals. *Environ Sci Technol* 35 (8):1593–1598.
- KHAN, F. I., & ABBASI, S. A. (1999). Major accidents in process industries and an analysis of causes and consequences. *Journal of Loss Prevention in the process Industries*, 12 (5), 361-378.
- KEY, B. D., HOWELL, R. D., & CRIDDLE, C. S. (1997). Fluorinated organics in the biosphere. *Environmental science & technology*, 31(9), 2445-2454.
- KISHI, T.; ARAI, M. (2008) Study on the generation of perfluorooctane sulfonate from the aqueous film-forming foam. *Journal of Hazardous Materials*, 159 (1), 81–86.
- LEE, R. F.; PAGE, D. S. (1997). Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 34(11), 928-940.
- LOEWE, S., & MUISCHNEK, H. (1926). Über Kombinationswirkungen [On Combination Effects]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 114 (5), 313–326.
- LOUREIRO, S., SVENDSEN, C., FERREIRA, A.L., PINHEIRO, C., RIBEIRO, F., & SOARES, A.M. (2010). Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (8), 1716-1726.
- LA FARRE, M., PÉREZ, S., KANTIANI, L., & BARCELÓ, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (11), 991-1007.
- MARTINS, R. (2015). Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/santos-regiao/noticia/2015/04/apos-fogo-diminuir-novo-vazamento-aumenta-chamas-e-incendio-continua.html>. Acessado em: 30/04/2016.
- MCDONALD, S. F., HAMILTON, S. J., BUHL, K. J., & HEISINGER, J. F. (1997). Acute toxicity of fire retardant and foam suppressant chemicals to *Hyalomma azteca* (Saussure). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(7), 1370-1376.

- MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M.; KJERFVE, B.. *In: Principios de oceanografia física de estuários*. São Paulo: EDUSP, 2002.
- MOHAMMED, A. (2005) Toxicity of water-soluble fractions of four fuels for *Metamysidopsis insularis*, an indigenous tropical mysid species. *Environmental monitoring and assessment*, 104 (1), 37-44.
- MONTAGNOLLI, R.N. *Incêndios de petróleo e pretoquímicos: biorremediação de áreas afetadas*. Rio Claro, 2015. 267-p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Unesp.
- MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M., CRUZ, J.M., CLARO, E.M.T., QUITERIO, G. M., & BIDOIA, E.D. (2017). Metabolical shifts towards alternative BTEX biodegradation intermediates induced by perfluorinated compounds in firefighting foams. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 173, 49-60.
- MOODY, C.A.; FIELD, J.A. (2000) Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environmental science & technology*, 34 (18), 3864-3870.
- MURRAY, D. A., LOCKHART, W. L., & WEBSTER, G. R. B. (1984). Analysis of the water-soluble fraction of crude oils and petroleum products by gas chromatography. *Oil and Petrochemical Pollution*, 2(1), 39-46.
- NAVAS, J. M., BABÍN, M., CASADO, S., FERNÁNDEZ, C., & TARAZONA, J. V. (2006). The Prestige oil spill: a laboratory study about the toxicity of the water-soluble fraction of the fuel oil. *Marine environmental research*, (62), S352-S355.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals (2004) *Daphnia* sp. Acute Immobilization test.
- PAVLAKI, M. D., PEREIRA, R., LOUREIRO, S., & SOARES, A. M. (2011). Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74 (1), 99-110.
- PÉREZ, J., DOMINGUES, I., SOARES, A. M., & LOUREIRO, S. (2011). Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. *Ecotoxicology*, 20(6), 1167-1175.
- PESTANA, C.R.; BORGES, K.B.; FONSECA, P.D.; OLIVEIRA, D.P.D. (2008) Risco ambiental da aplicação de éteres de difenilas polibromadas como retardantes de chama. *Revista Brasileira de Toxicologia*, (21), 41-8.
- PETERSON, D. R. (1994). Calculating the aquatic toxicity of hydrocarbon mixtures. *Chemosphere*, 29(12), 2493-2506.

- PLACE, B. J., & FIELD, J. A. (2012). Identification of novel fluorochemicals in aqueous film-forming foams used by the US military. *Environmental science & technology*, 46(13), 7120-7127.
- POFFO, I. R. F., XAVIER, J. C. D. M., & SERPA, R. R. (2001). 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.
- PRÓSPERI, V.A.; ARAÚJO, M.M.S. (2002) Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck, 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. *Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda, p. 99-110.
- RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. 2ed, Nova York: Taylor & Francis, 1995. p. 3 - 28.
- RODRIGUES, R. V., MIRANDA-FILHO, K. C., GUSMÃO, E. P., MOREIRA, C. B., ROMANO, L. A., & SAMPAIO, L. A. (2010). Deleterious effects of water soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Science of the Total Environment*, 408 (9), 2054-2059.
- ROTINI, A., MANFRA, L., CANEPA, S., TORNAMBÈ, A., MIGLIORE, L. (2015). Can Artemia hatching assay be a (sensitive) alternative tool to acute toxicity test?. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 95(6), 745-751.
- ROTUNDO, M.M.; LARANJEIRA, M.E; CARDOSO, G.S.; GAMA, L.M.; SOUZA, U.P.; FERREIRA, F.C.; BARRELLA, W.; RAMIRES, M; CLAUZET, M; PETRERE JÚNIOR, M. (2015) Incêndio na área portuária de Santos (SP): impacto sobre a diversidade de peixes. In: Anais XII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, São Lourenço, MG 2015.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. 7 ed., São Paulo: Roca, 2005. 1168 p.
- SAFETY DATA SHEET (2007) Based on Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH) Article 31.
- SALAZAR, S. M. (1985). *Toxicity of Aqueous Film forming Foams to Marine Organisms: Literature Review and Biological Assessment* (No. NOSC/TD-825). NAVAL OCEAN SYSTEMS CENTER SAN DIEGO CA.
- SAP – Sistema Ambiental Paulista (2015). Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/cetesb-multa-ultracargo-em-mais-de-22-milhoes-pelo-incendio-no-terminal-da-alemoa/>. Acessado em: 14/10/2017.

