

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Juliana Braun Müller

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM
ÁGUA DO BIODIESEL, DIESEL E DA MISTURA BINÁRIA
DIESEL/BIODIESEL DE 5% (B5)**

Florianópolis (SC)
2011

Juliana Braun Müller

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM
ÁGUA DO BIODIESEL, DIESEL E DA MISTURA BINÁRIA
DIESEL/BIODIESEL DE 5% (B5)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Florianópolis (SC)
2011

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO
BIO DIESEL, DIESEL E DA MISTURA BINÁRIA DIESEL/BIO DIESEL DE 5% (B5)”**

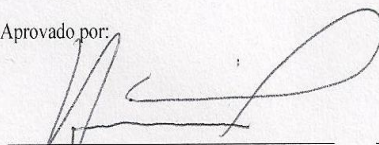
JULIANA BRAUN MÜLLER

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós - Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Engenharia Ambiental.

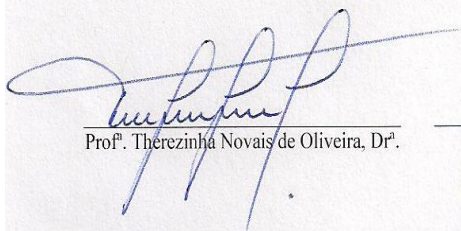
Aprovado por:



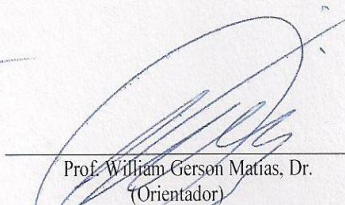
Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr.



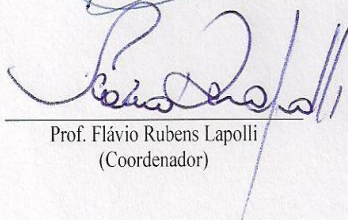
Prof. Armando Borges de Castilhos Júnior, Dr.



Prof. Therezinha Novais de Oliveira, Drª.



Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)



Prof. Flávio Rubens Lapolli
(Coordenador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
JULHO/2011

*Com muito amor, dedico este
trabalho à minha mãe, Vâni
Margarida Müller, que com amor
incondicional está sempre ao meu
lado me apoiando e tornando os
obstáculos da minha vida mais
simples.*

AGRADECIMENTOS

Com carinho, meus sinceros agradecimentos:

Ao Programa de Pós-Graduação em Eng. Ambiental (PPGEA) pelos serviços prestados e pelos ensinamentos transmitidos;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao Prof. Dr. William Gerson Matias, pela orientação e pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho;

Aos membros da banca, Prof^a Dr^a. Therezinha Maria Novais de Oliveira, Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil, Prof. Dr. Armando Borges de Castilhos Júnior e Prof^a Dr^a. Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto, pela disponibilidade e pelas contribuições na melhoria deste trabalho;

Aos colegas do LABTOX – Laboratório de Toxicologia Ambiental pela colaboração e amizade durante a realização da pesquisa;

À empresa BIOPAR – Bioenergia do Paraná Ltda pela doação do biodiesel usado na pesquisa e pela forma solícita que sempre me trataram;

Ao REMAS - Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas pela doação do diesel utilizado neste trabalho, em especial ao Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil, a pesquisadora Dr^a. Marilda Fernandes e a doutoranda Débora Toledo Ramos, pelos conhecimentos repassados nos momentos de dúvidas;

À Dona Eliane e Vítor, funcionários do LIMA – Laboratório de Meio Ambiente, pelo apoio e momentos de distração durante a realização da parte experimental;

À colega e amiga Cristiane Fuzinatto pelas valiosas orientações laboratoriais;

À colega e amiga Grazielli Colla, pela ajuda nos testes do micronúcleo;

À Prof^a. Dr^a. Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto, pela amizade e ajuda na realização deste estudo;

À colega e amiga Silvia Pedroso Melegari, pelas valiosas colaborações no meu trabalho e apoio e dedicação no fechamento desta dissertação;

Aos queridos amigos, Jonas Ghisi, João Silva, Amanda Bordin, Júlia Santos Silva, Ana Letícia Rossetto, Cristina Costa e Mônica Grewe, pelo incentivo e amizade;

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Débora Toledo, Lorena Guimarães, Karina Joussef, Márcia Farias, Helen Chiaranda, Suhita Ramos, Kalil Salin, Wanderli Leite, Jamile Wagner, Tiago Belli, Pauline Amaral, Franciele Fedrizzi, Jorge Tavares, Pilar Serbent e Bárbara Alves, pelo apoio nas horas de angústia e pelos diversos momentos de alegria que vivemos juntos;

À minha família e amigos, pela alegria e incentivo, em especial à Eliana Andrade e às minhas dindas Wali Maria Braun de Queiroz e Juliana de Moraes, por serem tão presentes na minha vida;

Ao meu amor, Tiago D'Agostini Fontana, pelo amor, compreensão e companheirismo sempre, inclusive me acompanhando na UFSC nos domingos e feriados para a realização da pesquisa;

Ao meu pai, Pedro Raimundo Müller (*in memoriam*), pelo exemplo de vida;

À minha mãe, Vâni Margarida Müller, e ao meu irmão, Augusto Braun Müller, por fazerem parte da minha vida. Pelo amor incondicional, pelo apoio, carinho e incentivo sempre;

À Deus, por me iluminar e me guiar no meu caminho.

RESUMO

O desenvolvimento econômico dos últimos anos fez com que houvesse um aumento vertiginoso da frota de automóveis no país e, conseqüentemente, um aumento no consumo de combustíveis. Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), o óleo diesel é o combustível mais produzido no Brasil (ANP, 2010). O diesel é um combustível muito eficiente, porém, as crescentes preocupações com as questões ambientais, bem como anseios quanto a finitude do petróleo, fizeram com que fosse introduzido o biodiesel na matriz energética do país. A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira se deu através do uso de misturas binárias diesel/biodiesel, sendo fixado em 5% (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado (BRASIL, 2005^a). Os derramamentos de combustíveis constituem uma das principais fontes de contaminação dos ecossistemas, sendo os ecossistemas aquáticos os receptáculos finais de qualquer poluição causada. Portanto, neste estudo, foram avaliados os efeitos toxicológicos agudos e crônicos e o potencial mutagênico da Fração Solúvel em Água (FSA) do biodiesel, diesel e B5. Os efeitos toxicológicos agudos foram avaliados através de testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo aquático *Daphnia magna* e com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Os efeitos crônicos avaliados foram longevidade, reprodução e crescimento, através da exposição do organismo-teste *D. magna* a diferentes diluições das amostras e ao controle durante o tempo de 21 dias. O potencial mutagênico foi analisado através do teste do micronúcleo com eritrócitos sanguíneos do peixe *Oreochromis niloticus*. Os resultados demonstraram que a FSA do biodiesel é menos tóxica que as FSA do diesel e do B5 para todos os testes realizados. Além disso, observou-se que a FSA da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5) apresentou efeitos toxicológicos aquáticos semelhantes à FSA do diesel.

Palavras-chave: Toxicidade, Fração Solúvel em Água, biodiesel, diesel e B5.

ABSTRACT

The consumption of fuel in Brazil had increased significantly last years, for the reason of the economic grow and the boost in the fleet of automobiles. According to data of the National Petroleum Agency the diesel is the most produced fuel in Brazil (ANP, 2010). The diesel is a very efficient fuel, however, it was introduced the biodiesel in the energy matrix of the country, because of the growing concerns with the environmental issues, as well as the concern with the exhaustion of the reservations of petroleum. The introduction of the biodiesel in the Brazilian energetic matrix it was made with a binary blend of diesel/biodiesel, being set in 5% (five percent) in volume, the obligatory percentile of biodiesel added to the diesel marketed (BRASIL, 2005^a). The spillings of fuels constitute one of the main sources of contamination of the ecosystems, being the aquatic ecosystems the final receptacles of any caused pollution. Therefore, in this study, it was evaluated the acute and chronic toxicological effects and the mutagenic potential of the Water-Soluble Fraction (WSF) of the biodiesel, diesel and B5. The acute toxicological effects were evaluated through acute toxicity tests with the aquatic microcrustacean *Daphnia magna* and the marine bacteria *Vibrio fischeri*. The chronic effects evaluated were longevity, reproduction and growth, through the exposition of the test organism *D. magna* to different dilutions of the samples and control during the period of 21 days. The mutagenic potential was analyzed using the micronucleus test with blood erythrocytes of the fish *Oreochromis niloticus*. The results demonstrated that WSF of the biodiesel is less toxic than WSF of the diesel and the B5 for all the tests accomplished. Besides, it was observed that the WSF of the binary blend diesel/biodiesel of 5% (B5) present the aquatic toxicological effects similar to the WSF of the diesel.

key-words: Toxicity, Water-Soluble Fraction, biodiesel, diesel and B5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Microcrustáceo aquático <i>Daphnia magna</i>	31
Figura 3.2 – Bactérias marinhas bioluminescentes <i>Vibrio fischeri</i>	33
Figura 3.3 Esquema da reação de transesterificação para a formação do biodiesel	38
Figura 4.1 – Esquema geral da metodologia utilizada.....	49
Figura 4.2 – Preparo da FSA para os testes de toxicidade crônica.....	50
Figura 4.3 – Esquema do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	55
Figura 4.4 - Esquema do teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	56
Figura 4.5 - Medida do comprimento total da <i>Daphnia magna</i> realizada após 21 dias de teste.	57
Figura 4.6 – Preparação dos esfregaços para o teste do micronúcleo....	60
Figura 5.1 – Comparativo das concentrações de hidrocarbonetos solúveis para as diferentes amostras estudadas	64
Figura 5.2 – Comparativo da toxicidade aguda da FSA dos diferentes combustíveis estudados utilizando o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .	67
Figura 5.3 - Comparativo da toxicidade aguda da FSA dos diferentes combustíveis estudados utilizando a bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i> ..	69
Figura 5.4 – Resultado dos efeitos crônicos para o parâmetro longevidade, para as diferentes FSA estudadas	72
Figura 5.5 - Resultado dos efeitos crônicos para o parâmetro reprodução, para as diferentes FSA estudadas.	73
Figura 5.6 - Resultado dos efeitos crônicos para o parâmetro crescimento, para as diferentes FSA estudadas.	74
Figura 5.7 – Diferença de tamanho de um organismo exposto ao controle (Figura A) e a diluição 25% da FSA de diesel (Figura B).....	74
Figura 5.8 - Comparativo da média de eritrócitos micronucleados encontrados nas FSA dos diferentes combustíveis estudados e nos controles.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Descrição das amostras de FSA obtidas com especificação da matriz utilizada.....	51
Tabela 5.1 – Resultados dos testes de toxicidade aguda para as diferentes amostras de combustíveis utilizando o microcrustáceo aquático <i>Daphnia magna</i>	67
Tabela 5.2 - Resultados dos testes de toxicidade aguda utilizando a bactéria marinha bioluminescente <i>Vibrio fischeri</i>	68
Tabela 5.3 - Resumo dos resultados dos testes toxicológicos para as amostras avaliadas.....	77
Tabela A1.1 – Padrões de qualidade da água para águas superficiais conforme a Resolução CONAMA 357 (2005).....	100
Tabela A1.2 – Padrões de qualidade da água para águas Subterrâneas conforme a Resolução CONAMA 396 (2008).....	101
Tabela A1.3 – Critérios de lançamento de efluentes conforme a Resolução CONAMA 430 (2011).....	102
Tabela A1.4 – Limites máximos de tox. aguda de efluentes conforme Portaria FATMA 017 (2002).....	103
Tabela B1.1 - Exemplo da tabela de anotações utilizada para o teste crônico com <i>Daphnia magna</i>	106
Tabela C1.1 – Resumo dos resultados dos testes de toxicidade crônica utilizando o microcrustáceo aquático <i>daphnia magna</i> para as diferentes FSA dos combustíveis estudados.	108
Tabela A2. 1 - Resultados da quantificação de HPA e BTEX das diferentes amostras de FSA do diesel.....	110
Tabela A2. 2 - Resultados da quantificação de HPA e BTEX das diferentes amostras de FSA do B5	111
Tabela A2. 3 - Resultados da quantificação do teor de ésteres para todas as amostras de FSA do B5 e do biodiesel.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACS – American Chemical Society (Sociedade Americana de Química)
ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APHA - American Public Health Association (Associação Americana de Saúde Pública)
BIOPAR – Bioenergia do Paraná Ltda
BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
B5 – Mistura binária de diesel/biodiesel contendo 5% de biodiesel em volume/volume
B100 – Biodiesel puro
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE₅₀ – Concentração Efetiva que causa a imobilidade ou inibição da respiração de 50% dos organismos expostos
CENO – Concentração de Efeito Não Observado
CEO – Concentração de Efeito Observado
CETESB - Conselho Estadual de Saneamento Básico
CE_{zero} – Concentração Efetiva da amostra onde não se observa imobilidade maior que 10% dos organismos expostos
CG – Cromatografia Gasosa
CI₅₀ - Concentração Efetiva que causa a inibição do crescimento de 50% dos organismos expostos
CIMAR - Centre of Marine and Environmental Research (Centro de Pesquisa Marinha e Ambiental)
CL₅₀ – Concentração Letal que causa a morte ou imobilidade de 50% dos organismos testados
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂ – Dióxido de Carbono (Gás Carbônico)
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CSGMT – Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (Grupo de Estudo Colaborativo para o Teste do Micronúcleo)
DENATRAN – Departamento Nacional de Trânsito
DIN – Deutsches Institut Für Normung (Instituto Alemão de Normalização)
DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EHC - Environmental Health Criteria (Critérios de Saúde Ambiental)
ENS – Engenharia Sanitária e Ambiental
EUCAR - European Council for Automotive (Conselho Europeu para o setor Automotivo)
FATMA – Fundação do Meio Ambiente
FD – Fator de Diluição
FID - Flame Ionization Detector (Detector por Ionização em Chama)
FSA – Fração Solúvel em Água
HCl – Ácido Clorídrico
HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HTP – Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
IMP - Instituto Mexicano do Petróleo
ISO - International Organization for Standardization (Organização Internacional de Padronização)
JRC - Joint Research Centre of the EU Commission (Centro de Pesquisa da Comissão Européia)
LABTOX - Laboratório de Toxicologia Ambiental
NaCl – Cloreto de Sódio
min. - Minutos
MN – Micronúcleo
NO_x – Óxidos Nitrosos
OD – Oxigênio Dissolvido
pH – Potencial Hidrogeniônico
PPGEA - Programa de pós-graduação em engenharia ambiental
ppm – Partes por milhão
REMAS - Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas
tep - Tonelada Equivalente de Petróleo
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
USEPA – United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 RELEVÂNCIA DA PESQUISA.....	24
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
3.1 TOXICOLOGIA AMBIENTAL.....	27
3.1.1 Generalidades.....	27
3.1.2 Testes de toxicidade	28
3.1.3 Organismos- testes	30
3.1.3.1 <i>Daphnia magna</i>	30
3.1.3.2 <i>Vibrio fischeri</i>	32
3.1.4 Teste do micronúcleo	33
3.2 COMBUSTÍVEIS ESTUDADOS.....	35
3.2.1 Contextualização.....	35
3.2.2 Óleo diesel.....	36
3.2.3 Biodiesel.....	37
3.2.4 Estudos ambientais sobre os combustíveis.....	40
3.3 LEGISLAÇÃO PERTINENTE.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 ESQUEMA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA.....	47
4.2 SUBSTÂNCIA-TESTE.....	49
4.3 PREPARO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA.....	49
4.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	50
4.5 ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS.....	52
4.6 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM O MICROCRUSTÁCEO <i>DAPHNIA MAGNA</i>	53

4.6.1	Cultivo do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	53
4.6.2	Controle da sensibilidade dos organismos-teste.....	53
4.6.3	Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	54
4.6.4	Teste de toxicidade crônica com o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	55
4.7	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM A BACTÉRIA <i>VIBRIO FISCHERI</i>	58
4.8	TESTE DE MUTAGENICIDADE.....	59
4.8.1	Aclimação dos peixes.....	59
4.8.2	Teste do micronúcleo.....	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	63
5.1.1	Análises de hidrocarbonetos	63
5.1.2	Análise do teor de ésteres.....	65
5.2	ANÁLISES TOXICOLÓGICAS.....	66
5.2.1	Testes de toxicidade aguda	66
5.2.1.1	Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	66
5.2.1.2	Teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i>	68
5.2.2	Teste de toxicidade crônica com o microcrustáceo aquático <i>Daphnia magna</i>	71
5.2.3	Teste de mutagenicidade.....	75
5.2.3.1	Teste do micronúcleo.....	75
5.2.4	Resumo dos resultados toxicológicos.....	76
6.	CONCLUSÕES	79
7.	RECOMENDAÇÕES.....	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	APÊNDICE A	99
	APÊNDICE B	105
	APÊNDICE C	107
	ANEXO A.....	109

1. INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento econômico e industrial das últimas décadas fez com que houvesse um aumento vertiginoso no consumo de energia mundial. De acordo com Mussa (2003), de 2000 a 2030, a demanda projetada de energia no mundo aumentará 1,7% ao ano, alcançando 15,3 bilhões tep.ano⁻¹. A matriz energética mundial é fortemente inclinada para as fontes de carbono fóssil, com participação total de 80%. Neste contexto o petróleo recebe destaque, sendo responsável por 36% da energia produzida (BRASIL, 2006).

No cenário brasileiro observa-se, além do crescimento econômico e industrial, um aumento de 118% da frota de veículos na última década, totalizando 64.817.974 veículos em todo o país (DENATRAN, 2011). Como consequência disto há um aumento do uso de combustíveis, e, por conseguinte, do petróleo. O consumo brasileiro de petróleo no ano 2000 foi de 75.867 mil barris.d⁻¹, enquanto no ano 2009 foi de 83.582 mil barris.d⁻¹. Assim, a produção brasileira de petróleo, no ano de 2009, foi de 109,8 milhões m³. Os derivados energéticos corresponderam a 84,2% do total produzido. Deste volume total, o óleo diesel teve participação de 39,1% ou 42,9 milhões m³, sendo o combustível mais produzido no país (ANP, 2010).

Apesar da comprovada eficiência dos combustíveis derivados do petróleo e de seu custo de produção ser relativamente baixo quando comparado com outras fontes de energia (PLÁ, 2002), a crescente preocupação com os aspectos ambientais e a finitude das reservas de petróleo fizeram com que se repensasse o uso desses como a principal fonte de combustível.

Estudos relacionando o uso do petróleo e seus combustíveis derivados com seus impactos ambientais demonstram que estes são tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e que possuem substâncias de baixa biodegradabilidade (GRIFFIN & CALDER, 1976; GAUR & SIGHN 1989; AL-YAKOUB *et.al.*, 1996; LOCKHART *et. al.*, 1996; LEMOS 2003; VIEIRA, F. C. dos S., 2004; BARSINIÉ *et. al.*, 2006; VANZELLA *et. al.*, 2006; MIRANDA, 2007; HOLLEBONE, 2009; RODRIGUES *et. al.*, 2010; entre outros). Além disso, MENICONI *et. al.* (2002) destacam que os derramamentos de petróleo e seus combustíveis derivados são os principais responsáveis pela contaminação orgânica presente nos corpos hídricos. Somado aos

problemas ambientais, observa-se o esgotamento progressivo das reservas mundiais de petróleo, pois elas crescem a taxas inferiores ao crescimento do consumo. Considerando as condições de reservas de petróleo comprovadas, taxas de crescimento das reservas e taxas de crescimento do consumo no ano de 2006, governos e cientistas estimam que as reservas de petróleo mundiais durem em torno de 41 anos (BRASIL, 2006). Avaliando os dados de reservas e consumo de petróleo no Brasil, fornecidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, nota-se que as reservas brasileiras de petróleo, mantido o nível de consumo atual, durariam 17,5 anos (ANP, 2011). É provável que haja um incremento das reservas atuais, principalmente devido ao pré-sal, porém há uma tendência de crescimento mais tímida do que o crescimento do consumo, assim como no cenário mundial.