- SARDQVIST, S., (2002) *Water and Other Extinguishing Agents*, 4^aed. Swedish Rescue Services Agency Karlstad.
- SILVA, A. R. R., CARDOSO, D. N., CRUZ, A., LOURENÇO, J., MENDO, S., SOARES, A. M., & LOUREIRO, S. (2015). Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 115, 279-290.
- SIMONATO, J. D., FERNANDES, M. N., & MARTINEZ, C. B. (2013). Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*, 11 (3), 683-691.
- SOARES-GOMES, A.; NEVES, R.L.; AUCÉLIO, R.; VAN DER VEN, P.H.; PITOMBO, F.B.; MENDES, C.L.; ZIOLLI, R.L. (2010). Changes and variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in fish, barnacles and crabs following an oil spill in a mangrove of Guanabara Bay, Southeast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 1359-1363.
- SOHLENIUS, A.-K.; ERIKSSON, A.M.; HÖGSTRÖM, C.; KIMLAND, M.; DEPIERRE, J. W. (1993) *Pharmacology and Toxicology*. 72, 90-93.
- SOLLA, S.R.; SILVA, A.O.; LETCHER, R.J. (2012) Highly elevated levels of perfluorooctane sulfonate and other perfluorinated acids found in biota and surface water downstream of an international airport, Hamilton, Ontario, Canada. *Environment international*, 39(1), 19-26.
- SONTAKE, A.R.; WAGH, S.M. (2014) The Phase-out of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and the Global Future of Aqueous Film Forming Foam (AFFF), Innovations in Fire Fighting Foam. *Chemical Engineering and Science*, 2(1), 11-14.
- SOUSA, E.C.P. Toxicologia Marinha: Histórico. in: NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.; NIPPER, M. G. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: aplicações no Brasil*. Salvador: Artes Gráficas e Indústria Ltda, 2002. p. 9-12.
- SUJA, F.; PRAMANIK, B.K.; ZAIN, S.M. (2009) Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: areview paper. *Water Science and Technology*, 60 (6), 1533 - 1544.
- TOMS, L. M., THOMPSON, J., ROTANDER, A., HOBSON, P., CALAFAT, A. M., KATO, K., ... & MUELLER, J. F. (2014). Decline in perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate serum concentrations in an Australian population from 2002 to 2011. *Environment international*, 71, 74-80.
- UPHAM, B. L.; DEOCAMPO, N. D.; WURL, B.; TROSKO, J. E. (1998) *International Journal of Cancer*. 78, 491-495.
- VEIGA, L.F.; VITAL, N. (2002) Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp.. In: Nascimento IA, Souza ECPM, Nipper M. Métodos de

ecotoxicologia marinha. *Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas e Industria Ltda, p. 111-22.

VERDOUW, H., VAN ECHTELD, C.J.A., DEKKERS, E.M.J., (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12, 399–402.

VICENTINI, R.A. (2015) Disponível em: <https://www.portogente.com.br/noticias/meio-ambiente/85698-o-outro-lado-do-incendio-da-ultracargo>. Acessado em: 05/02/2016.

WEIß, O., WIESMÜLLER, G. A., BUNTE, A., GÖEN, T., SCHMIDT, C. K., WILHELM, M., & HÖLZER, J. (2012). Perfluorinated compounds in the vicinity of a fire training area–human biomonitoring among 10 persons drinking water from contaminated private wells in Cologne, Germany. *International journal of hygiene and environmental health*, 215(2), 212-215.

Apêndice I- Parâmetros físico-químicos dos ensaios isolados com AEI e FSG para *Echinometra lucunter*.

Parâmetros	Concentrações (%) - Argus Prime					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,09/7,53	7,25/7,54	7,20/7,49	7,27/7,21	7,34/7,23
OD (mg/L)	6,4/5,5	6,4/5,4	6,3/5,3	5,8/5,3	5,7/5,1	5,6/4,9
Salinidade	35/34	33/33	34/33	34/33	34/33	34/34
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,01/<LD	0,07/<LD	0,01/<LD	0,09/0,00	0,03/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Ageofoam					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	6,95/7,43	6,89/7,49	7,35/7,43	7,40/7,30	7,51/7,20
OD (mg/L)	6,4/5,5	6,1/5,3	6,0/5,6	5,9/5,2	5,8/5,2	5,9/4,7
Salinidade	35/34	33/33	34/35	34/34	34/35	33/34
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,07/0,92	0,06/0,10	0,06/<LD	0,01/<LD	0,15/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Coldfire					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,65/7,50	7,56/7,54	7,50/7,44	7,64/7,55	7,53/7,38
OD (mg/L)	6,4/5,5	5,7/5,4	5,7/5,7	5,6/5,2	5,2/5,5	5,0/5,5
Salinidade	35/34	33/34	33/34	33/33	34/34	33/33
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,03/<LD	0,00/<LD	0,09/<LD	0,01/<LD	0,16/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) – Kidde Sintex 1%					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,49/7,55	7,43/7,78	7,46/7,39	7,46/7,28	7,48/7,25
OD (mg/L)	6,4/5,5	4,8/5,9	5,2/5,7	5,2/5,3	5,2/5,0	5,0/5,2
Salinidade	35/34	33/34	33/34	33/33	33/33	33/33
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,14/<LD	<LD/<LD	0,15/<LD	<LD/<LD	0,09/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) – Kidde Sintex 3%					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,54/7,86	7,55/7,49	7,53/7,43	7,27/7,24	7,60/7,22
OD (mg/L)	6,4/5,5	5,4/5,5	5,0/5,5	5,0/5,2	5,2/5,0	4,9/4,7
Salinidade	35/34	33/33	33/33	33/34	33/34	34/34
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	<LD/<LD	0,16/<LD	0,00/<LD	0,05/<LD	0,01/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Liovac					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,55/7,45	7,58/7,40	7,56/7,35	7,70/7,30	7,53/7,19
OD (mg/L)	6,4/5,5	5,5/5,4	4,8/5,5	4,7/5,2	4,9/5,2	4,8/4,8
Salinidade	35/34	34/34	33/33	33/34	33/34	33/34
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,17/<LD	0,02/<LD	0,20/<LD	0,19/0,01	0,38/0,09

Parâmetros	Concentrações (%) – F500					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,58/7,45	7,52/7,44	7,57/7,66	7,49/7,27	7,23/7,11
OD (mg/L)	6,4/5,5	5,3/5,3	5,2/5,4	5,1/5,5	5,0/5,2	5,0/5,0
Salinidade	35/34	34/34	34/34	33/34	34/34	34/35
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,01/0,30	0,16/<LD	0,02/<LD	0,39/<LD	0,32/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Unknow					
	Controle	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05
pH	7,31/7,62	7,69/7,47	7,61/7,42	7,58/7,38	7,56/7,23	7,60/7,70
OD (mg/L)	6,4/5,5	5,2/5,5	5,2/5,4	5,0/5,3	5,2/4,9	5,1/5,1
Salinidade	35/34	34/35	34/35	34/35	34/33	34/35
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,09/<LD	0,12/<LD	<LD/<LD	0,18/<LD	0,12/<LD	0,18/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - FSG					
	Controle	0,005	0,025	0,05	0,25	0,50
pH	7,79/7,81	7,87/7,87	7,89/7,86	7,73/7,69	7,90/7,51	7,86/7,85
OD (mg/L)	7,5/6,4	7,2/5,8	7,2/5,5	7,4/5,2	7,5/5,1	7,4/5,0
Salinidade	34/34	34/34	34/34	34/34	34/34	34/34
Amônia NH ₃ (mg/L)	<LD/<LD	0,34/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	0,67/<LD	0,16/<LD

(/) = Delimita inicial e final; <LD = Valor inferior ao limite de detecção.

Apêndice II - Parâmetros físico-químicos dos ensaios isolados com AEI e FSG para *Artemia* sp..

Parâmetros	Concentrações (%) – Argus Prime					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	6,77/ 7,05	7,07/ 6,99	7,32/ 7,50	7,29/ 7,41	7,40/ 7,38	7,46/ 7,33
OD (mg/L)	8,1/ 6,7	7,9/ 5,6	7,7/ 6,0	7,7/ 5,9	7,5/ 6,2	7,2/ 5,9
Salinidade	34/ 34	34/ 35	34/ 34	34/ 34	33/ 33	33/ 33
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,00/ 0,00	0,00/ 0,00	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Ageofoam					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	6,77/ 7,05	7,43/ 7,50	7,51/ 7,52	7,57/ 7,50	7,57/ 7,48	7,60/ 7,55
OD (mg/L)	8,1/ 6,7	8,1/ 6,2	8,0/ 5,4	7,8/ 5,2	7,7/ 6,1	7,7/ 6,2
Salinidade	34/ 34	35/ 35	35/ 35	34/35	33/ 33	33/ 33
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,00/ 0,00	0,00/0,00	0,00/0,00	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Coldfire					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	7,07/ 7,20	7,48/ 7,25	7,57/ 7,44	7,68/ 7,50	7,73/ 7,51	7,79/ 7,61
OD (mg/L)	6,5/ 6,2	6,1/ 5,9	6,2/ 6,0	6,0/ 5,9	6,0/ 5,9	5,7/ 5,5
Salinidade	34/ 34	34/ 34	34/ 34	34/ 34	33/ 33	32/ 32
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,00/ <LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) – Kidde Sintex 1%					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	7,36/ 7,05	7,37/ 7,35	7,40/ 7,40	7,37/ 7,34	7,39/ 7,30	7,41/ 7,27
OD (mg/L)	7,6/ 5,8	6,5/ 6,1	6,8/ 6,3	6,5/ 5,8	6,3/5,9	6,4/ 5,7
Salinidade	35/ 35	35/ 35	35/ 35	35/ 35	34/ 35	34/ 34
Amônia NH ₃ (mg/L)	<LD/ 0,00	0,00/ 0,00	0,00/ 0,00	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) – Kidde Sintex 3%					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	7,38/ 7,26	7,40/ 7,31	7,39/ 7,28	7,41/ 7,22	7,41/ 7,22	7,44/ 7,14
OD (mg/L)	6,0/ 5,2	6,0/ 5,5	5,9/ 6,0	6,0/ 5,9	6,0/ 5,9	6,1/ 5,8
Salinidade	35/ 35	35/ 35	35/ 35	34/ 34	34/ 34	35/ 33
Amônia NH ₃ (mg/L)	<LD/ 0,00	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - Liovac					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	6,12/ 7,76	8,18/ 7,59	8,16/ 7,51	8,17/ 7,56	8,14/ 7,39	8,10/ 7,36
OD (mg/L)	7,0/ 6,8	6,7/ 6,6	6,9/ 6,2	6,9/ 5,6	6,9/4,3	7,0/4,3
Salinidade	35/ 35	35/ 34	35/ 34	35/ 34	33/ 33	33/33
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,00/0,00	<LD/<LD	<LD/0,01	<LD/0,00	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) – F500					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	7,13/ 6,83	7,35/ 6,66	6,53/ 6,93	6,20/ 7,04	6,14/ 6,80	6,04/ 6,31
OD (mg/L)	6,9/ 5,8	7,3/ 5,6	6,3/ 5,7	6,6/ 5,8	6,5/ 5,0	6,4/ 4,8
Salinidade	34/ 35	35/ 35	35/ 35	35/ 34	35/ 34	35/ 33
Amônia NH ₃ (mg/L)	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - <i>Unknown</i>					
	Controle	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7
pH	7,13/ 6,83	8,15/ 7,64	8,11/ 7,54	8,08/ 7,48	8,05/ 7,29	8,01/ 7,28
OD (mg/L)	6,9/ 5,8	6,9/ 6,3	6,9/5,5	7,1/5,9	6,9/4,9	6,9/ 4,3
Salinidade	34/ 35	35/ 35	35/33	34/ 33	33/ 33	32/ 32
Amônia NH ₃ (mg/L)	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