Neste contexto, cientistas e governantes despertam para a necessidade de geração de um combustível alternativo aos provenientes do petróleo, com funcionamento semelhante, porém menos poluente. Assim, ocorre uma mudança na matriz energética mundial, sendo adicionado, como uma alternativa ao combustível vindo do petróleo, o combustível proveniente da biomassa. No caso da substituição ao óleo diesel, usa-se o biodiesel. O biodiesel é um biocombustível derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais renováveis, usado em motores a combustão interna com ignição por compressão, que pode substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (BRASIL, 2005^a).

No Brasil, o biodiesel foi introduzido na matriz energética através da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Esta estabelece que até o ano de 2013 seja introduzido o biodiesel na matriz energética do país, sendo fixado em 5% (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado, em qualquer parte do território nacional. A Resolução CNPE nº 6 de 26 de outubro de 2009 antecipa a obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao diesel comercializado para a data de 1º de janeiro de 2010 (CNPE, 2009). Portanto, a introdução do biodiesel na matriz energética do país deu-se na forma de misturas binárias de óleo diesel/biodiesel. Para o cumprimento das metas legais foi necessária a produção de 1.608.053 m³ de biodiesel no ano de 2009 (BRASIL, 2011^a).

Observa-se então que altas quantidades de combustíveis estão diariamente sendo produzidas e transportadas no país. Na fabricação e distribuição destes existem riscos de acidentes, podendo acarretar

contaminação de ecossistemas. Quando ocorre um derramamento de combustível no meio ambiente, este composto sofre inúmeros processos de partição ambiental que determinam o destino do poluente e seus possíveis impactos ambientais. Pesquisadores afirmam que a dissolução, representada pela FSA (Fração Solúvel em Água) do combustível, é responsável por grande parte da contaminação ambiental causada por esses acidentes (GRIFFIN & CALDER, 1977; SAEED & AL-MUTAIRI, 1999; ALMEIDA-VAL *et. al.*, 2002; NAVAS *et. al.*, 2006). Além disso, os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição causada, sendo ela aquática, atmosférica ou depositada no solo (FLEEGER *et. al.*, 2003).

O biodiesel apresenta-se como uma alternativa ao óleo diesel porque é um combustível de fonte renovável, biodegradável, que pode ser usado em motores diesel sem nenhuma modificação (KOETHE, 2006). Suas emissões de monóxido de carbono, enxofre, hidrocarbonetos e material particulado são consideravelmente reduzidas em relação aos combustíveis derivados do petróleo (USEPA, 2002^a; KOETHE, 2006). Porém, as emissões de óxidos nitrosos são mais elevadas, principalmente devido ao uso de fertilizantes nitrosos nas culturas agrícolas (USEPA, 2002^a).

Estudos demonstram os impactos do uso do biodiesel com base nas emissões tóxicas. No entanto, poucas pesquisas têm focado as informações ecotoxicológicas da FSA (Fração Solúvel em Água) do óleo diesel e do biodiesel, e o benefício da adição do biodiesel ao óleo diesel, em termos da toxicidade aquática.

Assim, para compreender melhor os possíveis efeitos deletérios desses compostos sobre sistemas vivos, é necessária aplicação de modelos toxicológicos. A toxicologia ambiental é uma ciência que visa estudar os efeitos nocivos causados aos organismos vivos por substâncias químicas liberadas no ambiente. Para o conhecimento destes efeitos usam-se testes toxicológicos. Estes testes consistem na exposição de organismos a concentrações conhecidas de uma ou mais substâncias-teste, ou a fatores ambientais, por um período de tempo determinado (CETESB, 1990). Ao longo desta exposição são observados os efeitos causados aos organismos e calculado o grau de toxicidade da substância a ser testada. Os testes toxicológicos podem ser realizados no âmbito da toxicologia global (ex: toxicidade aguda e toxicidade crônica) ou específica (ex: efeitos mutagênicos e carcinogênicos). Estes testes podem evidenciar os efeitos deletérios de curta ou longa duração, os

efeitos de alteração da estrutura do DNA e o desenvolvimento de tumor induzidos por xenobióticos.

1.1 RELEVÂNCIA DA PESQUISA

Este estudo faz parte de um projeto do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do Departamento de Eng. Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, intitulado Estudo da toxicidade, genotoxicidade e citotoxicidade da fração solúvel do biodiesel fabricado de mamona e de soja, que tem como órgão financiador o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Neste trabalho foi realizado um estudo de relevância com buscas nos seguintes bancos de dados: Science Direct, Web of Science, Scopus, PubMed, ACS Publications, Portal CAPES, Scielo Brasil, PERGAMUM, entre outros. Foi observado que a pesquisa referente aos efeitos tóxicos causados pela interação da FSA do óleo diesel, biodiesel e misturas com organismos aquáticos está em estágio inicial. Há diferenças relevantes em relação às frações em água estudadas, bem como metodologia de obtenção das mesmas. Além disso, a maioria dos trabalhos utiliza o peixe como organismo-teste. Portanto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de mais estudos nesta área, devido à carência de dados sobre possíveis efeitos tóxicos que podem ser causados por estes combustíveis, uma vez que o biodiesel, o diesel, e as misturas binárias diesel/biodiesel vêm sendo cada vez mais utilizadas e pouco estudadas quanto ao aspecto da toxicologia aquática. Assim, este estudo tem como principal objetivo obter informações de efeitos tóxicos da FSA (fração solúvel em água) do biodiesel, diesel, e B5, através de testes de toxicidade aguda, testes de toxicidade crônica e teste de mutagenicidade. Este estudo intenciona contribuir para a comunidade científica, órgãos de regulação, órgãos de controle ambiental, empresas e indústrias, informando a respeito dos efeitos toxicológicos causados no ecossistema aquático por acidentes envolvendo os combustíveis diesel, biodiesel e B5, para, desta forma, auxiliar na tomada de decisão sobre as medidas necessárias de prevenção, proteção e remediação dos impactos causados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade da FSA do biodiesel do diesel, e B5 através de testes de toxicidade aguda, teste de toxicidade crônica e teste de mutagenicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as composições das FSA do biodiesel, do diesel e do B5 através de análises cromatográficas;
- Avaliar a toxicidade aguda das diferentes FSA das amostras de combustíveis estudadas utilizando o microcrustáceo aquático *Daphnia magna* e a bactéria marinha *Vibrio fischeri* como organismos-testes;
- Avaliar a toxicidade crônica para os parâmetros longevidade, reprodução e crescimento das FSA do biodiesel, do diesel e do B5, utilizando o microcrustáceo aquático *Daphnia magna* como organismo-teste;
- Avaliar o potencial mutagênico das FSA do biodiesel, do diesel e do B5 para eritrócitos sanguíneos dos peixes *Oreochromis niloticus* (tilápia) através do teste do micronúcleo.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

3.1.1 Generalidades

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos provenientes das interações de substâncias químicas com organismos vivos. O principal objetivo dessa ciência está relacionado com a identificação dos riscos associados a uma determinada substância ou composto e determinação das condições de exposição em que esses riscos são induzidos (WILLIAMS; JAMES; ROBERTS, 2000).

A toxicologia, de uma forma geral, é dividida em três grandes ramos: toxicologias clínica, forense e ambiental. A toxicologia clínica estuda o efeito de medicamentos e drogas sobre pacientes humanos, enquanto a toxicologia forense tem o objetivo de detectar o uso ilegal de agentes tóxicos para fins judiciais. A toxicologia ambiental estuda o destino dos agentes tóxicos e de seus metabólitos e produtos de degradação tanto no ambiente como nas cadeias alimentares, bem como o efeito desses contaminantes sobre os organismos e as populações (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Toxicologia ambiental é o estudo dos efeitos nocivos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas liberadas no ambiente. Para Azevedo e Chasin (2003) o termo toxicologia ambiental é utilizado para referir-se ao estudo dos efeitos nocivos causados pela interação de agentes contaminantes do ambiente com organismos vivos, enquanto o termo ecotoxicologia é empregado para relacionar os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre comunidades e populações de um ecossistema bem definido, incluindo o estudo dos caminhos de transferência desses agentes e sua interação com o ambiente.

Apesar de muitas vezes os termos ecotoxicologia e toxicologia ambiental serem utilizados como sinônimos, esta colocação é errônea, pois a ecotoxicologia é uma extensão da toxicologia ambiental (COSTA *et. al.*, 2008). A ecotoxicologia estuda os efeitos tóxicos causados por agentes químicos ou físicos em populações de organismos vivos ou ecossistemas, ao passo que a toxicologia ambiental observa os efeitos tóxicos causados sobre os organismos

individualmente. Ainda segundo Matias (2009), baseando-se nos fundamentos da toxicologia tradicional, observa-se que é possível um fator ambiental exercer efeitos graves sobre organismos individuais e não apresentar impacto sobre populações ou ecossistemas.

Tanto a toxicologia ambiental como a ecotoxicologia são ciências multidisciplinares que englobam muitas áreas de estudo, tais como biologia, química, anatomia, genética, fisiologia, microbiologia, ecologia, epidemiologia, estatística, leis e estudos de solo, água e atmosfera (YU, 2005). Assim, os estudos de toxicologia ambiental dividem-se em estudos de toxicidade sobre a atmosfera, hidrosfera e litosfera (COSTA *et. al.*, 2008).

A toxicologia aquática tem o objetivo de avaliar o efeito de xenobióticos sobre organismos representativos da coluna d'água ou sobre sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha (RAND, 1995; ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Para a determinação da toxicidade de uma substância são realizados testes de toxicidade para detectar e avaliar a capacidade do agente tóxico em produzir efeitos nocivos aos organismos vivos. Esses testes são muito utilizados, pois os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição causada, sendo ela aquática, atmosférica ou depositadas no solo (FLEEGER *et. al.*, 2003).

Os primeiros relatos de utilização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos datam da década de 1920, onde eram utilizados peixes como organismos-testes. Atualmente, ensaios de toxicidade com diversos organismos aquáticos estão padronizados, internacional e nacionalmente, por associações de normatização, como: Association Française de Normalisation, American Society for Testing and Materials, American Water Work Association, Deutsches e Organization for Economic Co-Operation and Development, Associação Brasileira de Normas Técnicas, (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006), além da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB).

3.1.2 Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais que têm como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias a serem analisadas, bem como o seu grau de toxicidade. Para isso, organismos vivos são expostos a diferentes concentrações das substâncias e

analisam-se os efeitos adversos causados sobre elas, como por exemplo, imobilidade, morte, alterações físicas e funcionais, entre outros (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Estes testes são utilizados para mensurar os danos que uma substância causa aos organismos vivos expostos, comparar diferentes substâncias químicas e comparar a sensibilidade de diferentes organismos aquáticos a um mesmo xenobiótico (RAND, 1995).

Os testes de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência de efeitos adversos em um curto espaço de tempo em relação ao ciclo de vida do organismo-teste, após a exposição desses a uma única dose da substância-teste. A duração deste teste é variável, sendo normalmente de 24 a 96 horas para organismos aquáticos. Os efeitos (parâmetros) observados neste tipo de teste são a letalidade ou a imobilidade para caso de organismos aquáticos muito pequenos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; COSTA *et. al.*, 2008). A letalidade refere-se à morte do organismo, enquanto a imobilidade é determinada através da incapacidade do organismo-teste em nadar na coluna d'água durante um período de até 15 segundos, após uma leve agitação do recipiente (ABNT, 2004). O resultado dos testes de toxicidade aguda normalmente é expresso através da concentração letal mediana (CL_{50}) ou da concentração efetiva mediana (CE_{50}) (RAND, 1995; ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A Concentração Letal mediana (CL_{50}) refere-se à concentração real da amostra que causa a morte de 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio; enquanto a Concentração Efetiva mediana (CE_{50}) refere-se à concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio, sendo este normalmente caracterizado pela imobilidade. Outro resultado obtido nos testes de toxicidade aguda é a CE_{zero} , representada pela concentração efetiva da amostra onde não se observa imobilidade maior que 10% nos organismos expostos (ABNT, 2004).

Os testes de toxicidade crônica são testes de longa duração, onde a exposição é contínua ao longo do tempo, abrangendo todo ou parte do ciclo de vida do organismo-teste. Os principais parâmetros observados neste tipo de teste são os efeitos crônicos subletais, como alterações nas atividades respiratórias, cardíacas, bioquímicas, no desenvolvimento, nas funções biológicas, na reprodução e no crescimento, que não causam necessariamente a morte do organismo

(AZEVEDO; CHASIN, 2003). Geralmente a avaliação dos testes de toxicidade crônica é feita através da concentração de efeito tóxico não observado (CENO), que é a maior concentração do produto que não causa efeito sobre os organismos; e a menor concentração de efeito observado (CEO) (COSTA *et. al.*, 2008). Para a realização destes testes devem ser utilizados, no mínimo, dois níveis de doses ou concentrações, e a via de administração destas deve estar de acordo com a via de exposição mais provável (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

As normas brasileiras existentes em relação a testes de toxicidade são as aprovadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), que muitas vezes institui as normas da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), sendo que essas são normalmente baseadas nas metodologias propostas por instituições internacionais.

3.1.3 Organismos- testes

Existem inúmeros organismos aquáticos que podem ser utilizados como organismo-teste para testes de toxicidade aquática. Com relação ao organismo escolhido Rand *et. al.* (1995) destacam que deve-se observar: a seletividade constante e elevada aos contaminantes, a disponibilidade e abundância do organismo desejado, a uniformidade e estabilidade genética nas populações, a representatividade de seu nível trófico, a ampla distribuição e importância comercial e a facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. A fim de facilitar a interpretação dos resultados Costa *et. al.* (2008) salienta que devem ser utilizadas espécies cuja fisiologia, genética e comportamento sejam bem conhecidos.

Recomenda-se que sejam utilizadas mais de uma espécie representativa do ecossistema aquático e de níveis tróficos diferentes para testes com a mesma substância, objetivando representar de forma mais clara e realista a toxicidade do xenobiótico testado (RAND, 1995; ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

3.1.3.1 *Daphnia magna*

A *Daphnia magna* é um microcrustáceo de água doce, cosmopolita do hemisfério norte, com tamanho médio entre 5 a 6 mm (ALVES; SILVANO, 2006). É popularmente conhecida como pulga da

água, devido aos movimentos específicos das segundas antenas que lhe dão a aparência de se deslocar em pequenos saltos. As *D. magna* possuem uma carapaça transparente que encobre o seu tronco, e termina na parte posterior em um espinho apical. Em seu abdômen posterior, dispõe de pinças especiais destinadas a limpeza da carapaça. A cabeça possui dois pares de antenas sendo que seu segundo par de antenas serve para a locomoção. O primeiro par, de tamanho inferior, funciona como órgão sensorial. Essa espécie suporta águas com pH entre 6,5 e 9,5, sendo pH ótimo entre 7,2 e 8,5 (CLARE, 2007). A Figura 3.1 mostra o organismo *D. magna*.



Figura 3.1 Microcrustáceo aquático *Daphnia magna*

Fonte: a autora

Sua principal fonte de alimentação são algas unicelulares que filtra do meio ambiente (KNIE; LOPES, 2004). Devido ao seu tipo de alimentação, elas adaptam-se bem à *blooms* de algas, pois se encontram em um ambiente com grandes concentrações de proteínas e carboidratos. O seu ciclo de vida varia entre, cerca de 40 dias a 25 °C, e 56 dias a 20°C. Quando mantida em laboratório, esta espécie tem, normalmente, juvenis de 2 em 2 dias e precisa de 6 a 10 dias para dar origem à primeira ninhada (CIMAR, 2007). Em condições ambientais favoráveis esses microcrustáceos reproduzem-se por partenogênese, originando apenas fêmeas (ALVES; SILVANO, 2006). Este tipo de reprodução favorece esses organismos, pois são gerados filhotes idênticos aos originais, padronizando desta forma os organismos a serem testados (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis, como baixas temperaturas ou grande densidade e subsequente acumulação de produtos excretórios, estas induzem o aparecimento de ovos sexuados, ou efípios (CIMAR,

2007). De acordo com BARNES (1977) os efípios podem resistir à seca e ao congelamento eclodindo somente quando as condições naturais forem apropriadas.

Segundo KNIE e LOPES (2004) a larga utilização da *Daphnia magna* como organismo-teste fundamenta-se nos seguintes critérios:

- asseguridade de certa uniformidade de respostas nos ensaios devido ao fato dos descendentes serem idênticos;
- ciclo de vida e de reprodução curto, o que facilita a sua utilização para testes crônicos;
- é de fácil cultivo e manuseio simples;
- é internacionalmente conhecida como organismo-teste.

3.1.3.2 *Vibrio fischeri*

A bactéria marinha *Vibrio fischeri* é uma enterobactéria (anaeróbia facultativa e Gram negativa), pertencente a família Vibrionaceae, uma grande família consistindo em muitas espécies, que são caracterizadas pela cooperação e interação com tecidos de outros animais. Anteriormente conhecida como *Photobacterium phosphoreum*, a *V. fischeri* possui uma distribuição global, sendo encontrada em pequenas quantidades em vida livre nos oceanos, ou em grandes quantidades em áreas isoladas, ou associadas a outros organismos marinhos. Com relação a associação de bactérias com outros organismos marinhos, as bactérias marinhas luminescentes podem ser isoladas de intestinos de peixes e invertebrados, em crescimento saprófito em organismos marinhos mortos (peixes, crustáceos), ou em crescimento simbiótico nos órgãos leves de peixes e em camarões ou lulas (HARMEL, 2004).

Em condições ambientais favoráveis, a *V. fischeri* emite naturalmente uma luz azul-esverdeada, necessitando de condições de oxigênio acima de 0,5 mg/L (CETESB, 2001; KNIE; LOPES, 2004) e altas concentrações de células (PAVEZ *et. al.*, 2006). Esta bioluminescência produzida pela *Vibrio fischeri* é a base para vários testes de toxicidade. Atualmente há várias normas padronizando os testes que utilizam as bactérias *V. fischeri* como organismo-teste. Dentre estas destacam-se as metodologias americanas:

- ISO 11348-1 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias recém cultivadas (ISO, 1998^a);

- ISO 11348-2 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias desidratadas (ISO, 1998^b);
- ISO 11348-3 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias liofilizadas (ISO, 1998^c);
- a norma alemã: DIN 38412-37 (DIN, 1999);
- e as normas Brasileiras, descritas a seguir.

No Brasil, os testes de toxicidade com bactérias luminescente foram padronizados pela Norma Técnica L5.227, elaborada no ano de 1987 e revisada no ano de 2001 pela CETESB (CETESB, 2001), e pelas normas técnicas 15411-1 (ABNT, 2006^a), 15411-2 (ABNT, 2006^b) e 15411-3 (ABNT, 2006^c). Todas essas normas tratam dos testes de toxicidade de maneira similar a ISO 11348, utilizando bactérias recém cultivadas, desidratadas e liofilizadas, respectivamente.

Os testes de toxicidade que empregam a bactéria *V. fischeri* como organismo-teste baseiam-se na diminuição da bioluminescência causada pelo contato da substância teste com as bactérias. Esta diminuição da luminosidade emitida pelas bactérias ocorre devido à interferência das substâncias tóxicas sobre a respiração celular dos organismos (HOLLEBONE *et. al.*, 2008). A Figura 3.2 mostra um conjunto de bactérias *Vibrio fischeri*.

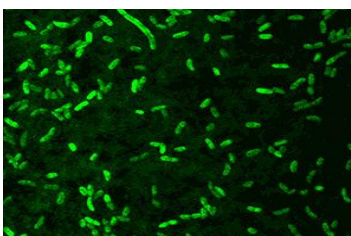


Figura 3.2 – Bactérias marinhas bioluminescentes *Vibrio fischeri*
Fonte: HWANG *et. al.* (2009).

3.1.4 Teste do micronúcleo

São considerados agentes genotóxicos as substâncias que interagem com o DNA alterando sua estrutura ou função. Quando essas alterações se fixam de forma a poderem ser transmitidas, ocorre uma mutação. As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto, fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, dependendo da quantidade, do tipo e do local da

mutação, essas podem causar doenças tanto aos indivíduos como aos seus descendentes, e, também, alterar o balanço do ecossistema (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2006).

Nos anos 60, devido ao avanço industrial ocorrido pós-guerra, surgiu à necessidade de controlar a quantidade de produtos lançados no meio ambiente, fazendo surgir uma preocupação com a exposição humana aos mutágenos químicos (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2006). Assim, desde essa época, pesquisa-se sobre metodologias de testes de genotoxicidade de curta duração, estudando-se testes mutagênicos, carcinogênicos e suas relações.