Parâmetros	Concentrações (%) - FSG					
	Controle	0,01	0,05	0,15	0,30	0,75
pH	8,04/ 7,48	8,06/7,48	8,05/7,58	8,03/7,61	8,02/7,60	8,04/7,30
OD (mg/L)	5,9/ 5,0	5,9/5,0	5,8/5,0	5,6/4,9	6,1/4,8	6,6/5,3
Salinidade	35/ 36	35/36	36/36	36/36	37/37	35/36
Amônia NH ₃ (mg/L)	<LD/0,00	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD	<LD/<LD

(/) = Delimita inicial e final; <LD = Valor inferior ao limite de detecção.

Apêndice III - Parâmetros físico-químicos dos ensaios isolados com AEI e FSG para *Daphnia similis*.

Parâmetros	Concentrações (%) - Ageofoam					
	Controle	0,01	0,02	0,03	0,05	0,1
pH	7,79/ 8,26	7,94/ 8,39	7,98/ 8,44	8,00/ 8,45	8,00/ 8,43	8,02/ 8,39
OD (mg/L)	6,3/ 6,6	6,3/ 6,7	6,3/ 6,2	6,3/ 6,5	6,3/ 6,7	6,4/ 6,7
Condutividade	1223/ 1554	639/ 704	642/ 673	644/ 669	645/ 679	663/ 706
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,39/ 0,59	0,42/ 0,47	0,48/ 0,53	0,54/ 0,61	0,88/ 0,90	0,92/ 0,90

Parâmetros	Concentrações (%) - Coldfire					
	Controle	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07
pH	8,05/ 8,45	8,14/ 8,68	8,04/ 8,45	8,06/ 8,51	8,04/ 8,52	8,04/ 8,51
OD (mg/L)	5,8/ 6,5	5,9/ 6,5	6,4/ 6,5	6,4/ 6,6	6,4/ 6,8	6,4/ 6,4
Condutividade	647/ 679	642/ 677	637/ 676	638/ 684	638/ 685	639/ 677
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,39/ 0,59	0,39/ 0,41	0,39/ 0,41	0,44/ 0,55	0,77/ 0,84	0,98/ 1,02

Parâmetros	Concentrações (%) – F500					
	Controle	0,0001	0,001	0,01	0,02	0,03
pH	7,76/ 8,45	7,88/ 8,48	7,90/ 7,46	7,91/ 8,12	8,04/ 8,52	8,04/ 8,51
OD (mg/L)	7,0/ 7,5	7,0/ 7,2	7,1/ 7,3	7,1/ 7,2	6,4/ 6,8	6,4/ 6,4
condutividade	595/ 984	561/ 628	560/ 608	559/ 737	638/ 685	639/ 677
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,41/ 0,39	0,44/ 0,41	0,44/ 0,41	0,47/ 0,53	0,77/ 0,84	0,98/ 1,02

Parâmetros	Concentrações (%) – Kidde Sintex 1%					
	Controle	0,15	0,25	0,35	0,45	0,60
pH	7,78/ 8,34	7,98/ 8,33	8,10/ 8,23	8,10/ 8,23	8,16/ 8,19	8,17/ 8,15
OD (mg/L)	8,1/ 7,9	8,2/ 7,1	8,2/ 6,9	8,2/ 6,9	8,1/ 6,7	8,2/ 6,3
Condutividade	1204/ 902	652/ 697	669/ 703	669/ 703	689/ 724	628/ 751
Amônia NH ₃ (mg/L)	0,51/ 0,54	0,49/ 0,59	0,53/ 0,58	0,53/ 0,58	0,53/ 0,59	0,54/ 0,63

Parâmetros	Concentrações (%) – FSG					
	Controle	0,25	1,25	2,5	3,75	7,5
pH	7,71/7,93	8,15/8,04	8,13/8,00	8,13/8,03	8,12/8,07	8,05/7,90
OD (mg/L)	7,96/7,54	7,88/7,28	7,81/7,09	7,67/6,99	7,64/6,99	7,53/7,21
Condutividade	585/644	584/572	577/563	577/573	564/560	572/570
Amônia NH₃ (mg/L)	0,33/0,34	0,39/0,41	0,39/0,41	0,41/0,41	0,41/0,40	0,44/0,44

(/) = Delimita inicial e final

Apêndice IV- Resultado dos ensaios com as substâncias de referência.