Dentre os testes de genotoxicidade desenvolvidos, a ocorrência de micronúcleos serve como o primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica (PRETTI *et. al.*, 2007). A presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células (CARRANO; NATARAJAN, 1988).

A avaliação da presença de micronúcleos se constitui em um dos métodos para a medida de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, ou ainda de erros de segregação, uma vez que o micronúcleo resulta da produção de fragmentos acêntricos, ou de cromossomos inteiros que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula em anáfase. Quando a célula entra em telófase, tanto fragmentos acêntricos como cromossomos com quebras cromossômicas ou cromatídicas, ou ainda, cromossomos inteiros perdidos por problemas no fuso mitótico, são incluídos nas células filhas, podendo se fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais núcleos secundários: os micronúcleos (HEDLLE *et. al.*, 1983 *apud* SILVA, 2000).

Os micronúcleos são facilmente detectados em células interfásicas como corpúsculo intracitoplasmáticos livres. Estes corpúsculos são pequenos, arredondados a ovais, encontrados no citoplasma normalmente ao lado do núcleo principal. A sua semelhança com o núcleo principal em forma, textura, coloração e conteúdo de DNA é que facilita sua detecção (RIBEIRO *et. al.*, 2003).

Inicialmente este estudo era desenvolvido com êxito somente em mamíferos (UDROIU, 2006). Em 1982, Hoffman e Raat utilizaram metodologias adaptadas de teste do micronúcleo em peixes. Em 1991, Flora *et. al.* analisaram os efeitos carcinogênicos em peixes e concluíram

que os efeitos observados nesses organismos eram semelhantes aos observados em mamíferos, o que ocorre, provavelmente, devido a analogia na metabolização cancerígena ou mutagênica desses organismos. Portanto, o peixe é um organismo propício para o monitoramento de sistemas aquáticos, bem como análise de químicos solúveis, pois são capazes de metabolizar xenobióticos e poluentes acumulados. Outros autores ressaltam a semelhança entre o metabolismo de mamíferos e peixes, destacando o peixe como um organismo-teste adequado para o ensaio descrito (UDROIU, 2006; BARSINIÉ *et. al.*, 2006; LEMOS *et. al.*, 2007; FERREIRA; NEPOMUCENO, 2008).

O teste do micronúcleo destaca-se por ser um teste rápido e sensível, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais como numéricas, além de possibilitar o uso de diferentes tecidos do organismo-teste (RODRIGUEZ-CEA *et. al.*, 2003). Este teste tem sido usado por mais de 30 anos em estudos de genotoxicidade (FENECH *et. al.*, 2003). Atualmente ele tem sido amplamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* e *in situ*, com a vantagem de ser simples e rápido na detecção de danos cromossômicos induzidos, além de ser bem aceito por várias autoridades regulamentadoras.

3.2 COMBUSTÍVEIS

3.2.1 Contextualização

O alto gasto de energia despertado pela industrialização, juntamente com o crescente desenvolvimento econômico observado nas últimas décadas, fez com que o consumo de combustíveis aumentasse vertiginosamente. Juntamente com este desenvolvimento vem o risco de acidentes envolvendo esses produtos e conseqüente contaminação do meio ambiente. Quando ocorre um derramamento de um combustível no meio ambiente, este composto sofre inúmeros processos de partição ambiental (evaporação, dissolução, fotólise, adsorção sobre as partículas, sedimentação e absorção pela biota) que determinam o destino e as concentrações do poluente, bem como seus possíveis impactos ambientais. Com relação aos processos de partição ambiental Griffin e Calder (1977) e Almeida-Val *et. al.* (2002) destacam que a toxicidade dos combustíveis pode ser atribuída, em sua maior parte, à fração solúvel deste composto. Ainda, Saeed e Al-Mutairi (1998)

afirmam que a dissolução é um processo muito importante a ser avaliado em um acidente envolvendo combustíveis, principalmente quando fala-se em toxicidade ambiental. Assim, a FSA de um combustível apresenta grande importância em estudos referentes a impactos ambientais causados por acidentes. Além disso, a FSA merece destaque nos estudos toxicológicos pois é a responsável pelos efeitos causados a longo-termo, além de poder afetar regiões não atingidas pelo derramamento (NAVAS *et. al.*, 2006). A solubilidade de um composto é definida como a máxima concentração de um soluto dissolvido em água (SCHWARZENBACH *et. al.*, 2003), ela pode ser estimada através de experimentos ambientais ou através da observação de parâmetros físico-químicos já estudados. A composição da FSA depende da composição do óleo, temperatura, salinidade e da relação entre volumes de água e óleo (SHIU *et. al.*, 1990).

3.2.2 Óleo diesel

O petróleo é um composto orgânico fóssil, composto basicamente por uma mistura complexa de hidrocarbonetos associada a pequenas quantidades de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Dependendo da caracterização, do número de átomos de carbono e da estrutura dos hidrocarbonetos que integram o petróleo, têm-se diferentes propriedades que determinam o seu uso como combustível, lubrificante, cera ou solvente (IMP, 2009).

O óleo diesel é um combustível formado na primeira destilação do petróleo e pode ser definido como uma complexa mistura de hidrocarbonetos que variam de C₉ a C₃₀, contendo compostos aromáticos, n-alcanos, iso e cicloalcanos, enxofre, nitrogênio e compostos oxigenados (EHC 171, 1996). É impossível determinar uma definição exata da composição dos combustíveis derivados do petróleo devido às diferentes fontes de óleo cru e diferentes processos de otimização dos produtos.

A FSA do petróleo e dos seus combustíveis derivados é composta por uma mistura de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), BTEXs, fenóis, hidrocarbonetos alifáticos e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (ANDERSON *et. al.*, 1974). Dentre essas substâncias as principais responsáveis pela toxicidade de organismos aquáticos são os HPAs e os Hidrocarbonetos Monoaromáticos compostos pelos BTEX – Benzeno, Tolueno,

Etilbenzeno e Xileno (ANDERSON *et. al.*, 1974; SINGER *et. al.*, 2001; SIMONATO *et. al.*, 2008; RODRIGUES *et. al.*, 2010).

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) formam uma extensa classe de substâncias orgânicas contendo dois ou mais anéis aromáticos fundidos, podendo ou não conter grupos substituintes ligados (HYLLAND, 2006). Devido à alta detecção de HPAs no meio ambiente e ao fato de esses compostos apresentarem toxicidade e potencial carcinogênico, a United States Environment Protection Agency (USEPA), agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América, estabeleceu 16 hidrocarbonetos poliaromáticos considerados particularmente importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Fluoranteno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-c,d]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]perileno (USEPA, 1986).

Apesar de estes compostos apresentarem potencial carcinogênico em baixas concentrações solúveis, os HPAs possuem baixa solubilidade em água. Devido a sua natureza hidrofóbica, a solubilidade aquosa dos HPAs diminui quando estes fazem parte de uma mistura, pois os compostos tendem a permanecer no óleo devido a sua baixa polaridade (SHIU *et. al.*, 1990).

Os BTEXs (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) são hidrocarbonetos monoaromáticos muito encontrados nos combustíveis de origem fóssil. Estes compostos apresentam um elevado risco em derramamentos de combustíveis, pois são os hidrocarbonetos mais solúveis, além de serem voláteis, sendo portanto encontrados no ar e na água. Rodrigues *et. al.* (2010) e Carls e Rice (1990) destacam que os BTEXs são os compostos mais abundantes na FSA de petróleo e de seus derivados. Quanto à solubilidade em água dos hidrocarbonetos aromáticos do petróleo XIE *et. al.* (1997) e SHUKLA *et. al.* (2007) destacam que a salinidade interfere na solubilidade desses compostos, diminuindo suas concentrações solúveis.

3.2.3 Biodiesel

O uso de óleos vegetais como combustíveis não é algo recente. Em 1900, Rudolf Diesel apresentou seu motor em combustão (que posteriormente foi batizado com seu nome) em funcionamento à base de

óleo de amendoim. Porém, já no início do século XX, ficou comprovado que a utilização de óleos vegetais sem qualquer modificação causava problemas ao funcionamento dos motores (RANESES *et. al.*, 1999), devido à alta viscosidade, a baixa volatilidade e o caráter poliinsaturado destes óleos, que ocasionam combustão incompleta (ENCINAR *et. al.*, 1999). Visando contornar esses problemas, diferentes alternativas de modificação dos óleos têm sido consideradas, tais como diluição, microemulsão com álcool, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com álcool. Atualmente, o método mais utilizado é o de transesterificação (RANESES *et. al.*, 1999; KNOTHE, 2006). Essas modificações no óleo vegetal deram origem ao biodiesel.

A transesterificação é um processo de conversão de triglicerídeos a ésteres de ácidos graxos e glicerina, através da reação com um álcool, que formará o álcool éster correspondente, normalmente com a presença de um catalisador (ácido ou base forte) (KNOTHE, 2006). A Figura 3.3 apresenta um esquema ilustrando a reação de transesterificação, onde R_1 , R_2 e R_3 são cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados e R_4 são grupos alquilas. O álcool mais utilizado é o metanol, formando assim os ésteres metílicos de ácidos graxos. Portanto, o biodiesel pode ser definido como um combustível composto de mono - alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais.

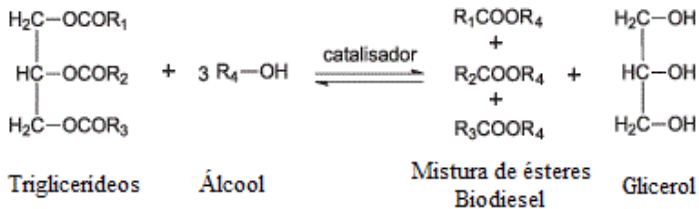


Figura 3.3 Esquema da reação de transesterificação para a formação do biodiesel

Fonte: LEUNG *et. al.*, 2006.

O biodiesel pode ser composto, principalmente, dos seguintes ésteres metil ou etil esterificados: caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, palmitato, estearato, araquidato, behenato,

linoleato, ricinoleato, linolenato e eicosanoato (MOSER, 2009). Os metil/etil ésteres de ácidos graxos são compostos de baixa complexidade estrutural que possuem baixa solubilidade quando comparados com compostos do petrodiesel (VON WEDEL, 1999). Os ésteres metílicos do biodiesel possuem concentrações de saturação, a 17°C, de 7 ppm em água salina e 14 ppm em água doce (VON WEDEL, 1999).

O biodiesel pode ser produzido utilizando-se uma grande variedade de matérias-primas, podendo ser originadas de gordura animal (usualmente sebo), por óleos vegetais (óleos de soja, caroço de algodão, palma, mamona, canola, girassol, coco) ou ainda óleos de descarte (óleos de descarte de frituras). Os principais fatores determinantes na escolha da matéria-prima tratam-se de fatores geográficos e econômicos (KNOTHE, 2006). Dentre as principais matérias-primas utilizadas no Brasil a soja recebe destaque, devido às grandes áreas plantadas e baixo custo de produção. Além disso, a maior parte do biodiesel produzido no mundo também é proveniente do óleo de soja (FERRARI *et. al.*, 2005; KNOTHE, 2006).

Segundo a legislação brasileira biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (BRASIL, 2005^a). O biodiesel é miscível com o diesel em qualquer proporção (KOETHE, 2006), e em muitos países ele tem sido acrescentado a matriz energética na forma de misturas binárias diesel/biodiesel. Para a identificação das misturas dos combustíveis é usada a nomenclatura BX, onde X refere-se à porcentagem em volume do biodiesel presente no combustível. Por exemplo, os combustíveis B5, B20, B100, referem-se a misturas de diesel/biodiesel, contendo respectivamente 5%, 20%, e 100% de biodiesel em volume.

A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira deu-se pela lei n° 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Ela estabelece que seja introduzido o biodiesel na matriz energética brasileira, sendo fixado em 5% (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado. O prazo disposto para tal foi de oito anos após a sua publicação, sendo de três anos o período para a utilização de um percentual mínimo de 2% em volume (BRASIL, 2005^a). A Resolução CNPE n° 6 de 26 de outubro de 2009 antecipa a obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao diesel comercializado para a data de 1° de janeiro de 2010 (CNPE, 2009). Assim, atualmente

utiliza-se a mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5) em todo território nacional.

O uso do biodiesel apresenta vantagens ambientais em relação ao óleo diesel, pois o biodiesel é um combustível de fonte renovável, biodegradável, que produz reduzidas emissões dos gases de exaustão. O biodiesel ainda possui excelente lubricidade, alto ponto de fulgor, e pode ser usado em motores a combustão sem nenhuma modificação (KOETHE, 2006).

Dentre as principais desvantagens do uso deste combustível destaca-se o custo de produção, que é mais elevado que o dos combustíveis derivados do petróleo, a diminuição do rendimento do motor causado por esse combustível, podendo ser até 10% inferior ao óleo diesel quando usado B100 e as altas emissões de óxidos nitrosos (NO_x) (PLÁ, 2002; KOETHE 2006).

3.2.4 Aspectos ambientais sobre os combustíveis

Os efeitos do uso do biodiesel relacionados à poluição atmosférica são bem documentados. O uso do biodiesel em detrimento ao óleo diesel, bem como as misturas diesel/biodiesel reduzem as emissões de enxofre, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e material particulado. Este benefício se dá pela ausência de enxofre na composição do biodiesel, bem como pelo aumento do teor de oxigênio que melhora a eficiência de combustão deste combustível. Em contrapartida, há um aumento na emissão de óxidos nitrosos (NO_x) (VON WEDEL, 1999). Este aumento na emissão de NO_x pode ser agravado pelas grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados utilizados nas culturas agrícolas. Estudos da USEPA (2002^a) que avaliaram as emissões em motores de carga pesada, constataram que, com o uso de biodiesel em motores à diesel, houve uma redução de aproximadamente 70% nas emissões de hidrocarbonetos, redução de 48% nas emissões de monóxido de carbono e material particulado e um aumento de 10 % nas emissões de NO_x (USEPA, 2002^a). Além disso, o biodiesel é produzido através de culturas agrícolas que assimilam o dióxido de carbono (CO_2) da atmosfera para se tornarem plantas e posteriormente óleo vegetal. Assim, o CO_2 lançado na queima do combustível pode ser recuperado na produção das próximas culturas. Portanto, segundo Von Wedel (1999), quanto à questão de poluição atmosférica, o biodiesel apresenta um balanço energético mais favorável

do que o petrodiesel. Já pesquisadores da CONCAWE, EUCAR e JRC (2006) ressaltam que, pelo fato de o biodiesel ser produzido através de culturas agrícolas, o balanço energético depende da quantidade de fertilizantes nitrogenados utilizados, bem como do tipo de solo, tipo de cultura, clima e cobertura do solo, podendo haver diferenças significativas para cada biodiesel produzido. Além disso, impactos como biodiversidade, acidificação, eutrofização e compactação do solo, devem ser considerados em análises mais criteriosas sobre os benefícios do uso do biodiesel como substituto ao óleo diesel. Para a biodegradação do biodiesel e do diesel, estudos demonstram que o tempo de meia-vida para a degradação de metil ésteres é 2 a 2,5 vezes mais rápido que o do petrodiesel, nas condições dos estudos (VON WEDEL, 1999; HOLLEBONE, 2009). Gomes (2008) observou, avaliando a biodegradação de biodieseis em microcosmos, uma degradação de 86% do biodiesel de soja em 41 dias. Já Peterson *et. al.* (1996), avaliando e comparando a degradação do biodiesel de colza e do diesel em 23 dias, encontraram uma degradação de 95% para o biodiesel e de apenas 40% para o diesel.

Quanto à toxicidade aquática, tema de estudo do presente trabalho, existem estudos que avaliam a toxicidade do biodiesel e diesel. Porém há falta de trabalhos nessa área é latente, dificultando a comparação direta de resultados, visto a diferença na composição dos combustíveis estudados, diferentes formas de produção dos biodieseis, divergências nas metodologias dos estudos e variações dos organismos-testes utilizados.

Estudos que comparam a toxicidade aquática do óleo diesel e de biodieseis observaram uma considerável diminuição da toxicidade aquática em amostras de biodiesel (PETERSON; MULLER, 2006; KHAN *et. al.*, 2007; DeMELLO *et. al.*, 2007; SILVA *et. al.*, 2007; HOLLEBONE *et. al.*, 2008). Porém, há diferenças no valor da toxicidade dependendo da matéria-prima do biodiesel e da metodologia de preparo dos testes. Trabalhos que avaliaram a toxicidade do biodiesel utilizando diretamente o combustível para a realização do teste (PETERSON; MULLER, 2006) encontraram uma elevada toxicidade para as amostras testadas, mas esta toxicidade refere-se, provavelmente, à natureza física das amostras.

Khan *et. al.* (2007) estudaram os efeitos toxicológicos causados pelas FSA do biodiesel, óleo diesel e misturas desses sobre os organismos-testes *Oncorhynchus mykiss* (peixe truta arco-íris) e

Daphnia magna, através da realização de testes de toxicidade aguda. O biodiesel estudado foi proveniente de óleos e gorduras recicláveis. Os pesquisadores concluíram que a FSA do biodiesel é consideravelmente menos tóxica para os organismos aquáticos do que a FSA do óleo diesel convencional. Porém, os resultados demonstraram que ainda assim há um risco substancial para os organismos aquáticos no caso de uma contaminação por biodiesel. O organismo-teste *Daphnia magna* apresentou valores de CL_{50} mais baixos que o peixe truta arco-íris, mostrando que os microcrustáceos estudados são mais sensíveis para as amostras testadas. Hollebone *et. al.* (2008) pesquisaram a toxicidade de cinco amostras de combustíveis sobre os mesmos organismos-testes acrescentando testes com a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*. As amostras avaliadas foram: dois combustíveis provenientes do petróleo (diesel com ultra-baixo teor de enxofre e diesel com baixo teor de enxofre) e três biodieseis provenientes de diferentes matérias-primas (biodiesel de óleo de soja, biodiesel de óleo de canola e biodiesel de gordura animal). A pesquisa avaliou a fração dispersa em água e a fração solúvel em água. Os resultados mostraram que todas as amostras foram tóxicas a todos os organismos-testes e todos os métodos de obtenção das amostras, com o petrodiesel apresentando valores de CL_{50} mais baixos que as amostras de biodiesel, conseqüentemente maior toxicidade. Porém as frações solúveis em água das amostras de biodiesel apresentaram baixa toxicidade. Os dados de sensibilidade dos organismos para as amostras testadas corroboram com os observados por Khan *et. al.*, sendo as bactérias o organismo mais sensível, seguida dos microcrustáceos e dos peixes.

Silva *et. al.* (2007) avaliaram a toxicidade de eluatos de combustíveis fósseis comuns (gasolina e óleo diesel) e eluatos de biodieseis derivados de óleo de soja sobre os peixes da espécie *Danio rerio*. Os resultados demonstraram que os eluatos do biodiesel metílico de soja não apresentaram toxicidade sobre o organismo-teste estudado. Todas as outras amostras apresentaram toxicidade, sendo os eluatos de craqueamento de soja bruto mais tóxico que os eluatos de gasolina e óleo diesel, mostrando assim a diferença de toxicidade que o mesmo produto pode apresentar conforme o seu processo de produção.

Leite *et. al.* (2011) avaliaram a toxicidade aguda da FSA dos biodieseis de mamona, palma e óleo residual de frituras sobre o crescimento da microalga *Tetraselmis chuii* e a mortalidade do ouriço do mar *Echinometra lucunter*. O estudo mostrou que a FSA do

biodiesel de mamona é mais tóxica que as FSA dos demais biodieseis, seguida pela FSA do biodiesel de óleo de cozinha e FSA do biodiesel de óleo de palma. Eles avaliaram também a influência do contaminante metanol na produção da toxicidade. Observaram que a concentração de metanol mais elevada era referente ao biodiesel mais tóxico (biodiesel de mamona) enquanto a menor concentração de metanol encontrada foi para o biodiesel de palma, que apresentava a menor toxicidade. Os autores concluíram então que o metanol é o principal contaminante responsável pela toxicidade das FSA de biodieseis.