Resultado dos ensaios de sensibilidade para *E. lucunter*, *Artemia* sp. e *D. similis* com as respectivas substâncias de referência Sulfato de Zinco, Dodecil Sulfato de Sódio e Dicromato de Potássio.

Espécies	Expressão dos Resultados (mg.L⁻¹)	Faixa de Sensibilidade (mg.L⁻¹)	Substância de Referência
<i>Echinometra lucunter</i>	0.51	0.07 a 0.92	Sulfato de Zinco
<i>Artemia</i> sp.	16.0	13.1 a 30.9	Dodecil Sulfato de Sódio
<i>Daphnia similis</i>	0.6	0.5 a 2.1	Dicromato de Potássio

Apêndice V – Parâmetros físico-químicos dos ensaios com misturas de AEI e FSG para *Artemia* sp..

Cold Fire com FSG				
Concentrações (%): Cold Fire - FSG	pH	Salinidade	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Amonia NH₃ (mg/L)
Controle	7,65/ 7,90	37/36	4,1/ 4,1	<LD/ <LD
0,01 - 0,01	7,45/ 7,53	38/36	4,4/4,4	<LD/ <LD
0,01 – 0,05	7,48/ 7,55	37/36	3,3/4,3	<LD/ <LD
0,01 - 0,15	7,58/7,52	37/37	3,4/4,2	<LD/ <LD
0,01 - 0,30	7,56/ 7,52	38/37	3,6/3,8	0,05/ <LD
0,01 - 0,75	7,56/ 7,89	38/37	3,8/ 3,9	0,00/ <LD
0,10 - 0,01	7,59/ 7,60	37/37	3,9/3,9	0,09/0,00
0,10 - 0,05	7,59/ 8,08	37/ 37	4,2/4,1	<LD/ <LD
0,10 - 0,15	7,60/ 7,56	37/36	4,4/4,5	<LD/ <LD
0,10 - 0,30	7,61/ 7,64	38/37	4,3/4,8	0,16/ <LD
0,10 - 0,75	7,62/ 7,61	37/37	4,5/4,5	0,00/0,01
0,30 - 0,01	7,57/ 7,09	37/37	3,8/ 4,2	<LD/ <LD
0,30 - 0,05	7,60/ 7,57	37/ 37	3,8/ 3,4	<LD/ 0,01
0,30 - 0,15	7,62/ 7,56	38/37	3,6/ 3,9	0,09/ <LD
0,30 - 0,30	7,62/ 7,76	38/ 37	3,9/ 4,2	<LD/ 0,18
0,30 - 0,75	7,64/ 7,80	37/ 37	4,1/ 3,9	<LD/ <LD
0,50 - 0,01	7,63/ 7,74	37/ 37	4,5/ 4,2	<LD/ <LD
0,50 - 0,05	7,64/ 7,64	37/37	5,1/ 4,8	0,01/ 0,16
0,50 - 0,15	7,64/ 7,72	37/ 37	5,1/ 5,0	0,09/ <LD
0,50 - 0,30	7,66/ 7,50	37/37	4,8/ 5,2	0,00/ <LD
0,50 - 0,75	7,65/ 7,62	38/ 37	3,8/ 4,3	<LD/ <LD
0,70 - 0,01	7,65/ 7,59	37/ 37	4,6/ 4,5	<LD/ <LD
0,70 - 0,05	7,61/ 7,55	38/ 37	4,7/ 4,3	0,03/ <LD
0,70 - 0,15	7,64/ 7,66	38/ 37	5,7/ 5,6	<LD/ <LD
0,70 - 0,30	7,64/ 7,54	37/ 37	5,2/ 5,5	<LD/ 0,00
0,70 - 0,75	7,60/ 7,61	37/ 37	4,9/ 5,4	<LD/ 0,07

(/) = Delimita inicial e final; <LD = Valor inferior ao limite de detecção.

Ageofoam com FSG				
Concentrações (%): Ageofoam - FSG	pH	Salinidade	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Amonia NH ₃ (mg/L)
Controle	7,55/ 7,40	36/35	5,0/ 4,7	<LD/ 0,03
0,01 - 0,01	7,43/ 7,32	35/ 35	3,8/ 3,7	<LD/ <LD
0,01 - 0,05	7,55/ 7,33	35/ 35	4,0/ 4,6	0,06/ <LD
0,01 - 0,15	7,38/ 7,31	35/ 36	4,0/4,8	0,01/ <LD
0,01 - 0,30	7,38/ 7,28	35/ 35	4,0/ 4,0	<LD/ <LD
0,01 - 0,75	7,23/ 7,39	36/ 35	4,0/4,6	<LD/ <LD
0,10 - 0,01	7,49/ 7,45	35/ 35	4,2/ 4,6	<LD/ <LD
0,10 - 0,05	7,31/ 7,38	35/ 36	3,9/4,6	0,07/ 0,92
0,10 - 0,15	7,20/ 7,46	35/ 36	4,2/ 3,6	<LD/ <LD
0,10 - 0,30	7,42/ 7,21	35/ 36	4,6/ 3,4	<LD/ <LD
0,10 - 0,75	7,09/ 7,12	35/ 35	3,3/ 3,7	0,01/ <LD
0,30 - 0,01	6,91/ 7,09	35/ 36	3,8/ 3,5	<LD/ <LD
0,30 - 0,05	7,18/ 7,07	35/ 36	3,8/ 3,2	<LD/ 0,15
0,30 - 0,15	7,17/ 7,13	36/ 35	3,5/ 3,2	<LD/ <LD
0,30 - 0,30	7,09/ 7,00	35/ 35	3,9/ 3,4	<LD/ <LD
0,30 - 0,75	7,06/ 7,80	35/ 35	3,6/ 3,6	<LD/ <LD
0,50 - 0,01	7,08/ 6,90	35/ 36	35/ 35	0,15/ <LD
0,50 - 0,05	7,06/ 6,93	35/ 36	3,4/ 3,1	<LD/ 0,00
0,50 - 0,15	7,55/ 6,87	35/ 36	3,0/ 3,6	0,17/ <LD
0,50 - 0,30	7,05/ 6,86	35/ 35	3,7/ 3,6	<LD/ <LD
0,50 - 0,75	7,54/ 6,86	35/ 35	3,9/ 3,0	0,03/ <LD
0,70 - 0,01	7,03/ 6,74	35/ 36	3,2/ 3,5	<LD/ 0,00
0,70 - 0,05	6,55/ 6,63	35/ 36	4,0/ 4,0	<LD/ <LD
0,70 - 0,15	7,04/ 6,58	35/ 36	4,5/ 3,8	<LD/ <LD
0,70 - 0,30	6,74/ 6,60	35/ 36	4,0/ 3,6	0,07/ 0,00
0,70 - 0,75	7,00/ 6,61	35/ 36	3,6/ 3,2	0,07/ <LD