Com relação à toxicidade do óleo diesel e óleo cru de petróleo, existem estudos que demonstram a toxicidade global da fração solúvel em água do petróleo e de seus combustíveis derivados, bem como estudos envolvendo as suas substâncias que apresentam maior toxicidade (HPA e BTEX). Estudos comparativos sobre os efeitos toxicológicos das FSA do óleo cru e de seus derivados mostraram que a FSA do óleo diesel apresenta uma toxicidade mais elevada que a FSA do petróleo (óleo cru) (GRIFFIN; CALDER, 1977; GAUR; SIGHN 1989; LEMOS 2003; RODRIGUES *et. al.*, 2010).

Quanto à toxicidade global, os estudos evidenciaram que tanto a FSA do petróleo bruto, como do óleo diesel, dos HPAs e dos HTPs (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) apresentaram elevada toxicidade para diferentes espécies de peixes (AL-YAKOOB *et. al.*, 1996; LOCKHART *et. al.*, 1996; POLLINO; HOLDWAY, 2002; OMEGERIE 2002; DEDE, 2001; KAZLAUSKIENE *et. al.*, 2008). Exposições agudas da truta arco-íris a 0,5 mg/L de HTP resultaram em anomalias do desenvolvimento desses organismos-testes (POLLINO; HOLDWAY, 2002). Já os efeitos agudos observados para as frações solúveis em água de diesel e petróleo expostas às larvas do peixe *Odontesthes Argentinensis* apresentaram CL₅₀ de 70,68% para o petróleo e 13,46 % para o diesel (RODRIGUES *et. al.*, 2010). LOCKHART *et. al.* (1996) demonstrou que a exposição crônica (30 dias) de peixes juvenis a FSA do óleo cru do petróleo matou 100% da população de organismos-testes em uma concentração de 300 µg/L. Quanto aos efeitos histopatológicos da exposição aguda de peixes à FSA do petróleo cru e à FSA do óleo diesel, estudos demonstraram que houve um alongamento das brânquias dos peixes, hiperplasia lamelar (DEDE, 2001), anomalias nas pseudobrânquias e nos tecidos do esôfago e fígado (RODRIGUES *et. al.*, 2010).

Estudos sobre a indução de micronúcleos em FSA de petróleo e óleo diesel demonstraram que houve a observação de micronúcleos a partir da concentração de 0,5 mg/L da FSA do óleo cru (BARSINIÈ *et. al.*, 2006) e após 24 horas de exposição à FSA do óleo diesel (VANZELLA *et. al.*, 2007).

3.3 LEGISLAÇÃO PERTINENTE

No âmbito federal as legislações referentes aos parâmetros de qualidade das águas são: Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 200, Resolução CONAMA 396 de 3 de abril de 2008 e Resolução CONAMA 430 de 13 de maio de 2011.

A Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005^b) dispõe sobre a classificação dos corpos da água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Os padrões de qualidade das águas determinados por esta resolução estabelecem limites individuais para cada substância em cada classe. Portanto, para o entendimento dos dados importantes para esta pesquisa os padrões serão explicados separadamente para cada classe.

Para as águas doces de classe especial, que são destinadas ao abastecimento para consumo humano, após desinfecção; águas doces de classe 1, que são destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; águas doces de classe 2, destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; e águas salinas de classe 1, destinadas à recreação de contato primário, é definido que: os óleos e graxas devem estar virtualmente ausentes e não se pode verificar efeito tóxico crônico a organismos, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido.

Para as águas doces de classe 3, que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado é definido que : os óleos e graxas devem estar virtualmente ausentes e não se pode verificar efeito tóxico agudo a organismos, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido.

Para as águas salinas e salobras de classe 2, que podem ser destinadas à pesca amadora e à recreação de contato secundário, é definido que os óleos e graxas devem estar virtualmente ausentes. Já

para as águas doces de classe 4 e águas salinas e salobras de classe 3, que são destinadas à navegação e à harmonia paisagística, é definido que, para óleos e graxas, toleram-se iridescências. A referida resolução também apresenta valores máximos permitidos para os BTEXs e HPAs individualmente, conforme a classificação das águas. Esses valores são encontrados na Tabela A1.1 do Apêndice A. Além disso, esta resolução ainda prevê que interações entre substâncias não poderão conferir às águas características capazes de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida.

A Resolução CONAMA 396 (BRASIL, 2008) dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas. Os parâmetros ambientais referentes ao presente trabalho dispostos nesta resolução estão expressos na Tabela A1.2 do Apêndice A.

A Resolução CONAMA 430 (BRASIL, 2011^b) dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e complementa e altera a Resolução nº357, de 17 de março de 2005. As metas obrigatórias para corpos receptores são estabelecidas por parâmetros específicos, portanto, assim como para as resoluções já citadas, para o entendimento dos dados importantes para esta pesquisa foram expostos os limites permitidos para o lançamento de efluentes na Tabela A1.3 do Apêndice A.

Com relação às condições e padrões de lançamento de efluentes a Resolução CONAMA 430 define ainda que: não são permitidos óleos vegetais e gorduras animais em uma concentração superior a 50 mg.L^{-1} e o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Os ensaios de toxicidade devem considerar pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

Na ausência de critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental para avaliar o efeito tóxico do efluente no corpo receptor, a Resolução define que: para efluentes lançados em corpos receptores de água doce Classes 1 e 2, e águas salinas e salobras Classe 1, a concentração do efluente no corpo receptor deve ser igual ou inferior a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) ou deve ser menor ou igual a um décimo da Concentração Letal Efetiva (CE_{50}); já para efluentes lançados em corpos receptores de água doce Classe 3, e

águas salinas e salobras Classe 2, a concentração do efluente no corpo receptor deve ser menor ou igual à um terço da CE_{50} .

No âmbito estadual, o estado de Santa Catarina possui uma legislação específica referente à toxicidade representada pela Portaria FATMA 017 de 18 de abril de 2002, que estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens. Esta Portaria não estabelece valores limites de toxicidade para águas superficiais ou subterrâneas.

A Portaria 017 (BRASIL, 2002) estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para os microcrustáceos *Daphnia magna* (Straus, 1820) e para as bactérias bioluminescentes *Vibrio Fisheri*, dos efluentes de diferentes categorias, conforme a Tabela A1.4 do Apêndice A.

Para as atividades não inseridas na Tabela A1.4 do Apêndice A, a Portaria estabelece em seu artigo § 4º os Limites Máximos de Toxicidade Aguda, abaixo mencionados:

- Fator de Diluição para *Daphnia magna* (FDd) : 8 (12,5%);
- Fator de Diluição para *Vibrio fisheri* (FDbl) : 8 (12,5%).

Para os testes de toxicidade a legislação preconiza que os testes devem ser determinados em laboratório e que devem ser realizados testes ecotoxicológicos padronizados, cujos resultados deverão ser expressos em Fator de Diluição (FD), que é equivalente ao parâmetro CE_{zero} descrito na ABNT 12713 (ABNT, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESQUEMA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

A Figura 4.1 apresenta um esquema geral da metodologia desenvolvida

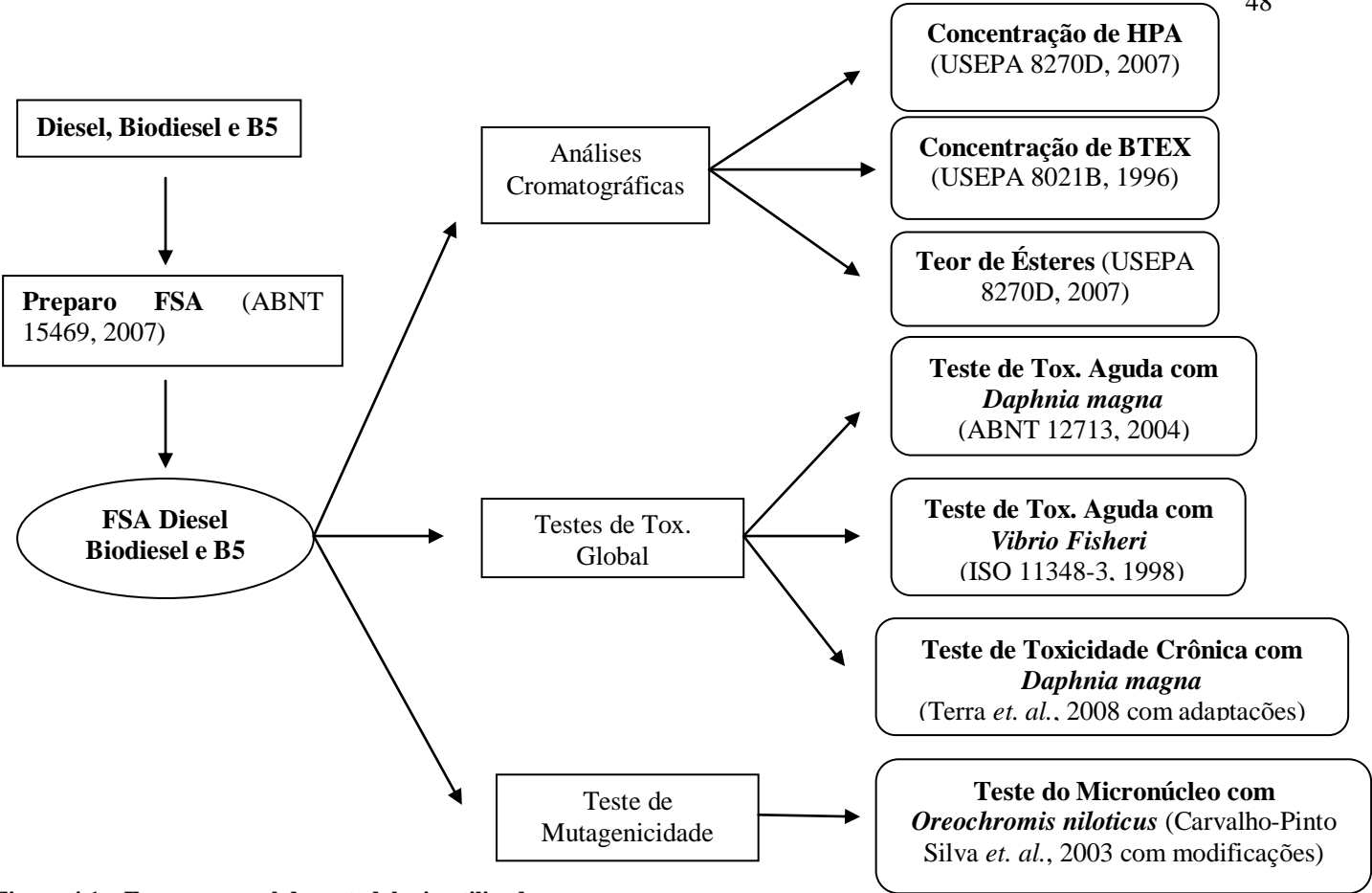


Figura 4.1 – Esquema geral da metodologia utilizada

4.2 SUBSTÂNCIA-TESTE

O biodiesel avaliado foi doado pela empresa BIOPAR – Bioenergia do Paraná Ltda. Este biodiesel foi produzido por transesterificação por rota metílica utilizando óleo de soja (95%) e gordura animal (05%) como matéria-prima, portanto trata-se de um éster metílico de óleo misto. O diesel utilizado foi doado pelo REMAS – Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas – do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC. O B5 foi preparado misturando-se 380 mL de diesel e 20 mL de biodiesel, perfazendo um combustível contendo 95 % de diesel e 5% de biodiesel (V/V).

4.3 PREPARO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA

As soluções-teste deste estudo são as Frações Solúveis em Água dos combustíveis avaliados. Segundo a norma ABNT 15469 (2007), a fração solúvel em água pode ser definida como: “solução aquosa de uma amostra de baixa miscibilidade em água, obtida após procedimento de extração com água” (ABNT, 2007, p. 2).

A metodologia utilizada seguiu as orientações da norma ABNT 15469 (2007), com exceção da FSA obtida para a realização dos testes de toxicidade crônica. Para o preparo da FSA foram misturadas, com o auxílio de agitadores magnéticos, uma parte da amostra em nove partes de água de diluição do teste em uma relação volume/volume (V/V). As amostras permaneceram sob agitação constante durante 20 horas em uma velocidade de agitação de forma que o vórtex formado não ultrapassasse 25% da coluna do líquido, na ausência de luminosidade e com temperatura constante. Ao término do tempo de mistura as amostras permaneceram em repouso durante 1 a 2 horas. Em seguida foi recolhida a fase aquosa para a realização dos ensaios toxicológicos.

A metodologia usada para a obtenção da FSA utilizada nos testes de toxicidade crônica seguiu as orientações da norma ABNT 15469 (2007) com modificações. Foram misturadas uma parte da amostra em quatro partes de água destilada em uma razão volume/volume (V/V). As amostras permaneceram sob agitação nas condições do preparo anterior. As alíquotas de fase orgânica e água utilizadas não devem afetar as amostras obtidas, pois em ambas as

metodologias foram utilizadas as concentrações de saturação dos combustíveis. A diferença entre o uso do diluente ou água destilada interfere substancialmente na diluição 100% (amostra bruta), pois o uso do diluente fornece as condições de sobrevivência necessárias aos organismos testados, garantindo que a imobilidade seja causada somente pela interação com a substância-teste. Porém, neste ensaio, a diluição 100% não foi avaliada. A primeira diluição analisada foi de 25%, garantindo desta forma, as condições de sobrevivência dos organismos. A Figura 4.2 mostra a estrutura para o preparo da FSA das amostras para o teste de toxicidade crônica.



Figura 4.2 – Preparo da FSA para os testes de toxicidade crônica

Foram analisados os parâmetros físico-químicos pH e oxigênio dissolvido (OD) das FSA afim de observar se as características das soluções-teste preparadas poderiam afetar os testes de toxicidade que foram realizados posteriormente. Para as medições de pH e OD foram utilizados o pHmetro digital da marca Quimis modelo Q400-A e o oxímetro AT 130 da marca Alfakit, devidamente calibrados.

4.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As FSA das amostras foram preparadas na unidade de preparo de amostras do LABTOX – Laboratório de Toxicologia do Departamento de Eng. Sanitária e Ambiental da UFSC. As análises

cromatográficas foram realizadas pela empresa Analytical Technology situada na cidade de São Paulo – SP – Brasil.

Com os objetivos de analisar as composições e fazer a quantificação das frações solúveis em água das amostras, foram realizadas análises de hidrocarbonetos aromáticos para as amostras de diesel e B5 e análises do teor de ésteres para as amostras de biodiesel e B5. Os hidrocarbonetos avaliados foram HPA e BTEX, pois estas são as principais substâncias responsáveis pela toxicidade aquática da FSA das amostras de petróleo e seus derivados, segundo Anderson *et. al.* (1974), Singer *et. al.* (2001), Simonato *et. al.* (2008) e Rodrigues *et. al.* (2010). As FSA dos combustíveis foram preparadas com os diluentes dos testes de toxicidade, portanto foram utilizadas diferentes matrizes para a sua obtenção. Assim, a Tabela 4.1 apresenta as diferentes nomeações das amostras com especificação da matriz utilizada para a obtenção da FSA correspondente.

Tabela 4.1 – Descrição das amostras de FSA obtidas com especificação da matriz utilizada

Amostra	Especificação Matriz
Diesel Crônico	Água destilada
B5 Crônico	Água destilada
B100 Crônico	Água destilada
Diesel Agudo <i>D. magna</i>	Meio diluente ISO
B5 Agudo <i>D. magna</i>	Meio diluente ISO
B100 Agudo <i>D. magna</i>	Meio diluente ISO
Diesel Agudo <i>V. fischeri</i>	Meio diluente - Cloreto de Sódio 2%
B5 Agudo <i>V. fischeri</i>	Meio diluente - Cloreto de Sódio 2%
B100 Agudo <i>V. fischeri</i>	Meio diluente - Cloreto de Sódio 2%
Diesel MN	Água de abastecimento desclorada
B5 MN	Água de abastecimento desclorada
B100 MN	Água de abastecimento desclorada

Legenda:C= Concentração; MN = Micronúcleo.

O meio diluente ISO foi preparado segundo as orientações da norma ABNT 12713 (2004). Em um béquer com 1 L de água destilada foram adicionados 3,2 mL de Cloreto de Cálcio em uma concentração de 73,5 mg.L⁻¹, 0,8 mL de Sulfato Magnésio Heptahidratado em uma concentração de 123,3 mg.L⁻¹, 0,8 mL de Cloreto de Potássio em uma

concentração de $5,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,8 \text{ mL}$ de Bicarbonato de Sódio em uma concentração de $64,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Após a solução foi mantida sob aeração durante o tempo mínimo de 12 horas para a solubilização total dos sais e saturação adequada do oxigênio dissolvido. O pH foi mantido entre 7,0 e 8,0.

As análises de HPA e teor de ésteres foram realizadas de acordo com as orientações da USEPA 8270D (2007). Inicialmente as amostras foram preparadas conforme a metodologia USEPA 3500 (USEPA, 2007). Para a avaliação do teor de ésteres as amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso (CG) Trace com PTV com backflush equipado com um detector por ionização em chama (FID). Já as análises de HPA foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (CG) Trace com PTV com backflush acoplado com um espectrômetro de massa da marca Thermo Fisher Scientific. Os dados foram avaliados e arquivados pelo software ChromQuest versão 4.2.

As análises de BTEX foram realizadas de acordo com orientações do método USEPA 8021B (1996), que é utilizado para determinar os compostos orgânicos voláteis em uma variedade de matrizes. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso (CG) modelo Trace GC com HeadSpace Tekmar Autosampler 7000 equipado com um detector por ionização em chama (FID). Os dados foram avaliados e arquivados pelo software ChromQuest versão 3.1.6. O gás de arraste foi o nitrogênio e a coluna utilizada foi a OV-1, com 30 metros de comprimento, $0,53 \text{ mm}$ de diâmetro interno e espessura do filme de $3 \mu\text{m}$. A quantificação das amostras foi realizada por padronização interna.

4.5 ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

O acondicionamento das amostras, tanto para envio para as análises cromatográficas, como para a realização dos testes de toxicidade, foi realizado conforme orientações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998) com exceção dos testes de toxicidade crônica com *Daphnia magna*.

Para as análises cromatográficas, as amostras para análise de HPA foram acondicionadas em vidro âmbar com septo teflon, mantidas refrigeradas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o tempo máximo de 7 dias. Nas amostras preparadas para análise de BTEX foram adicionadas 8 gotas de ácido Clorídrico (HCl) 50% , elas foram acondicionadas em vials com septo

teflon/silicone, com refrigeração de $4 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o tempo máximo de 14 dias. As amostras analisadas para Teor de Ésteres foram acondicionadas em recipientes plásticos com batoque, mantidas refrigeradas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o tempo máximo de 7 dias.

Para os testes de toxicidade as amostras de diesel e B5 foram acondicionadas em vidro âmbar com septo teflon, enquanto as amostras de biodiesel foram guardadas em recipientes plásticos com batoque. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o tempo máximo de 7 dias.

4.6 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM O MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

4.6.1 Cultivo do microcrustáceo *Daphnia magna*

O cultivo dos microcrustáceos *D. magna* foi realizado segundo as normas ISO 6341 (1996) e DIN 38412 (1989). Foram utilizados recipientes de vidro com capacidade de 1,5 L contendo água reconstituída como meio de cultivo M4 (ISO, 1996; ABNT, 2004), meio utilizado para crescimento dos organismos. Os organismos foram alimentados diariamente com cultura algácea de *Scenedesmus subspicatus*. Em cada lote de cultivo foram mantidos de 20 a 30 indivíduos, sendo exclusivamente fêmeas. Os lotes foram mantidos em ambiente com temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 16 horas, condições obtidas com o uso de uma germinadora. Três vezes por semana foi realizada a troca do meio de cultura e retirada dos filhotes e carapaças.

4.6.2 Controle da sensibilidade dos organismos-teste

Os organismos foram testados em nível de sensibilidade, visando assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados conforme a ISO 6341 (1996). Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda com a substância de referência Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Foram considerados aptos para utilização em testes, os neonatos produzidos em lotes de cultivo que apresentaram $\text{CE}_{50, 24 \text{ horas}}$ entre 0,6 e 1,7 mg.L^{-1} de Dicromato de Potássio (ISO, 1996).

4.6.3 Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia magna*

O princípio do teste de toxicidade aguda com *D. magna* consiste na exposição de indivíduos jovens por um período de 24 a 48 horas a várias diluições de uma amostra, sobre o qual é verificado seu efeito sobre a capacidade natatória desses organismos. Foi utilizada a metodologia de teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *D. magna* descrita na ABNT 12713 (2004). Inicialmente foram realizados testes preliminares objetivando definir as concentrações (diluições) que seriam avaliadas. Após, as amostras foram testadas com base na exposição de neonatos de *D. magna* com 2 a 26 horas de idade, no controle negativo e em diferentes diluições da amostra 100% (FD = 1), 50 % (FD = 2), 25% (FD = 4), 12,5% (FD = 8), 6,25% (FD = 16), por um período de 48 horas. O controle negativo foi composto somente de água de diluição do teste. Como água de diluição foi utilizado o meio ISO conforme descrito na norma ISO 6341 (1996) e na ABNT 12713 (2004). Foram expostos 20 organismos-testes por diluição da amostra testada, sendo que para cada diluição foram feitas duas réplicas, sendo, portanto adicionados 10 neonatos por réplica. O teste foi mantido a temperatura de 20 a 22°C, sem alimentação ou iluminação. Após o tempo de prova (48 horas) foi observado o número de indivíduos imóveis por diluição (concentração) testada, definida a CE_{50} e observada a CE_{zero} . A CE_{50} representa a Concentração Efetiva que causa efeito agudo a 50% dos organismos testados. A CE_{zero} refere-se ao menor valor de diluição da amostra na qual não se observa imobilidade maior que 10% nos organismos expostos (ABNT, 2004). A $CE_{50, 48horas}$ foi calculada utilizando-se os métodos estatísticos Probit Method (Weber, 1993) para dados paramétricos e Trimmed Sperman-Karber Method (Hamilton *et. al.*, 1977) para dados não paramétricos. A Figura 4.3 apresenta um esquema do teste de toxicidade aguda com *D. magna*.

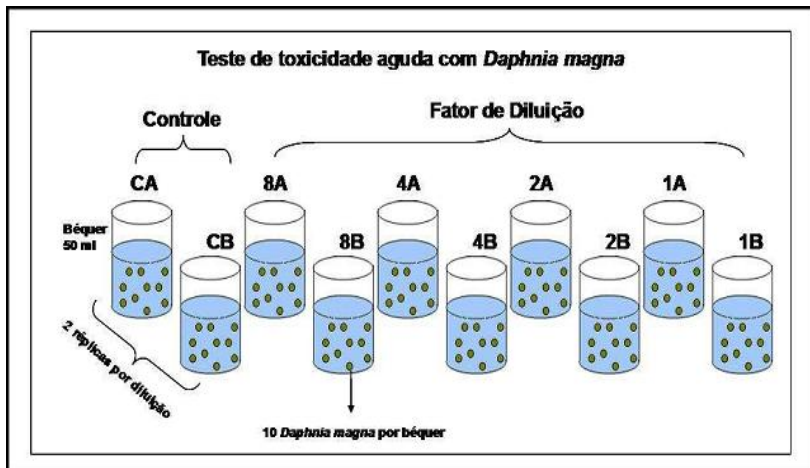


Figura 4.3 – Esquema do teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*
 Fonte: FUZINATTO, 2009

4.6.4 Teste de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Daphnia magna*

O princípio do teste de toxicidade crônica com *D. magna* consiste na exposição de indivíduos jovens, por um período que abranja toda ou uma parte do ciclo de vida do organismo, a várias diluições de uma amostra, sobre o qual é verificado qualquer efeito deletério na população exposta (RAND *et. al.*, 1995).

Os testes de toxicidade crônica realizados seguiram a metodologia usada por Terra *et. al.* (2008) com adaptações. A fração solúvel em água dos combustíveis foi preparada no início do teste, separada em alíquotas e congelada. Para realização dos testes de toxicidade crônica, foram utilizados organismos jovens, com 2 a 26 horas de idade. Esses foram expostos ao controle e a várias diluições da amostra (25% (FD4), 12,5% (FD8), 6,25% (FD16), 3,12% (FD32) e 1,56% (FD64)), por um período de 21 dias, sendo usado como diluente o M4 (meio de cultivo). Foram utilizadas 10 réplicas, dispondo individualmente 1 organismo jovem de *D. magna* em béqueres de 50 mL. Cada béquer recebeu uma alíquota de 25 mL da solução-teste. O teste foi mantido nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo. Foi realizado um acompanhamento diário dos organismos-teste, onde foi observada e registrada a sobrevivência e o número de jovens

gerados por fêmea. Os procedimentos necessários a manutenção adequada dos testes foram realizados três vezes por semana, sendo feito a retirada dos possíveis filhotes, substituição da solução-teste antiga, manutenção da *D. magna* adulta e alimentação dos organismos através da cultura algácea de *Scenedesmus subspicatus* conforme indicado na norma ABNT 12713 (2004). Este procedimento caracteriza este teste como semi-estático. A Figura 4.4 apresenta um esquema demonstrativo do teste de toxicidade crônica utilizando *D. magna* como organismo-teste.

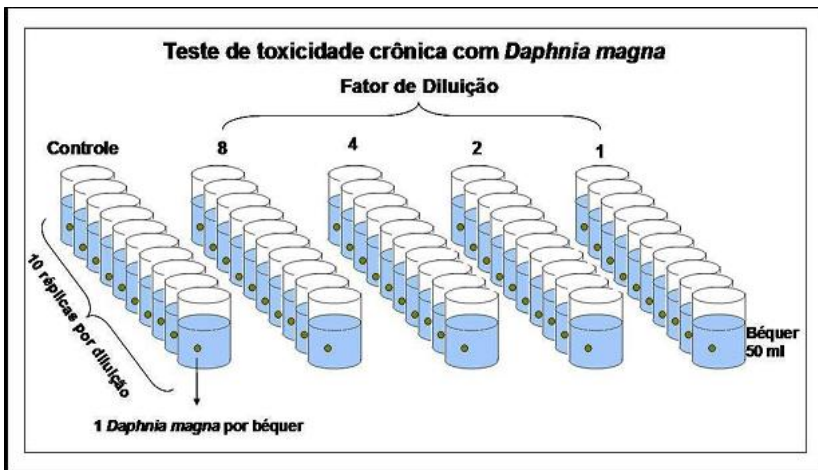


Figura 4.4 - Esquema do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*
Fonte: FUZINATTO, 2009.

Os parâmetros analisados no teste foram: longevidade, fecundidade e crescimento. Para a determinação da longevidade foi observada a sobrevivência dos organismos-teste. Este parâmetro foi expresso pelo número de *Daphnias* adultas sobreviventes ao fim dos 21 dias de teste. A fecundidade foi avaliada através da contagem dos filhotes gerados por réplica no período de duração do teste. Para a avaliação da fecundidade foi considerado o número total de filhotes por réplica dividido pelo número de posturas desta réplica. A média de filhotes por diluição foi a média de filhotes das réplicas desta diluição. No caso da existência de um macho entre os organismos-testes adultos que foram testados, este foi usado como dado para avaliação da

longevidade, mas não entrou nos dados de crescimento e fecundidade, conforme orientações de Brentano (2006).

O crescimento foi avaliado através da variação de comprimento dos organismos testados, sendo considerado comprimento total do organismo a distância entre a cabeça até o final da carapaça da *D. magna*, como ilustrado na Figura 4.5. A medição foi realizada no final do teste, através do auxílio de uma lupa de aumento de 40 vezes e uma lâmina com escala milimetrada de 1 cm. O Apêndice B apresenta um exemplo da tabela padrão utilizada para o acompanhamento dos dados obtidos neste ensaio.

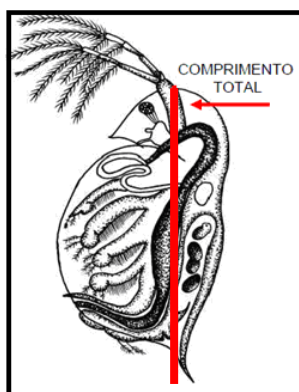


Figura 4.5 - Comprimento total da *Daphnia magna*

Fonte: BRENTANO (2006) com adaptações.

Para a interpretação dos dados obtidos com o controle foi utilizada a análise estatística recomendada pela USEPA, EPA 821-R-02-013 (USEPA, 2002^b). Para estes, foram usados os testes de Dunnett, quando o número de réplicas em todo o grupo for similar, ou o teste de Dunnett com ajuste de Bonferroni quando o número de réplicas não for o mesmo em todos os tratamentos. Os testes foram realizados através do programa computacional Dunnett Program versão 1.5. Este programa baseia-se no princípio da comparação múltipla, onde realiza a comparação dos resultados obtidos no controle com as diluições, com um nível de significância de 95%. Foram analisadas as diferenças significativamente superiores e inferiores ao controle. A menor concentração em que esta diferença excede este valor é considerada como CEO (Concentração de Efeito Observado). Determinada a CEO

foi originada a CENO (Concentração de Efeito Não Observado) como sendo a concentração imediatamente inferior a CEO.

4.7 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM A BACTÉRIA *Vibrio fischeri*

O teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* é fundamentado na medição da luminescência das bactérias, registradas por um aparelho denominado luminômetro, que é capaz de medir e registrar a quantidade de luz emitida por essas bactérias.

A metodologia utilizada no teste foi a desenvolvida para o equipamento Microtox® 500, que é baseada na metodologia proposta pela ISO 11348-3 (1998^c). O sistema Microtox® consiste de um luminômetro com unidade integrada de comando e medição, e um termobloco embutido neste luminômetro. Os procedimentos a serem executados para a realização do teste foram controlados pelo software Microtox Omni 4.0 que é gerenciado pelo próprio equipamento.

Inicialmente foram necessários alguns controles da amostra, sendo esses: pH, OD e salinidade. A salinidade mínima necessária para a realização dos ensaios é de 20 g.L⁻¹ de Cloreto de Sódio (NaCl). Como a FSA foi preparada com o diluente do teste, não foi necessária a correção da amostra quanto ao aspecto salinidade. O OD não pode ser inferior a 0,5 mg/L. O pH da amostra deve apresentar-se entre 6 e 8,5. Foi necessário proceder ao ajuste do pH com a adição de hidróxido de sódio 1N, pois as amostras apresentaram valores de pH inferiores a 6. Foi realizado teste de sensibilidade para a validação do lote de bactérias utilizado. As bactérias utilizadas pertencem a linhagem NRRL B-11177 provenientes da SDI®, denominado Microtox Acute Reagent®. A substância de referência usada foi o Sulfato de Zinco Heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O) na concentração de 100 mg.L⁻¹. O valor da CE_{50,15min} de referência para esta substância encontra-se entre 3-10 mg.L⁻¹. Além da toxicidade deve ser determinado o fator de correção da amostra, que deve estar entre 0,6 e 1,8. Após, foram realizados os testes de toxicidade aguda com as amostras avaliadas.

O teste de toxicidade foi realizado em temperatura controlada pelo equipamento, que mantém a série de diluições do teste em 15°C ± 1°C e o reagente bacteriano em 3°C. A medição da intensidade luminosa emitida pelas bactérias foi realizada no primeiro contato com a amostra

e após 15 minutos. A toxicidade da amostra é dada pela diferença de luminosidade registrada entre estas duas medidas.

Os resultados do teste foram determinados através da $CE_{50,15min}$, que corresponde à concentração efetiva que causa a inibição de 50% da luminescência, e da CE_{zero} . Os cálculos da $CE_{50,15min}$ e a determinação da CE_{zero} foram realizados pelo software do equipamento.

Devido à necessidade de adição de soluções para a realização do teste é impossível a verificação da toxicidade da amostra bruta, sendo que a maior concentração da amostra testada foi de 80 %. Foram avaliadas as diluições 80% (FD 1), 50% (FD 2), 33,33% (FD3), 25% (FD 4), 16,67% (FD 6), 12,50% (FD 8), 8,33% (FD 12) e 6,25% (FD 16). O diluente utilizado foi o Cloreto de Sódio (NaCl) 2%.

4.8 TESTE DE MUTAGENICIDADE

4.8.1 Aclimação dos peixes

O organismo-teste utilizado neste ensaio foi o peixe *Oreochromis niloticus* (peso médio = $30,0 \pm 0,3$ g; comprimento médio = 12 ± 2 cm). A escolha do *O. niloticus* se deve ao fato de este ser um peixe comumente encontrado em pisciculturas, e da facilidade de sua aclimação e manejo em laboratório. Os peixes foram aclimatados por um período de 15 dias, em tanques com aproximadamente 400 L contendo água desclorada, temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e aeração constante, conforme metodologias descritas por Simonato *et al.* (2008) e Ogundiran *et al.* (2010), com adaptações. A cada 48 horas foi retirado o material fecal, renovada a água do tanque e os organismos foram alimentados com ração para alevinos contendo 42% de proteína e 500 mg/kg de vitamina C, da marca Supra, linha Acqua line.

4.8.2 Teste do micronúcleo

O objetivo deste teste foi avaliar o potencial mutagênico das amostras estudadas, considerando a CE_{50} encontrada nos testes de toxicidade aguda. Portanto os organismos-teste foram expostos a diluição de 90% da FSA de biodiesel e 40% da FSA de diesel e B5. Como na amostra de biodiesel houve a morte dos organismos expostos, optou-se pela avaliação da diluição de 40% para todos combustíveis, possibilitando desta forma uma comparação direta dos resultados

encontrados. Além da diluição testada os organismos foram expostos ao controle negativo (água mineral) e ao controle positivo (dicromato de potássio em uma concentração de 2,5 mg/L) (MISHRA; MOHANTY, 2008). O teste do micronúcleo realizado seguiu a metodologia utilizada por Carvalho-Pinto Silva *et. al.* (2003) com modificações. Em cada aquário foram acondicionados dois peixes. Após o tempo de exposição (48 horas) foi retirado o sangue da medula inserindo a agulha na espinha dorsal dos organismos testados, com o auxílio de uma seringa contendo anticoagulante, para a realização de esfregaços em lâminas de microscopia. Foram preparadas duas lâminas por peixe. Os esfregaços foram fixados em metanol (P.A.) durante 20 minutos, permanecendo secando em temperatura ambiente. Após 24 horas as lâminas foram coradas com Brometo de Etídio/Acridine Orange, onde o material nuclear é diferenciado do citoplasma pela coloração laranja intensa. A Figura 4.6 apresenta os passos para a preparação dos esfregaços realizados no teste do micronúcleo.

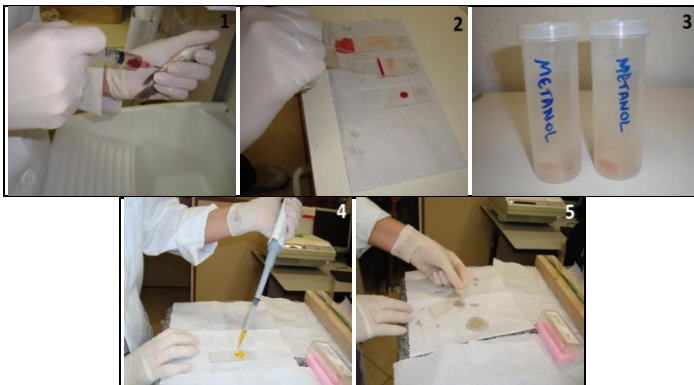


Figura 4.6 – Preparação dos esfregaços para o teste do micronúcleo

A análise das lâminas foi realizada em microscópio fluorescente (Olympus BX40) com uma magnificação de 1000x. Foram consideradas para a análise somente células íntegras (membranas celular e nuclear intactas). Para a determinação do número de eritrócitos micronucleados foram analisados, em teste cego, 2000 eritrócitos por organismo-teste. O critério adotado para a identificação dos micronúcleos foi o de TATES *et. al.* (1980) *apud* SILVA (2000) que define micronúcleo como inclusões citoplasmáticas esféricas que apresentam contorno definido,

com diâmetro de $1/10$ a $1/3$ em relação ao núcleo, com coloração e estrutura similar ao mesmo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas com o intuito de analisar as composições das frações solúveis em água e quantificar as concentrações de algumas substâncias contidas na fase solúvel. A quantificação permite que as análises toxicológicas sejam expressas na unidade massa.volume⁻¹, o que é importante para a avaliação da toxicidade das amostras e para a comparação com dados bibliográficos. Foram realizadas análises dos hidrocarbonetos HPA e BTEX para as FSA do diesel e do B5 e de teor de ésteres para as FSA do biodiesel e do B5. Os resultados foram expressos em mg.L⁻¹, ou seja, ppm.

5.1.1 Análises de hidrocarbonetos

Os principais compostos responsáveis pela toxicidade aquática do óleo diesel são os BTEX e os HPAs (ANDERSON *et. al.*, 1974; SINGER *et. al.*, 2001; SIMONATO *et. al.*, 2008; ROGRIGUES *et. al.*, 2010). As frações solúveis em água do óleo diesel e do B5 apresentaram consideráveis concentrações de BTEX e baixas concentrações de HPA de baixo peso molecular, como o Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno e Antraceno. Considerando hidrocarbonetos solúveis como a soma de BTEX e HPA, as concentrações de hidrocarbonetos solúveis encontradas nas amostras de diesel variaram de 5,75 ppm a 7,63 ppm, enquanto as amostras de B5 obtiveram uma variação de 5,21 ppm até 6,71 ppm. Esta diferença ocorre devido às distintas matrizes utilizadas para a obtenção das FSA. As amostras de B5 obtiveram concentrações ligeiramente inferiores as observadas para o diesel para as respectivas amostras. Estes valores eram previstos visto que o combustível B5 é composto por 95% de óleo diesel. Estes resultados demonstram que não houve efeito de co-solvência entre os hidrocarbonetos do diesel e os compostos solúveis do biodiesel. Os resultados das análises de hidrocarbonetos (HPA e BTEX) para as amostras das frações solúveis em água de diesel e B5 estão expressos nas Tabelas A2.1 e A2.2 do Anexo A. A Figura 5.1 mostra um comparativo das concentrações solúveis finais encontradas para as diferentes amostras.

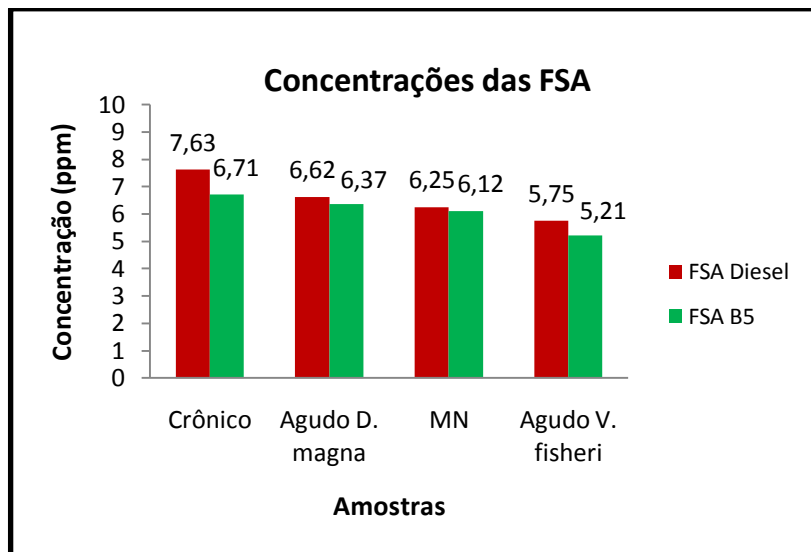


Figura 5.1 – Comparativo das concentrações de hidrocarbonetos solúveis para as diferentes amostras estudadas

Legenda: MN = Micronúcleo

A salinidade interfere diretamente na solubilidade dos hidrocarbonetos do petróleo. As concentrações das amostras preparadas com água destilada utilizadas no teste crônico (nomeadas como Crônico) foram mais elevadas que as demais, seguida das preparadas com o meio ISO (nomeadas como Agudo *D. magna*), água de abastecimento desclorada (nomeadas MN) e preparadas com água mais Cloreto de Sódio em uma concentração $C = 20 \text{ g.L}^{-1}$ (nomeadas Agudo *V. fisheri*). Desta forma percebe-se uma diminuição da solubilidade dos hidrocarbonetos com o aumento da salinidade. Este comportamento também foi observado por Shiu *et. al.* (1990), Xie *et. al.* (1997) e Shukla *et. al.* (2007) que pesquisaram a solubilidade dos hidrocarbonetos do petróleo e de seus combustíveis derivados.