(/) = Delimita inicial e final; <LD = Valor inferior ao limite de detecção.

Kidde Sintex 1% com FSG				
Concentrações (%): Kidde Sin 1% - FSG	pH	Salinidade	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Amonia NH₃ (mg/L)
Controle	7,56/ 7,59	37/36	6,3/ 6,7	<LD/ 0,12
0,01 - 0,01	7,71/ 7,15	35/ 35	6,5/ 6,6	<LD/ <LD
0,01 - 0,05	7,84/ 7,81	35/ 36	5,8/ 6,0	0,02/<LD
0,01 - 0,15	7,81/ 7,05	35/ 36	7,4/ 7,6	<LD/ <LD
0,01 - 0,30	7,91/ 7,16	35/ 36	7,0/ 7,0	0,18/ <LD
0,01 - 0,75	7,34/ 7,69	35/ 36	6,2/ 6,7	<LD/ <LD
0,10 - 0,01	7,60/ 7,85	36/ 35	5,3/ 5,6	<LD / 0,33
0,10 - 0,05	7,88/ 8,08	35/ 36	6,6/ 6,8	<LD / <LD
0,10 - 0,15	7,72/ 7,86	36/ 36	6,9/ 6,5	0,34/ <LD
0,10 - 0,30	7,82/ 7,05	35/ 36	6,5/ 6,7	<LD / <LD
0,10 - 0,75	7,87/ 7,12	35/ 35	6,3/ 6,1	<LD / <LD
0,30 - 0,01	7,67/ 7,09	35/ 36	6,1/ 6,5	<LD/ 0,67
0,30 - 0,05	7,75/ 7,07	35/ 36	6,4/ 6,4	0,12/ <LD
0,30 - 0,15	7,80/ 7,76	35/ 36	5,7/ 6,2	0,16/ <LD
0,30 - 0,30	7,56/ 7,86	36/ 36	4,9/ 5,2	0,09/ <LD
0,30 - 0,75	7,82/ 7,80	36/ 35	4,7/ 5,6	0,01/ 0,39
0,50 - 0,01	7,74/ 7,34	35/ 36	6,9/ 6,2	<LD/ <LD
0,50 - 0,05	7,79/ 7,79	35/ 36	6,2/ 6,2	0,16/ <LD
0,50 - 0,15	7,81/ 7,72	37/ 36	6,7/ 6,5	<LD/ 0,02
0,50 - 0,30	7,80/ 7,60	35/ 36	6,4/ 6,6	<LD/ <LD
0,50 - 0,75	7,49/ 7,22	35/ 35	5,7/ 5,6	0,39/ <LD
0,70 - 0,01	7,61/ 7,64	35/ 36	6,1/ 6,5	<LD/ 0,32
0,70 - 0,05	7,68/ 7,47	36/36	5,8/ 5,3	0,05/ <LD
0,70 - 0,15	7,49/ 7,46	35/ 36	6,7/ 5,6	<LD/ <LD
0,70 - 0,30	7,71/ 7,22	35/ 36	5,6/ 5,5	<LD/ 0,01
0,70 - 0,75	7,66/ 7,73	35/ 36	6,6/ 5,8	<LD/ 0,05

(/) = Delimita inicial e final; <LD = Valor inferior ao limite de detecção.

Apêndice VI - Parâmetros físico-químicos dos ensaios com misturas de AEI e FSG para *Daphnia similis*.