Os dados referentes às concentrações aquosas de diesel encontrados na literatura variam. Anderson *et. al.* (1974) encontraram uma concentração de hidrocarbonetos aromáticos para a FSA do óleo diesel de 5,28 ppm, já Rodrigues *et. al.* (2010) observaram uma concentração de hidrocarbonetos solúveis de 2,85 ppm para a FSA do

diesel. A variação observada entre os estudos e o presente trabalho é natural uma vez que os combustíveis possuem diferentes origens, podendo, deste modo, possuir composições distintas e conseqüentemente obter diferentes concentrações de FSA. As composições das FSA obtidas corroboram com os resultados encontrados por Anderson *et. al.* (1974), Simonato *et. al.* (2008) e Rodrigues *et. al.*, (2010).

5.1.2 Análise do teor de ésteres

A análise do teor de ésteres presente na FSA do biodiesel apresenta a quantidade de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) transferidos para a fase aquosa. As frações solúveis em água das amostras de biodiesel e B5 não apresentaram concentrações de ésteres metílicos solúveis, conforme mostra os dados da Tabela A2.3 do Anexo A. Os ésteres de ácidos carboxílicos são substâncias químicas capazes de sofrer hidrólise, ou seja, estas substâncias quando em contato com uma molécula de água reagem formando uma nova ligação carbono-oxigênio (HARRIS, 1982). Segundo Lalman (2000) a hidrólise é a primeira etapa da biodegradação dos ésteres, onde esses reagem com a água se decompondo em metanol e ácidos carboxílicos. Portanto, estes resultados indicam que, no preparo da FSA do biodiesel, os ésteres metílicos se hidrolisaram quando em contato com a água. Dados literários, com análises da quantidade de metanol presente na FSA de diferentes biodieseis preparados com metodologia semelhante a utilizada neste estudo, no primeiro dia de obtenção das mesmas, apresentam concentrações de 1,2 a 2,1 % (LEITE *et. al.*, 2011). Essas concentrações são consideradas elevadas para o tempo encontrado, visto que a concentração máxima de metanol livre no biodiesel comercializado é de 0,2% (ANP, 2008). Portanto, estes dados reforçam a afirmativa que na obtenção da FSA pode ocorrer a transformação dos ésteres a metanol.

5.2 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

5.2.1 Testes de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda fornecem dados que permitem mensurar os efeitos toxicológicos causados pela FSA dos combustíveis nas primeiras horas de um derramamento, comparar os efeitos toxicológicos causados pelos diferentes combustíveis definindo qual o combustível mais tóxico para o meio aquático e comparar a sensibilidade dos diferentes organismos expostos. Foram realizados testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo aquático *Daphnia magna* e com as bactérias marinhas bioluminescentes *Vibrio Fisheri*. Os resultados foram expressos em CE_{50} e CE_{zero} . Os resultados da CE_{50} foram divulgados nas unidades % e massa.volume⁻¹.

5.2.1.1 Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo aquático *D. magna* apresentaram toxicidade, em $CE_{50,48 \text{ horas}}$, de 39,56% para a FSA do diesel, 43,42% para a FSA do B5 e 94,43% para a FSA do biodiesel. Considerando a concentração total de hidrocarbonetos como a concentração total da FSA das amostras de diesel e B5, os valores de $CE_{50,48 \text{ horas}}$ obtidos foram de 2,62 ppm para a FSA do diesel e 2,76 ppm para a FSA do B5, comprovando a semelhança de toxicidade aguda encontrada em percentagem. Os resultados obtidos mostram que a FSA do biodiesel estudado é considerada pouco tóxica para a *Daphnia magna*, enquanto a FSA do diesel e do B5 são consideradas tóxicas. A Tabela 5.1 apresenta os resultados dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* para as diferentes amostras avaliadas. A Figura 5.2 apresenta um comparativo da toxicidade aguda das diferentes amostras estudadas na unidade %. O OD e o pH de todas as amostras estão de acordo com as exigências da norma seguida. OD superior a 1,0 mg.L⁻¹ e pH entre 5,0 e 9,0 (ABNT, 2004). O OD variou de 3,9 mg.L⁻¹ a 8,9 mg.L⁻¹ e não foi observada relação de dependência direta da toxicidade aguda com a quantidade de oxigênio dissolvido para nenhuma das FSA dos combustíveis avaliados.

A CE_{zero} observada foi de 12,5% para a FSA do diesel e do B5 e 25% para a FSA do biodiesel. Portanto, a partir das concentrações 0,83 ppm para a amostra de diesel e 0,79 ppm para a amostra de B5, não foi

observada imobilidade superior a 10% dos organismos expostos, assim como para 25% da FSA total do biodiesel. Segundo a ABNT 12713 (2004) o resultado da CE_{zero} deve ser expresso por uma concentração inteira, portanto foi considerada como CE_{zero} média a menor diluição encontrada para este parâmetro.

Tabela 5.1 – Resultados dos testes de toxicidade aguda para as diferentes amostras de combustíveis utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*

Amostra	pH	OD (mg.L ⁻¹)	CE ₅₀ (ppm)	CE _{zero}
FSA Diesel Média (C=6,62 ppm)	7,69	5,2	2,62 (2,16-3,21)	FD 8 ou 12,5%
FSA B5 Média (C=6,36 ppm)	8,30	3,9	2,76 (1,93-3,95)	FD 8 ou 12,5%
FSA B100 Média	7,73	6,2	-----	FD 4 ou 25%

Legenda: C=Concentração e FD=Fator de Diluição

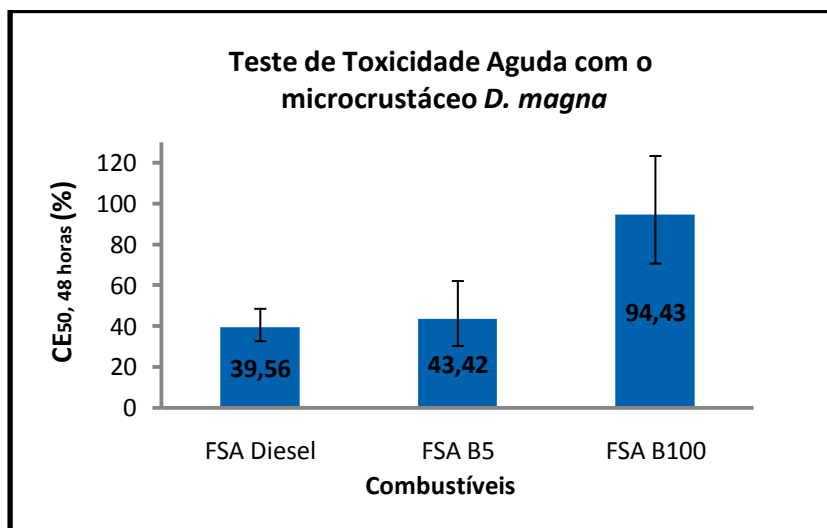


Figura 5.2 – Comparativo da toxicidade aguda da FSA dos diferentes combustíveis estudados utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*

5.2.1.2 Teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*

Os testes de toxicidade aguda com a bactéria marinha bioluminescente *V. fischeri* apresentaram toxicidade, em $CE_{50,15 \text{ min}}$, de 7,32 % para a FSA do diesel, 7,40 % para a FSA do B5 e 29,0% para a FSA do biodiesel. Considerando a concentração total de hidrocarbonetos como a concentração total da FSA das amostras de diesel e B5, os valores de $CE_{50,15 \text{ min}}$ obtidos foram de 0,42 ppm para a FSA do diesel e 0,48 ppm para a FSA do B5. Os valores de CE_{50} baseados na concentração total de HPA e BTEX comprovaram a semelhança de toxicidade obtida para o parâmetro percentagem, assim como para o microcrustáceo aquático *D. magna*. As FSA de todos os combustíveis estudados são consideradas muito tóxicas para as bactérias expostas.

A $CE_{50,15 \text{ min}}$ do teste de toxicidade aguda com a substância de referência Sulfato de Zinco Heptahidratado ($C = 100 \text{ mg.L}^{-1}$) foi de 6,99 (4,94-9,89) mg.L^{-1} . A toxicidade aguda obtida está de acordo com a ISO 11348-3 (1998), validando o lote de bactérias utilizado.

Não foi possível observar a CE_{zero} para as amostras de diesel e B5, pois houve redução da bioluminescência em todas as diluições testadas, portanto a $CE_{\text{zero}} \leq \text{FD } 16$ ou 6,25%. A CE_{zero} para a FSA do biodiesel foi de 12,5%. Os resultados dos testes de toxicidade aguda com as bactérias marinhas bioluminescentes *V. fischeri* estão expressos na Tabela 5.2 e na Figura 5.3.

Tabela 5.2 - Resultados dos testes de toxicidade aguda utilizando a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*

Amostra	pH	OD (mg.L^{-1})	CE_{50} (ppm)	CE_{zero}
FSA Diesel (C=5,75 ppm)	7,85	5,8	0,42 (0,39-0,45)	< FD 16 ou 6,25%.
FSA B5 (C=5,21 ppm)	7,45	4,2	0,38 (0,36-0,42)	< FD 16 ou 6,25%.
FSA Biodiesel	7,5	5,8	-----	FD 8 ou 12,5%

Legenda: C=Concentração, FD=Fator de Diluição e ND=Não Detectável.

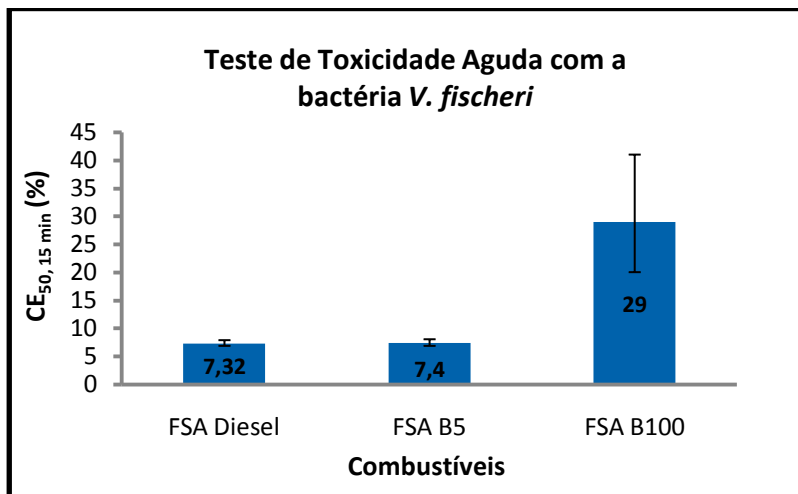


Figura 5.3 - Comparativo da toxicidade aguda da FSA dos diferentes combustíveis estudados utilizando a bactéria marinha *Vibrio fischeri*

O diesel vem sendo substituído pelo biodiesel na matriz energética, entre outros motivos, pelos possíveis benefícios ambientais obtidos pela utilização dos ésteres metílicos. Os efeitos toxicológicos agudos observados neste trabalho demonstram que a FSA do diesel e do B5 são consideravelmente mais tóxicas que a FSA do biodiesel estudado. A maior toxicidade do diesel em relação a diferentes tipos de biodieseis também foi evidenciada pelos autores Peterson e Muller (2006), Khan *et. al.* (2007), DeMello *et. al.* (2007), Silva *et. al.* (2007) e Hollebhone *et. al.* (2008).

A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira se deu pelo uso de misturas binárias de diesel/biodiesel. Atualmente é obrigatória a adição de 5% de biodiesel ao diesel comercializado. A FSA do B5 apresentou toxicidade aguda muito semelhante à FSA do diesel para todos os organismos expostos. Este comportamento também foi observado por Khan *et. al.* (2007) que estudaram a toxicidade aguda do diesel, B5 e biodiesel de óleos e gorduras recicláveis sobre o organismo-teste *D. magna*. Portanto, conclui-se que a mistura binária diesel/biodiesel de 5% exigida pela legislação brasileira não apresentou alteração significativa quanto ao aspecto toxicidade aguda aquática quando comparada a FSA do diesel puro.

Dentre as funções dos testes de toxicidade aguda destaca-se a comparação da sensibilidade de diferentes organismos expostos. Os resultados obtidos para os testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo aquático *D.magna* e para a bactéria marinha *V. fischeri* mostraram que as bactérias são organismos-testes mais sensíveis às FSA de combustíveis, o que também foi observado por Hollebone *et. al.* (2008).

Com relação à toxicidade aguda da FSA do óleo diesel, levando em conta as diferenças nos organismos-testes estudados, os dados literários corroboram com os obtidos no presente trabalho. Neste estudo, a $CE_{50,48 \text{ horas}}$ para o organismo-teste *D. magna* foi de 39,56%. Rayburn *et. al.* (1996) utilizando embriões de camarão para a realização dos ensaios de toxicidade aguda obtiveram uma CL_{50} média de 30%, enquanto Silva *et. al.* (2007) que avaliaram a toxicidade aguda de eluatos de óleo diesel sobre o organismo-teste *Danio rerio*, observaram uma $CL_{50,48 \text{ horas}}$ de 35,35%. Já o resultado de $CE_{50,15 \text{ min}}$ de 0,42 ppm obtido para a bactéria marinha *V. fischeri* é semelhante ao encontrado por Rodrigues *et. al.* (2010) ($CL_{50,96 \text{ horas}} = 0,38 \text{ ppm}$) que avaliaram a toxicidade aguda da FSA do diesel sobre larvas do peixe marinho *Odontesthes argentinenses*.

A toxicidade aguda da FSA do biodiesel tem sido menos investigada. A pesquisa dos impactos toxicológicos causados por esses combustíveis está em estágio inicial. Além disso, há uma grande variação das matérias-primas dos biodieseis avaliados. O biodiesel estudado apresentou-se pouco tóxico para *D. magna* ($CE_{50,48 \text{ horas}} = 94,43\%$) e tóxico para a bactéria *V. fischeri* ($CE_{50,15 \text{ min.}} = 29\%$). Segundo Silva *et. al.* (2007) a FSA do biodiesel metílico de soja, de origem semelhante ao estudado, não apresenta toxicidade para o organismo *D. magna*. A FSA do biodiesel de palma, que possui uma composição de ésteres semelhante ao biodiesel de soja (MOSER, 2009), obteve uma toxicidade ($CE_{50,36 \text{ horas}}$) de 22,25% para o ouriço do mar *Echinometra lucunter* e toxicidade ($CI_{50,96 \text{ horas}}$) de 93,52% para as microalgas *Tetraselmis chuii* (LEITE *et. al.*, 2011). Assim como para o diesel, levando em conta as diferenças nos organismos-testes estudados, pode-se considerar que os dados literários corroboram com os obtidos neste estudo.

Já a FSA de biodieseis originados de óleos com composições de ácidos carboxílicos muito diferentes apresentam toxicidades bem variadas. A FSA do biodiesel de óleo residual de cozinha e a FSA do

biodiesel de mamona apresentaram toxicidade ($CE_{50, 36 \text{ horas}}$) de 8,95 % e 4,22% para o ouriço do mar *Echinometra lucunter*, e toxicidade ($CI_{50, 96 \text{ horas}}$) de 56,74% e 48,32% para a inibição do crescimento das microalgas *Tetraselmis chuii* (LEITE *et. al.*, 2011).

5.2.2 Teste de toxicidade crônica com o microcrustáceo aquático *Daphnia magna*.

Os testes de toxicidade crônica fornecem resultados dos efeitos toxicológicos causados quando há exposição contínua a um contaminante ao longo do tempo. Portanto esses testes simulam os impactos toxicológicos causados pela FSA de combustíveis quando há contaminação por vazamentos na fabricação ou comercialização destes produtos. Foram avaliados os efeitos crônicos causados sobre os parâmetros longevidade, crescimento e reprodução. Os resultados finais foram expressos em CEO e CENO.

As concentrações avaliadas na teste de toxicidade crônica foram definidas através da observação dos resultados obtidos no teste de toxicidade aguda com *D. magna*. Como a CE_{zero} das amostras estudadas variaram de FD 8 ou 12,5% para a FSA do diesel e do B5 a FD 4 ou 25% para a FSA do biodiesel, as diluições do teste de toxicidade crônica iniciaram da CE_{zero} de 25% (FD 4), diminuindo o Fator de Diluição numa razão de 2 entre as diluições. Portanto, as diluições testadas foram 25% (FD 4), 12,5% (FD 8), 6,25% (FD 16), 3,12% (FD 32) e 1,56% (FD 64).

O teste de sensibilidade com a substância de referência Dicromato de Potássio mostrou que o lote do cultivo utilizado nos testes crônicos estava de acordo com a ISO 6341 (1996), pois o resultado do teste foi de 0,93 mg.L⁻¹, que encontra-se dentro da faixa recomenda (de 0,6 a 1,7 mg.L⁻¹ K₂Cr₂O₇).

A longevidade avaliada para 21 dias de exposição dos organismos-teste apresentou efeitos crônicos para as FSA do diesel e do B5 na diluição de 25% (FD 4). Vale ressaltar que foram observadas duas mortes na diluição 12,5% para a FSA do óleo diesel, mas, de acordo com as análises estatísticas realizadas, não houve diferença significativa entre esta concentração e o controle. Assim as amostras de diesel e B5 apresentaram uma CEO de 25% e uma CENO de 12,5% para o parâmetro longevidade. Para a FSA do biodiesel não foi observado nenhum efeito crônico para este parâmetro, portanto não foi possível

determinar a CEO para este combustível. Já a CENO pode-se afirmar que é de 25 % ou um valor acima desta concentração, ou seja, $CENO \geq 25\%$. A Figura 5.4 mostra os resultados dos efeitos crônicos para as diferentes amostras testadas considerando o parâmetro longevidade.

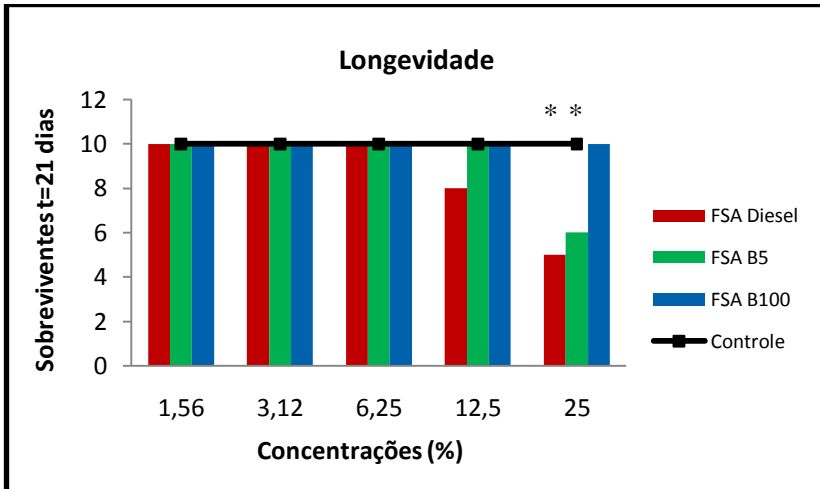


Figura 5.4 – Resultado dos efeitos crônicos para o parâmetro longevidade, para as diferentes FSA estudadas

Legenda: * média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunett.

O parâmetro reprodução obteve valores médios bem distintos para as diferentes diluições, apresentando um comportamento inconstante, principalmente para as amostras das FSA do biodiesel e do B5. Foram observados efeitos crônicos somente nas FSA do diesel e do B5 na concentração 25%, sendo que para a FSA do diesel, nesta diluição, não houve nenhum neonato nascido ao longo dos 21 dias de exposição. Para a FSA do B5 houve o nascimento de 11 neonatos somente em uma réplica no último dia de exposição. Portanto, foram definidas a CEO para as FSA do diesel e do B5 como a concentração de 25% e a CENO de 12,5%. Assim como para o parâmetro longevidade, não foi possível determinar a CEO para a FSA do biodiesel e a CENO é de 25 % ou uma concentração superior a esta. Os resultados dos efeitos crônicos para o parâmetro reprodução encontram-se na Figura 5.5.

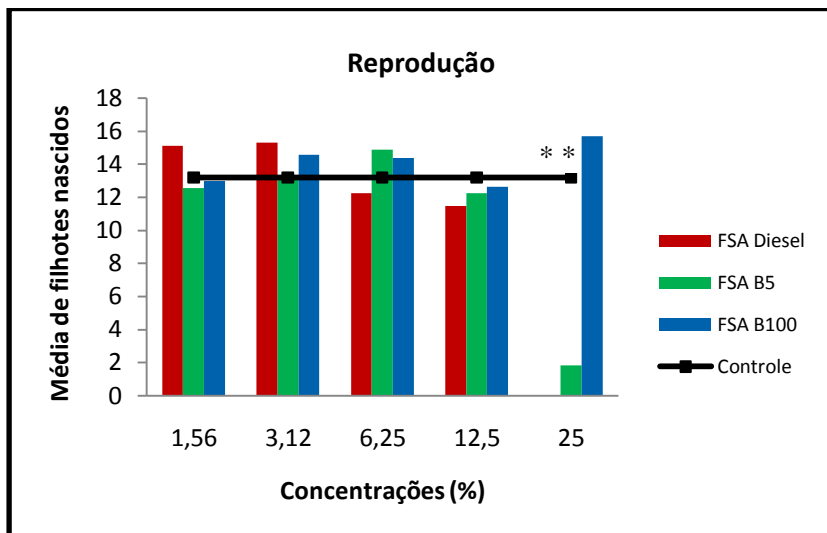


Figura 5.5 - Resultado dos efeitos crônicos para o parâmetro reprodução, para as diferentes FSA estudadas.

Legenda: * média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunett com ajuste de Bonferroni.

O parâmetro crescimento, para a FSA do biodiesel, apresentou o mesmo resultado que os parâmetros anteriores. O comprimento médio dos organismos expostos 21 dias as amostras da FSA do diesel e do B5 obtiveram diferenças significativas com relação ao controle nas diluições 12,5% e 25% para o diesel e na diluição 25% para o B5. Portanto, a concentração referente à CEO para a FSA do diesel foi de 12,5% e a CENO de 6,25%, concentração imediatamente inferior. A CEO observada para a FSA do B5 foi de 25% e a CENO de 12,5%. Os organismos expostos a diluição 25% da FSA do diesel e do B5 apresentaram características de filhotes durante os 21 dias de duração do teste, como pode ser observado na Figura 5.7. Os resultados dos efeitos crônicos para o parâmetro crescimento podem ser observados na Figura 5.6.

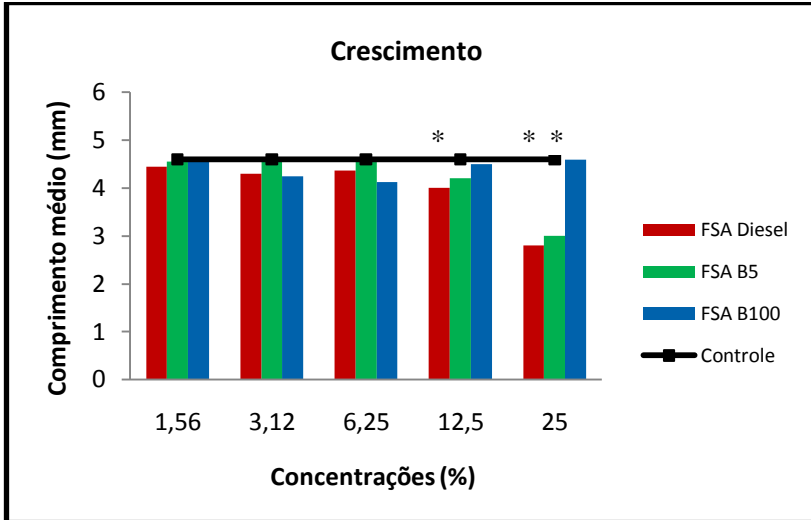


Figura 5.6 - Resultado dos efeitos crônicos para o parâmetro crescimento, para as diferentes FSA estudadas.

Legenda: * média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunnett com ajuste de Bonferroni.

A Figura 5.7 ilustra a diferença de tamanho de uma *Daphnia* exposta ao M4 (controle negativo) em relação a um organismo exposto a diluição 25% da FSA do diesel.

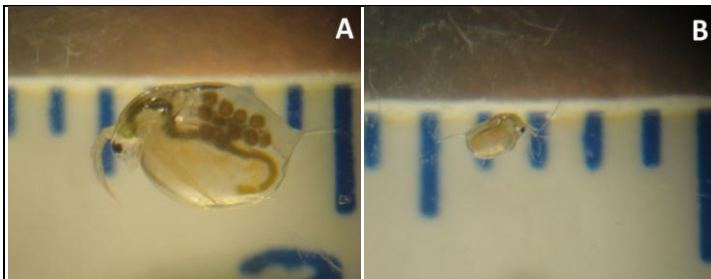


Figura 5.7 – Diferença de tamanho de um organismo exposto ao controle (Figura A) e a diluição 25% da FSA de diesel (Figura B).

Fonte: a autora

Em resumo, dentre os três combustíveis avaliados, a FSA do biodiesel foi a menos tóxica, não apresentando efeitos crônicos para nenhum dos parâmetros avaliados nas diluições testadas. A FSA do diesel e do B5 apresentaram efeitos crônicos semelhantes para os parâmetros longevidade e reprodução. Para o parâmetro crescimento a FSA do diesel foi a mais tóxica. Portanto, com relação à toxicidade crônica dos combustíveis avaliados, os resultados mostraram que a FSA do diesel e do B5 são tóxicas, enquanto a FSA do biodiesel é não tóxica para as diluições testadas. A toxicidade crônica apresentada pelas FSA do diesel e do B5 são semelhantes, assim como nos testes de toxicidade aguda. A Tabela C1.1 do Apêndice C apresenta um resumo dos resultados encontrados para este ensaio.

5.2.3 Teste de mutagenicidade

5.2.3.1 Teste do micronúcleo

Dentre os testes de genotoxicidade desenvolvidos, a ocorrência de micronúcleos serve como o primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica (PRETTI *et. al.*, 2007). Neste estudo foi feita uma avaliação inicial sobre o potencial mutagênico dos combustíveis estudados, portanto optou-se pela realização do teste do micronúcleo. Foi avaliada a concentração de 40% da FSA dos combustíveis, conforme explicado no item 4.8.2 deste trabalho. A FSA do biodiesel apresentou uma média de 3 eritrócitos micronucleados, resultado idêntico ao controle negativo, mostrando assim que este combustível não apresenta potencial mutagênico para a concentração avaliada. Já as amostras da FSA do diesel e do B5 obtiveram uma média de eritrócitos micronucleados superior ao controle negativo, mostrando que as amostras possuem potencial mutagênico. A FSA do B5 apresentou o dobro de micronúcleos encontrado no controle negativo, enquanto a FSA do diesel apresentou um número de micronúcleos quase 3 vezes superior ao controle negativo, porém, estes valores são consideravelmente inferiores ao controle positivo. Deste modo, concluiu-se que a FSA do diesel e do B5 apresentam potencial mutagênico para as células sanguíneas dos organismos estudados. A Figura 5.8 apresenta a média de eritrócitos micronucleados encontrada nas amostras estudadas.

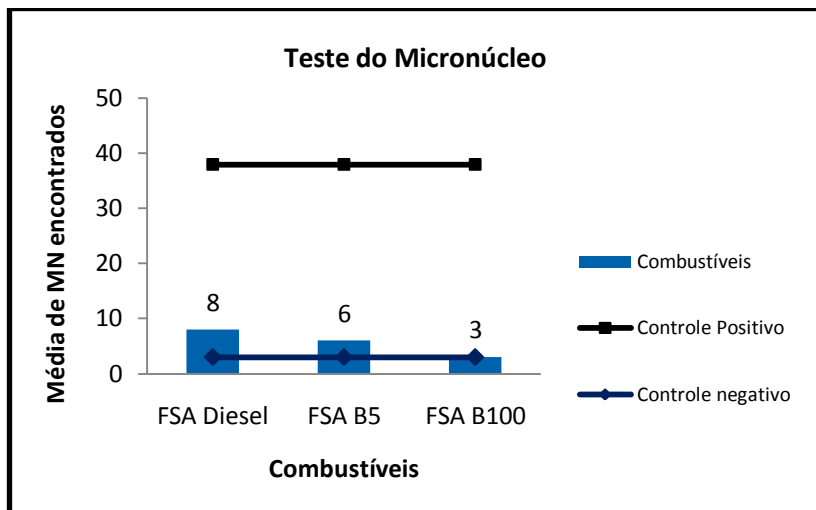


Figura 5.8 - Comparativo da média de eritrócitos micronucleados encontrados nas FSA dos diferentes combustíveis estudados e nos controles.

Vanzella *et. al.* (2007) avaliaram os efeitos mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel através de teste do micronúcleo utilizando como organismo-teste o peixe *Prochilodus lineatus*. Os autores observaram que a formação de micronúcleos iniciava-se em 6 horas de exposição, obtinha um pico em 24 horas e, após 15 dias houve a regeneração dos micronúcleos formados. Em 24 horas, pico de formação dos micronúcleos, foram observados um maior número de micronúcleos na amostra de diesel do que no controle positivo (ciclofosfamida). A diferença de micronúcleos encontradas neste estudo e no presente trabalho se deve, provavelmente, ao diferente método de obtenção da FSA do combustível. Vanzella *et. al.* (2007) obtiveram a FSA através da exposição do diesel mais água a intensa luz solar durante 6 horas, método bem diferente do usado nesta pesquisa.

5.2.4 Resumo dos resultados toxicológicos

A Tabela 5.3 apresenta um resumo geral dos resultados dos testes toxicológicos para as amostras avaliadas.

Tabela 5.3 Resumo dos resultados dos testes toxicológicos para as amostras avaliadas

Amostra	Teste	Resultado	Avaliação
FSA BIODIESEL	Tox. aguda <i>D. magna</i>	CE50 = 94,43%	Pouco tóxica
	Tox. aguda <i>V. fischeri</i>	CE50 = 29%	Tóxica
	Tox. crônica	CEO = ND CENO ≥ 25%	Não efeitos crônicos
	Teste do micronúcleo	3 MN	Não PM
FSA DIESEL	Tox. aguda <i>D. magna</i>	CE50 = 39,56%	Tóxica
	Tox. aguda <i>V. fischeri</i>	CE50 = 7,32%	Muito tóxica
	Tox. crônica	CEO = 25% e 12,5% CENO = 12,5 e 6,25%	Tóxico para todos parâmetros avaliados
	Teste do micronúcleo	8 MN	Sim PM
FSA B5	Tox. aguda <i>D. magna</i>	CE50 = 43,42%	Tóxica
	Tox. aguda <i>V. fischeri</i>	CE50 = 7,4%	Muito Tóxica
	Tox. crônica	CEO = 25% CENO = 12,5%	Tóxico para todos parâmetros avaliados
	Teste do micronúcleo	6 MN	Sim PM

6. CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou os efeitos toxicológicos da fração solúvel em água do diesel, biodiesel e B5. Foram realizados testes de toxicidade aguda com os organismos-testes *D. magna* e *V. Fischeri*, teste de toxicidade crônica com o microcrustáceo aquático *D. magna* e teste do micronúcleo em eritrócitos do peixe *O. niloticus* (Tilápia). Para a análise da composição das frações solúveis em água e quantificação das concentrações presentes na fase aquosa, foram realizadas análises cromatográficas de HPA, BTEX e teor de ésteres. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Dentre os combustíveis avaliados a FSA do biodiesel foi a menos tóxica para todos os testes realizados. De um modo geral, as FSA do diesel e do B5 apresentaram efeitos toxicológicos muito semelhantes;
- A investigação das composições das FSA dos combustíveis estudados demonstrou que as FSA do diesel e do B5 apresentaram consideráveis concentrações de BTEX e baixas concentrações de HPA de baixo peso molecular. Já a FSA do biodiesel não apresentou ésteres solúveis;
- A avaliação dos testes de toxicidade aguda mostrou que a FSA do biodiesel é menos tóxica que as FSA do diesel e do B5 para ambos os organismos-testes utilizados. Os resultados dos testes utilizando o microcrustáceo *D. magna* expuseram que a FSA do biodiesel é pouco tóxica enquanto as FSA do diesel e do B5 são tóxicas. Os testes de toxicidade com a bactéria marinha *V. fischeri* demonstraram que as FSA de todos combustíveis avaliados são muito tóxicas para este organismo;
- A avaliação da toxicidade crônica utilizando o microcrustáceo aquático *D. magna* mostrou que a FSA do biodiesel é menos tóxica que as FSA dos demais combustíveis, pois não apresentou efeitos crônicos para nenhum dos parâmetros avaliados nas diluições testadas. As FSA do diesel e do B5 apresentaram efeitos crônicos semelhantes para os parâmetros longevidade e reprodução.

Para o parâmetro crescimento a FSA do diesel foi a mais tóxica;

- A avaliação do potencial mutagênico através do teste do micronúcleo expôs que a FSA do biodiesel não apresenta potencial mutagênico para células sanguíneas do peixe *O. niloticus*, enquanto as FSA do diesel e do B5 apresentam potencial mutagênico.

A partir dos resultados encontrados foi possível ainda observar que a FSA da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5) exigida pela legislação brasileira apresenta efeitos toxicológicos aquáticos semelhantes à FSA do diesel.

7. RECOMENDAÇÕES

Com base nos estudos existentes na bibliografia e nos resultados obtidos nesta pesquisa, para trabalhos futuros recomenda-se:

- Investigar a FSA dos ésteres metílicos de ácidos carboxílicos, realizando análises químicas de ácidos carboxílicos e metanol nas amostras de FSA do biodiesel e do B5;
- Realizar testes de toxicidade crônica com o microcrustáceo aquático *Daphnia magna* para a FSA do biodiesel utilizando diluições superiores a 25%, com o objetivo de determinar a CEO para esta amostra;
- Realizar testes de toxicidade crônica com o microcrustáceo aquático *Daphnia magna* com as FSA dos combustíveis obtidas através da mistura de uma parte da amostra em nove partes de água de diluição do teste objetivando comparar os resultados com os dados encontrados neste estudo;
- Realizar um estudo detalhado da genotoxicidade dos combustíveis, utilizando o teste do micronúcleo variando a concentração e o tempo de exposição dos organismos, podendo assim observar a concentração inicial que causa impactos mutagênicos, assim como possíveis efeitos de regeneração das células sanguíneas; e utilizando outros testes de genotoxicidade citando: fragmentação do DNA, metilação do DNA e lipoperoxidação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. (BRASIL), 2010. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=8240> Acessado em: Janeiro, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. ANP (BRASIL). **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2010**. Rio de Janeiro: ANP, 2010. 221 p.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. ANP (BRASIL). **Resolução ANP nº 007, de 19 de março de 2008**. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de março de 2008.

ALMEIDA-VAL, V.M.F; DUNCAN, A.L.; VAL, A.L. **Crude Oil Effects on Fish of the Amazon: Current Status**. In: Tropical Fish: News and Reviews. *International Congress on The Biology of Fish*. Vancouver, Canada, p. 49–60, 2002.

ALVES, A. C. B.; SILVANO, J. **Avaliação da Sensibilidade de *Daphnia magna Straus, 1820* (Cladóceras, Crustácea) ao Dicromato de Potássio**. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2006.

AL-YAKOUB, S. N.; GUNDERSEN D.; CURTIS L. **Effects of the Water Soluble Fraction of Partially Combusted Crude Oil from Kuwait's Oil Fires (from Desert Storm) on Survival and Growth of the Marine Fish *Menidia beryllina***. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 35, p. 142–149, 1996.

ANDERSON, J. W.; NEFF, J.M.; COX, B.A. **Characteristics of Dispersions and Water Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish**. *Marine Biology*, v. 27, p. 75–88, 1974.

ARAGÃO, M. A; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.;

BERTOLETTI, E. (Org.) **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 464 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-1: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do Efeito Inibitório de Amostras de Água sobre a Emissão de Luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de Bactéria Luminescente): Parte 1 – Método utilizando Bactérias Recém Cultivadas**. Rio de Janeiro: ABNT, 2006^a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-2: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do Efeito Inibitório de Amostras de Água sobre a Emissão de Luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de Bactéria Luminescente): Parte 2 – Método utilizando Bactérias Desidratadas**. Rio de Janeiro: ABNT, 2006^b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do Efeito Inibitório de Amostras de Água sobre a Emissão de Luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de Bactéria Luminescente): Parte 3 – Método utilizando Bactérias Liofilizadas**. Rio de Janeiro: ABNT, 2006^c.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15469: Ecotoxicologia Aquática – Preservação e Preparo de amostras**. Rio de Janeiro: ABNT, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

BARNES, R. **Zoologia de los Invertebrados**. 3^a ed., Interamericana. São Paulo, 1977.

BARSIENÈ, J. DEDONYT, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKÉNAIT, L.; ANDERSEN, O. K. **Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil**. *Aquatic Toxicology*, v. 78, p. 99–104, 2006.

BRASIL, CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e de outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de março de 2005^b.

BRASIL, CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 396, de 03 de abril de 2008.** Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 7 de abril de 2008.

BRASIL, CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de maio de 2011^b.

BRASIL, FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. **Portaria FATMA nº 017, de 18 de abril de 2002.** Estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. Diário Oficial, 26 de abril de 2002.

BRASIL. **Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005.** Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n^{os} 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Presidência da República, Casa Civil, Sub Chefia para Assuntos Jurídicos, 2005^a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011.** 2^a ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas. 2006. 110 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acessada em: março, 2011^a.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e Aplicação do Teste de Toxicidade Crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes Tratados de um Aterro Sanitário.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006. 145 p.

CARLS, M. G.; RICE, S. D. **Abnormal Development and Growth Reductions of Pollock, *Theragra chalcogramma*, Embryos Exposed to Water Soluble Fraction of Oil.** *Fishery Bulletin*, v. 88, p. 29–37, 1990.

CARRANO, A. V.; NATARANJAN, S. **Considerations for Populations Monitoring using Cytogenetic Techniques.** *Mutation Research*, v. 204, p. 379–406, 1998.

CARVALHO PINTO-SILVA, C.R., FERREIRA, J.F., COSTA R.H.R., BELLI FILHO P., CREPPY E.E., MATIAS W.G., **Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid,** *Toxicol*, v. 41, p.93–97, 2003.

CHASIN, A. A. da M.; AZEVEDO, F. A. de. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: Rima, 2003. São Paulo: Intertox, 2003. 340p. (NÃO É AZEVEDO E CHASIN?)

CLARE, J. **Daphnia: Na Aquarist's Guide.** Disponível em: www.caudata.org/daphnia Acesso em: Janeiro, 2010.

CENTRE OF MARINE AND ENVIRONMENTAL RESEARCH. CIMAR. Disponível em: <http://www.cimar.org/BiolVerao/dafnia.htm>. Acessado em: Janeiro, 2010.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. **Norma técnica L5.019 – Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB, 17 p. 1990.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. **Norma técnica L5.227 – Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio** São Paulo: CETESB, 13 p. 2001.

CONCAWE; EUCAR (European Council for Automotive); JRC (Joint Research Centre of the EU Commission). **Well-to-Wheels analysis of future automotive fuels and powertrains in the European context.** Version 2b. 2006.

CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA. CNPE. **Resolução nº6, de 16 de setembro de 2009.** Diário Oficial da União, Brasília, 26 de outubro de 2009.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. J. G. **A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação.** *Química Nova*, v. 31, nº 7, p. 1820-1830, 2008.

DEDE, E. B. K. **Aqua-toxicological Effects of Water Soluble Fractions (WSF) Of Diesel Fuel On *O. Niloticus* Fingerlings.** *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, v. 4, nº 1, p. 93–96, 2001.

DeMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; NELSON, R. K.; AREY, J. S.; REDDY, C. M. **Biodegradation and Environmental Behavior of Biodiesel Mixtures in the Sea: An Initial Study.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 894–904, 2007.

De MIRANDA, G. R. **Avaliação das Emissões Provenientes da Combustão de Diesel, Biodiesel de Resíduos de óleo de Fritura e suas Misturas.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e

Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007. 106 p.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO. DENATRAN (BRASIL). Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm>
Acessada em: março, 2011.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. DIN. **Testverfahren mit Wasserorganismen (gruppeL) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber *Daphnien* über Verdünnungsstufen:** DIN 38412-11. Berlin: DIN, 1989.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. DIN. **Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (*Photobacterium phosphoreum*; Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 37):** DIN 38412-37. Berlin: DIN, 1999.