Ageofoam com FSG				
Concentrações (%): Ageofoam - FSG	pH	Condutividade	Oxigênio Dissolvido(mg/L)	Amonia NH ₃ (mg/L)
Controle	7,26/ 7,94	910/ 726	7,32/ 7,32	0,30/0,27
0,01 - 0,25	7,53/ 8,15	623/ 580	7,20/ 7,06	0,42/ 0,61
0,01 - 1,25	7,55/ 8,10	617/ 622	7,16/ 6,87	0,40/ 0,61
0,01 - 2,5	7,58/ 8,05	608/ 614	7,33/ 6,80	0,44/ 0,49
0,01 - 3,75	7,58/ 8,16	601/ 608	7,27/ 6,89	0,49/ 0,53
0,01 - 7,5	7,55/ 7,89	580/ 602	7,30/ 6,70	0,40/ 0,39
0,02 - 0,25	7,60/ 7,85	623/ 580	7,40/ 6,75	0,54/ 0,40
0,02 - 1,25	7,53/ 8,08	620/ 623	7,44/ 6,85	0,61/ 0,72
0,02 - 2,5	7,52/ 7,86	611/ 612	7,39/ 6,53	0,34/ 0,30
0,02 - 3,75	7,54/ 8,05	602/ 603	7,31/ 6,79	0,48/ 0,52
0,02 - 7,5	7,54/ 8,12	577/ 577	7,39/ 7,11	0,53/ 0,41
0,03 - 0,25	7,56/ 8,09	629/ 629	7,36/ 6,59	0,44/ 0,44
0,03 - 1,25	7,57/ 7,97	620/ 621	7,38/ 6,44	0,41/ 0,44
0,03 - 2,5	7,57/ 7,76	613/ 614	7,30/ 6,21	0,39/ 0,54
0,03 - 3,75	7,57/ 7,76	606/ 607	7,37/ 6,21	0,42/ 0,41
0,03 - 7,5	7,55/ 7,80	586/ 584	7,19/ 6,51	0,39/ 0,36
0,05 - 0,25	7,80/ 7,94	630/ 630	7,41/ 6,23	0,70/ 0,99
0,05 - 1,25	7,56/ 7,79	625/ 650	7,28/ 6,23	0,39/ 0,32
0,05 - 2,5	7,55/ 7,72	615/ 616	7,28/ 6,58	0,41/ 0,41
0,05 - 3,75	7,54/ 7,60	610/ 612	7,37/ 6,12	0,49/ 0,41
0,05 - 7,5	7,54/ 7,62	590/ 591	7,38/ 6,36	0,54/ 0,41
0,1 - 0,25	7,53/ 7,64	641/ 642	7,45/ 5,58	0,54/ 0,49
0,1 - 1,25	7,55/ 7,77	636/ 636	7,33/ 5,38	0,61/ 0,68
0,1 - 2,5	7,54/ 7,66	632/ 630	7,39/ 5,60	0,69/ 0,72
0,1 - 3,75	7,54/ 7,52	624/ 623	7,46/ 5,58	0,52/ 0,69
0,1 - 7,5	7,60/ 7,71	603/ 602	7,39/ 5,47	0,49/ 0,64

(/) = Delimita inicial e final.

Coldire com FSG				
Concentrações (%): Coldfire - FSG	pH	Condutividade	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Amonia NH₃ (mg/L)
Controle	7,37/ 7,79	570/ 571	7,58/ 8,05	0,39/ 0,40
0,01 - 0,25	7,66/ 7,35	581/ 566	8,02/ 9,21	0,49/ 0,60
0,01 - 1,25	7,22/ 7,29	563/ 567	9,70/ 9,17	0,49/ 0,60
0,01 - 2,5	7,23/ 7,32	564/ 562	8,30/ 9,37	0,51/ 0,62
0,01 - 3,75	7,29/ 7,70	529/ 556	8,27/ 9,49	0,60/ 0,49
0,01 - 7,5	7,23/ 7,11	570/ 550	9,12/ 9,84	0,54/ 0,59
0,03 - 0,25	7,44/ 7,19	523/ 531	8,79/ 9,22	0,58/ 0,59
0,03 - 1,25	7,45/ 7,28	549/ 568	8,99/ 9,37	0,57/ 0,59
0,03 - 2,5	7,67/ 7,32	522/ 563	8,87/ 9,52	0,49/ 0,63
0,03 - 3,75	7,69/ 7,23	521/ 556	8,82/ 9,49	0,62/ 0,63
0,03 - 7,5	7,27/ 7,17	523/ 549	8,94/ 9,28	0,67/ 0,70
0,04 - 0,25	7,23/ 7,14	544/ 568	8,02/ 9,49	0,67/ 0,73
0,04 - 1,25	7,14/ 7,74	547/ 564	8,23/ 9,54	0,67/ 0,71
0,04 - 2,5	7,15/ 7,33	550/ 557	8,28/ 9,97	0,63/ 0,89
0,04 - 3,75	7,17/ 7,52	560/ 551	8,32/ 9,14	0,62/ 0,83
0,04 - 7,5	7,23/ 7,77	561/ 531	8,32/ 9,67	0,79/ 0,91
0,05 - 0,25	7,29/ 7,14	561/ 569	8,49/ 9,70	0,71/ 0,90
0,05 - 1,25	7,31/ 7,20	554/ 563	8,51/ 9,32	0,73/ 0,85
0,05 - 2,5	7,30/ 7,27	549/ 557	9,00/ 9,26	0,72/ 0,87
0,05 - 3,75	7,34/ 7,53	560/ 551	9,02/ 9,22	0,57/ 0,63
0,05 - 7,5	7,50/ 7,82	562/ 533	8,12/ 9,84	0,81/ 0,79
0,07 - 0,25	7,29/ 7,83	544/ 570	8,15/ 9,12	0,49/ 0,67
0,07 - 1,25	7,51/ 7,64	547/ 565	8,01/ 9,08	0,53/ 0,62
0,07 - 2,5	7,53/ 7,65	528/ 560	8,14/ 6,66	0,69/ 0,81
0,07 - 3,75	7,80/ 7,66	527/ 552	8,34/ 6,66	0,71/ 0,80
0,07 - 7,5	7,74/ 7,80	523/ 533	8,37/ 6,82	0,70/ 0,93

(/) = Delimita inicial e final.

Kidde Sintex 1% com FSG				
Concentrações (%): Kidde Sin, 1% - FSG	pH	Condutividade	Oxigênio Dissolvido(mg/L)	AmoniaNH₃ (mg/L)
Control	7,78/ 8,12	623/ 674	9,00/ 9,90	0,21/ 0,23
0,15 - 0,25	8,00/ 7,84	672/ 714	7,96/ 9,00	0,29/ 0,27
0,15 - 1,25	8,07/ 7,68	660/ 712	8,00/ 8,74	0,32/ 0,47
0,15 - 2,5	7,92/ 7,97	668/ 700	8,14/ 7,00	0,59/ 0,61
0,15 - 3,75	7,28/ 7,94	666/ 712	8,20/ 7,23	0,57/ 0,39
0,15 - 7,5	7,68/ 8,10	662/ 676	8,12/ 7,24	0,63/ 0,72
0,25 - 0,25	7,60/ 8,10	679/ 694	8,16/ 7,72	0,63/ 0,70
0,25 - 1,25	7,49/ 8,12	682/ 696	8,10/ 7,04	0,55/ 0,51
0,25 - 2,5	7,47/ 7,96	687/ 689	8,22/ 8,84	0,39/ 0,47
0,25 - 3,75	7,80/ 8,04	693/ 668	8,48/ 8,20	0,53/ 0,69
0,25 - 7,5	7,23/ 8,07	692/ 702	8,49/ 8,21	0,52/ 0,77
0,35 - 0,25	7,98/ 8,12	690/ 716	9,00/ 8,42	0,68/ 0,67
0,35 - 1,25	7,83/ 8,09	694/ 720	9,12/ 8,44	0,40/ 0,40
0,35 - 2,5	8,00/ 8,18	697/ 712	8,78/ 8,23	0,70/ 0,74
0,35 - 3,75	7,72/ 7,74	625/ 700	8,23/ 8,00	0,39/ 0,41
0,35 - 7,5	7,80/ 7,76	677/ 702	8,14/ 8,16	0,48/ 0,44
0,45 - 0,25	7,14/ 7,23	674/ 697	8,00/ 8,02	0,48/ 0,44
0,45 - 1,25	7,07/ 7,23	623/ 693	7,99/ 7,72	0,48/ 0,47
0,45 - 2,5	7,49/ 7,68	672/ 684	7,74/ 7,92	0,39/ 0,41
0,45 - 3,75	8,00/ 8,02	699/ 702	7,74/ 7,23	0,39/ 0,54
0,45 - 7,5	8,12/ 8,00	692/ 707	7,07/ 7,00	0,70/ 0,71
0,6 - 0,25	8,00/ 7,79	687/ 697	8,14/ 7,94	0,57/ 0,45
0,6 - 1,25	8,00/ 8,23	693/ 692	7,99/ 7,92	0,64/ 0,68
0,6 - 2,5	7,44/ 7,79	677/ 623	7,97/ 7,93	0,29/ 0,31
0,6 - 3,75	7,97/ 7,34	696/ 625	8,02/ 7,14	0,52/ 0,49
0,6 - 7,5	7,39/ 7,55	692/ 668	8,23/ 9,25	0,41/ 0,48

(/) = Delimita inicial e final.

Apêndice VII - Resultados dos ensaios de *Daphnia similis* com os modelos de referência CA e IA utilizando o MIXTOX.

Misturas		Modelo Concentração de Adição (CA)					Modelo Ação Independente (IA)				
		r^2	valor de p	SS	a	b	r^2	Valor de p	SS	a	b
Coldfire / FSG	Referência	0,82	$5,15 \times 10^{-69}$	69,62	-	-	0,64	$2,84 \times 10^{-53}$	142,60	-	-
	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DL	0,94	0,003	23,15	-0,09	-50,37	0,94	0,0001	22,37	-0,39	-153,37
	DR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ageofoam / FSG	Referência	0,87	$4,37 \times 10^{-66}$	47,25	-	-	0,90	$2,38 \times 10^{-68}$	36,77	-	-
	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidde Sintex 1% / FSG	Referência	0,85	$1,10 \times 10^{-63}$	51,47	-	-	0,88	$3,90 \times 10^{-66}$	40,10	-	-
	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DR	0,89	0,02	36,90	1,15	-0,13	-	-	-	-	-

Apêndice VIII - Resultados dos ensaios de *Artemia* sp. com os modelos de referência CA e IA utilizando o MIXTOX.

Misturas		Modelo Concentração de Adição (CA)					Modelo Ação Independente (IA)				
		r^2	valor de p	SS	a	b	r^2	Valor de p	SS	a	b
Coldfire / FSG	Referência	0,76	$2,49 \times 10^{-117}$	170,85	-	-	0,74	$2,06 \times 10^{-114}$	184,34	-	-
	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DR	0,91	$7,7 \times 10^{-08}$	62,94	4,73	-10,08	0,90	1×10^{-09}	72,03	9,22	-35,18
Ageofoam / FSG	Referência	0,90	$1,41 \times 10^{-166}$	80,75	-	-	0,88	$1,17 \times 10^{-162}$	98,85	-	-
	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DL	-	-	-	-	-	0,93	0,0003	58,02	- 0,10	-145,06
	DR	0,93	$4,4 \times 10^{-05}$	60,70	2,52	-6,40	-	-	-	-	-
Kidde Sintex 1% / FSG	Referência	0,87	$1,49 \times 10^{-159}$	105,73	-	-	0,87	$1,53 \times 10^{-159}$	105,78	-	-
	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DR	0,89	0,0002	88,85	4,21	-8,10	0,90	$8,2 \times 10^{-06}$	82,37	4,82	-12,93