ENCINAR, J. M.; GONZALEZ, J.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J. **Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 38, p. 2927–2931, 1999.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA. EHC N°.171. **Diesel Fuel and Exhaust Emissions.** World Health Organization, Geneva. 1996.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S. **HUMN Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures.** *Mutation Research*, v. 534, p. 65–75, 2003.

FERRARI R. A., OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. **Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etilicos, Caracterização Físico – Química e Consumo em Gerador de Energia.** *Química Nova*, v. 28, n°. 1, p. 19-23, 2005.

FERREIRA, G. R.; NEPOMUCENO, J. C.. **Poluição do Rio Santa Catarina no Município de Vazante (MG) Detectada por meio do Teste do Micronúcleo em Peixes.** *Perquirêre - Revista Eletrônica da Pesquisa*, 5ª ed., ano 5, 2008.

FLEEGER J. W., CARMAN K. R., NISBET R. M. **Indirects Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems.** *The Science of the Total Environment*, v. 317, p. 207-233, 2003.

FLORA, S. *et. al.* **Genotoxic, Carcinogenic, and Teratogenic Hazards in the Marine Environment, with Special Reference to the Mediterranean Sea.** *Mutation Research*, v. 258, p. 285–320, 1991.

FUZINATTO, C.F. **Avaliação da Qualidade da Água de Rios Localizados na Ilha de Santa Catarina utilizando Parâmetros Toxicológicos e o Índice de Qualidade de Água.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009. 243 p.

GAUR, J. P.; SINGH, A. K. **Comparative Studies on the Toxicity of Petroleum Oils and Their Aqueous Extracts Towards *Anabaena doliolum*.** *Proceedings: Plant Sciences*, v. 99, n° 5, p. 459–466, 1989.

GERPEN, J. V.; KNOTHE, G. Produção de Biodiesel. **In: Manual do Biodiesel.** 1ª ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

GOMES, A. P. N. **Biodegradação de Biodiesel Soja, Mamona e Hidrocarbonetos Monoaromáticos em Ambientes Aquáticos.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008. 89 p.

GRIFFIN, L. F.; CALDER, J. A. **Toxic Effect of Water-Soluble Fractions of Crude, Refined, and Weathered Oils on the Growth of a Marine Bacterium.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, n° 5, p. 1092–1096, 1977.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. **Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays.** *Environmental Science & Technology*, v. 11, n° 7, p. 714-719, 1977.

HARMEL, V. C. **Padronização de um Teste de Toxicidade Crônica com a Bactéria Luminescente *Vibrio fischeri* para Análise da Qualidade de Águas Superficiais.** Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental – Centro de Ciências Tecnológicas. Universidade Regional de Blumenau, Santa Catarina, 2004. 100 p.

HARRIS, J.C. Rate of Hydrolysis. In: **Handbook of Chemical Property Estimation Methods.** McGraw-Hill Book Co., NY. 1982.

HOFFMAN, R. N.; RAAT, W. K. **Induction of Nuclear Anomalies (Micronuclei) in the Peripheral Blood Erythrocytes of the Eastern Mudminnow *Umbra Pigmea* by Ethil Methanesulphonate.** *Mutation Research*, v. 104, p. 147-152, 1982.

HOLLEBONE, B. **Biofuels in the Environment: A Review of Behaviors, Fates and Effects & Remediation Techniques.** *Freshwater Spills Symposium*. St. Louis, MO, USA, 2009.

HOLLEBONE, B. P.; FIELDHOUSE, B.; LANDRIAULT, M. **Aqueous Solubility, Dispersibility and Toxicity of Biodiesels.** *International Oil Spill Conference*, p. 929– 35, 2008.

HWANG, H.; ALEGRE, G. F.; BORELLY, S. I.; FLYNN, M. N. **Avaliação de Toxicidade em Sedimentos do Rio Juqueri (SP) com *Vibrio fischeri* e *Hyalella azteca*.** *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 2, n° 2, p. 18-28, 2009.

HYLLAND, K. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Ecotoxicology in Marine Ecosystems.** *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 69, part A, p. 109– 23, 2006.

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO. IMP (México), 2009. Disponível em: <http://www.imp.mx/petroleo/> Acessado em: Novembro, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Stratus* (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test: ISO 6341.** USA: ISO, 1996.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water Quality – Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test) – Part 1: Method Using Freshly Prepared Bacteria. ISO 11348-1.** USA: ISO, 1998^a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water Quality – Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test) – Part 2: Method Using Liquid-dried Bacteria.** ISO 11348-2. USA: ISO, 1998^b.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water Quality – Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test) – Part 3: Method Using Freeze-dried Prepared Bacteria.** ISO 11348-3. USA: ISO, 1998^c.

KAZLAUSKIENE, N.; VOSYLIENE, M. Z.; RATKELYTE, E. **The Comparative Study of the Overall Effect of Crude Oil on Fish in Early Stages of Development.** *Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle*, p. 307–316, 2008.

KHAN, N.; WARITH A. M.; LUK, G. A **Comparison of Acute Toxicity of Biodiesel, Biodiesel Blends, and Diesel on Aquatic Organisms.** *Journal of the Air & Waste Management Association*, v. 57, p. 286–296, 2007.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289p.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. 1ª ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

LALMAN, J. D. A. **Anaerobic Degradation of Linoleic (C_{18:2}), Oleic (C_{18:1}) and Stearic (C_{18:0}) Acids and their Inhibitory Effects on Acidogens, Acetogens and Methanogens**. Tese apresentada ao curso de Engenharia Civil. Departamento de Eng. Civil. Universidade de Toronto. Toronto, CA, 2000. 187 p.

LEITE, A. B. N. L.; De ARAÚJO, M. M. S.; NASCIMENTO, I. A.; Da CRUZ, A. C. S.; PEREIRA, S. A. NASCIMENTO, N. C. **Toxicity of Water-Soluble Fractions of Biodiesel Fuels Derived from Castor Oil, Palm Oil, and Waste Cooking Oil**. *Environmental Toxicology and Chemistr*, v. 30, SETAC press, 2011.

LEMOS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. R.; OLIVEIRA, N. C. A.; ERDTMANN, B. **River Water Genotoxicity Evaluation using Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, p. 391–401, 2007.

LEMOS, P. M. M. **Respostas Bioquímicas e Moleculares em Mexilhões *Perna perna* (Lineé, 1758) Expostos ao Óleo Diesel**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003. 155 p.

LEUNG, D.Y.C.; KOO, B. C. P.; GUO Y. **Degradation of Biodiesel under Different Storage Conditions**. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 250-256, 2006.

LOCKHART, W. L.; DUNCAN D. A; BILLECK, B. N. DANELL, A., RYAN, M. J. **Chronic Toxicity of the 'Water- soluble Fraction' of Norman Wells Crude Oil to Juvenile Fish**. *Spill Science & Technology Bulletin*, v. 3, nº. 4, p. 259-262, 1996.

LONG, S. M.; HOLDWAY, A. A. **Acute Toxicity of Crude and Dispersed Oil to *Octopus pallidus* (Hoyle, 1885) Hatchlings.** *Water Research*, v. 36, p. 2769–2776, 2002.

MATIAS, W. G. **Apostila de Toxicologia Ambiental.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

MENICONE, M. F. G.; GABARDO I. T.; CARNEIRO, M. E. R.; BARBANTE, S. M.; SILVA, G. C. S.; MASSONE, C. G. **Brazilian Oil Spills Chemical Characterization – Case Studies.** *Environmental Forensics*, v. 3, p. 303–321, 2002.

MUSSA, M. **A global growth rebound: how strong for how long?** Washington, DC : Institute for International Economics, 2003. Disponível em: www.iie.com/publications/papers/mussa0903.pdf Acessado em: Novembro, 2010.

MISHRA, A.K, MOHANTY, B. **Acute Toxicity Impacts of Hexavalent Chromium on Behavior and Histopathology of Gill, Kidney and Liver of the Freshwater Fish, *Channa punctatus* (Bloch).** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 26, p. 136–14, 2008.

MOSER, B. R. **Biodiesel Production, Properties, and Feedstocks.** *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 45, p. 229–266, 2009.

NAVAS, J. M.; BABÍN, M.; CASADO, S.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J. V. **The Prestige Oil Spill: A Laboratory Study about the Toxicity of the Water-Soluble Fraction of the Fuel Oil.** *Marine Environmental Research*, v. 62, p. 352–355, 2006.

OGUNDIRAN, M. A.; FAWOLE, O. O.; ADEWOYE, S. O.; AYANDIRAN, T.A. **Toxicological Impact of Detergent Effluent on Juvenile of African Catfish (*Clarias gariepinus*) (Buchell 1822).** *Agriculture and Biology Journal of North America*, v. 1, n°3, p. 330–342, 2010.

OMEGERIE, E. **Acute Toxicity of Water Soluble Fractions of Crude Oil to the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)**. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, v. 68, p. 623–629, 2002.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. **A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio Fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals**. *Marine Pollution and Ecotoxicology*, v. 32, p. 265-268, 2006.

PETERSON, C. L.; MÜLLER, G. Biodiesel: Biodegradabilidade, Demandas Química e Biológica de Oxigênio e Toxicidade. In: **Manual do Biodiesel**. 1ª ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

PETERSON, C. L.; REECE, D. L.; THOMPSON, J. C.; BECK, S. M; CHASE, C. **Ethyl Ester of Rapeseed Used as a Biodiesel Fuel - A Case Study**. *Biomass and Bioenergy*, v. 10, p.331–336, 1996.

PLÀ, J. A. **Perspectivas do Biodiesel no Brasil**. *Indic. Econ. FEE*, v. 30, n. 2, p, 179-190. Porto Alegre, 2002.

POLLINO, C. A.; HOLDWAY, D. A. **Toxicity Testing of Crude Oil and Related Compounds Using Early Life Stages of the Crimson-Spotted Rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*)**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 52, p. 180-189, 2002.

PRETTI, E.; CAVALCANTI, D.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. **Ensaio do Cometa e Indução de Anormalidades Eritrocíticas Nucleares para a Detecção de Mutagenicidade no Peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* Expostos à Fração Solúvel da Gasolina**. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*. Caxambu – MG, 2007.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. 2ª ed. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995. 1.125p.

RANESES, A. R.; GLASER, L. K.; PRICE, J. M.; DUFFIELD, J. A. **Potential Biodiesel Markets and Their Economic Effects on the**

Agricultural Sector of the United States. *Industrial Crops and Products*, v. 9, p. 151–162, 1999.

RAYBURN, J. R.; GLAS, P. S.; FOSS, S. S.; FISHER, W. S. **Characterization of Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*) Embryo Toxicity Tests using the Water Soluble Fraction of Number 2 Fuel Oil.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 32, n° 12, p. 860-866, 1996.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Editora da ULBRA, Canoas-RS. 2003. 356 p.

RODRIGUES, R. V.; MIRANDA-FILHO, K. C.; GUSMÃO, E. P.; MOREIRA, C. B.; ROMANO, L. A.; SAMPAIO, L. A. **Deleterious Effects of Water-Soluble Fraction of Petroleum, Diesel and Gasoline on Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae.** *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 2054–2059, 2010.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. **Micronucleus Test in Fresh Water Fish Species: an Evaluation of its Sensitivity for Application in Field Surveys.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, p. 442 – 448, 2003.

SAEED, T.; AL-MUTAIRI, M. **Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of the Leaded Gasolines in Seawater.** *Environment International*, v. 25, n° 1, p. 117-129, 1999.

SCHWARZENBACH, R.P., GSCHWEND, P.M., IMBODEM, D.M. **Environmental Organic Chemistry.** 2^a ed. Wiley Interscience. NY, 2003. 1313p.

SHIU, W.Y.; BOBRA, M.; MAIJANEN, A.; SUNTIO, L.; MACKAY, D. **The Water Solubility of Crude Oils and Petroleum Products.** *Oil Chemistry Pollution*, v. 7, p. 57-84, 1990.

SHUKLA, P.; GOPALANI, M.; RAMTEKE, D. S.; WATE S. R. **Influence of Salinity on PAH Uptake from Water Soluble Fraction of Crude Oil in *Tilapia mossambica*.** *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, v.79, p. 601–605, 2007.

SILVA, C. R. **Estudo da Frequência de Hemócitos Micronucleados, Induzidos pelo Ácido Ocadáico, em Mexilhões *Perna perna* (Mollusca: Bivalva)**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2000. 117 p.

SILVA, E. P. *et. al.* **Avaliação Ecotoxicológica e Histológica de Combustíveis Fósseis e Biocombustíveis Produzidos por Craqueamento Termo-Catalítico e Transesterificação do Óleo de Soja.** 2007. Disponível em: www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/armazenamento/10.pdf
Acessado em: Junho, 2009.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. **Biochemical, Physiological, and Histological Changes in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* Exposed to Diesel Oil.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 112–120, 2008.

SINGER, M.M.; AURAND, D.; BRAGINS, G. E.; CLARKS, J. R.; COELHO, M.; SOWBY, M.L.; TJEERDEMA, R. S. **Making, Measuring, and Using Water-Accommodated Fractions of Petroleum for Toxicology Testing.** *Proceedings of the 2001 International Oil Spill Conference*. Tampa, Florida, U.S.A, p. 1269-1274, 2001.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1998. 1325 p.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R.; FACHEL, J. M. G. **Taquari River (Rio Grande do Sul, Brazil) Sediment Ecotoxicology, using *Daphnia magna*, 1820, Straus as test organism.** *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 20, n° 2, p. 153-159, 2008.

UDROIU, I. **The Micronucleus Test in Piscine Erythrocytes.** *Aquatic Toxicology*, v. 79, p. 201–204, 2006.

UMBUZEIRO G. A.; ROUBICEK D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 464 p.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. USEPA. **A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emission**. Draft Technical Report, EPA420-P-02-001, 2002^a.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **EMSL Cincinnati Dunnet Software version 1.5**. Disponível em: www.epa.gov/nerleerd/stat2.ht. Acessado em: Janeiro, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **EPA-821-R-02-013: Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**. 4th ed. Washington, USA, 2002^b.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. USEPA. **Quality Criteria for Water 1986**. EPA 440/5-86-001. Washington, DC, USA. 1986.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. USEPA. **Method 8021B. Aromatic and Halogenated Volatiles by Gas Chromatography using Photoionization and/or Electrolytic Conductivity Detectors**. USA: EPA, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. USEPA. **Method 8270D. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)**. USA: EPA, 2007.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. **Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species**. *Mutation Research*, 631, p. 36–43, 2007.

VIEIRA, F. C. dos S. **Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea)**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento

de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004. 72 p.

VON WEDEL, R. **Technical Handbook for Marine Biodiesel**. 2^a ed. National Renewable Energy Laboratory - U.S. Department of Energy. 1999.

WEBER, C. I. **Method for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marina organisms**. Cincinnati, Ohio: EPA, 253 p. 1993.

WILLIAMS, P. L.; JAMES R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**. 2^a ed. A Wiley-Interscience Publication John Willey & Sons, INC., 2000.

XIE, W. H.; SHIU, W. Y.; MACKAY, D. **A Review of The Effects of Salts on the Solubility of Organic Compounds in Sea Water**. *Marine Environmental Research*. v. 44, n^o 4, p. 429 – 444, 1997.

YU, M-H. **Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants**. 2a ed. CRC Press LLC. Florida, 2005.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 464 p.

APÊNDICE A

TABELAS COM LIMITES MÁXIMOS DE BTEXs E HPAs PERMITIDOS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DAS ÁGUAS, BASEADAS NA RESOLUÇÃO CONAMA 357 (2005), RESOLUÇÃO CONAMA 396 (2008) E RESOLUÇÃO CONAMA 430 (2011). TABELA COM LIMITES MÁXIMOS DE TOXICIDADE AGUDA DE EFLUENTES DE DIFERENTES CATEGORIAS CONFORME PORTARIA FATMA 017 (2002).

Tabela A1.1 – Padrões de qualidade da água para águas superficiais conforme a Resolução CONAMA 357 (2005)

ÁGUAS DOCES – CLASSE 1	
PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO
Benzeno	0,005 mg.L ⁻¹
Etilbenzeno	90 µg.L ⁻¹
Tolueno	2 µg.L ⁻¹
Xileno	300 µg.L ⁻¹
Benzo(a)antraceno	0,05 µg.L ⁻¹
Benzo(a)pireno	0,05 µg.L ⁻¹
Benzo(b)fluoranteno	0,05 µg.L ⁻¹
Benzo(k)fluoranteno	0,05 µg.L ⁻¹
ÁGUAS DOCES – CLASSE 1 Padrões para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intenso	
PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO
Benzo(a)antraceno	0,018 µg.L ⁻¹
Benzo(a)pireno	0,018 µg.L ⁻¹
Benzo(b)fluoranteno	0,018 µg.L ⁻¹
Benzo(k)fluoranteno	0,018 µg.L ⁻¹
ÁGUAS DOCES – CLASSE 3	
PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO
Benzeno	0,005 mg.L ⁻¹
Benzo(a)pireno	0,7 µg.L ⁻¹
ÁGUAS SALINAS – CLASSE 1	
PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO
Benzeno	700 µg.L ⁻¹
Etilbenzeno	25 µg.L ⁻¹
Tolueno	215 µg.L ⁻¹
ÁGUAS SALINAS – CLASSE 1 Padrões para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intenso	
PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO
Benzeno	51 µg.L ⁻¹
Benzo(a)antraceno	0,018 µg.L ⁻¹
Benzo(a)pireno	0,018 µg.L ⁻¹
Benzo(b)fluoranteno	0,018 µg.L ⁻¹
Benzo(k)fluoranteno	0,018 µg.L ⁻¹
ÁGUAS SALOBRAS – CLASSE 1	
PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO

Benzeno	700 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Etilbenzeno	25 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Tolueno	215 $\mu\text{g.L}^{-1}$

ÁGUAS SALOBRAS – CLASSE 1 Padrões para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intenso

PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO
Benzeno	51 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Benzo(a)antraceno	0,018 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Benzo(a)pireno	0,018 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Benzo(b)fluoranteno	0,018 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Benzo(k)fluoranteno	0,018 $\mu\text{g.L}^{-1}$

FONTE: Brasil, Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005^b) com adaptações

Tabela A1.2 – Padrões de qualidade da água para águas Subterrâneas conforme a Resolução CONAMA 396 (2008).

Parâmetro	Usos preponderantes das águas		
	Consumo humano	Dessedentação de animais	Recreação
	$\mu\text{g.L}^{-1}$		
Benzeno	5		10
Etilbenzeno	200		
Tolueno	170	24	
Xileno Total (o+m+p)	300		
Benzo antraceno	0,05		
Benzo fuoranteno	0,05		
Benzo(k)fluoranteno	0,05		
Benzopireno	0,05		0,01

FONTE: Brasil, Resolução CONAMA 396 (BRASIL, 2008) com adaptações.

Tabela A1.3 – Critérios de lançamento de efluentes conforme a Resolução CONAMA 430 (2011)

PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO PERMITIDO
Benzeno	1,20 mg.L ⁻¹
Etilbenzeno	0,84 mg.L ⁻¹
Tolueno	1,20 mg.L ⁻¹
Xileno	1,6 0 mg.L ⁻¹

FONTE: Brasil, Resolução CONAMA 430 (BRASIL, 2011^b) com adaptações.

Tabela A1.4 – Limites máximos de tox. aguda de efluentes conforme Portaria FATMA 017 (2002).

Origem dos Efluentes		Limites Máximos	Limites Máximos
Origem dos efluentes Categoria da atividade	Subcategoria da atividade	Toxicidade Aguda para <i>Daphnia magna</i> (FDd)	Toxicidade Aguda para <i>Vibrio fisheri</i> (FDbl)
Metal mecânica	Siderurgia	4	6
	Metalurgia	4	6
	Galvanoplastia	16	8
Alimentícia		2	4
Esgotos domésticos ou Hospitalares		1	4
Resíduos urbanos	Efluentes de		
	Aterros Sanitários	8	16
Papel e Celulose		2	4
Couros, peles e produtos similares		4	6
Química		2	4
Têxtil		2	2
Farmacêutica		2	4

FONTE: Brasil, SC, Portaria FATMA 017 (BRASIL, 2002).

LEGENDA:

FDd – Fator de Diluição para *Daphnia magna*

FDbl – Fator de Diluição para *Vibrio fisheri*

FD = 1 – amostra bruta não tóxica

APÊNDICE B
FICHA PARA REGISTRO DE INFORMAÇÕES NOS
TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Daphnia magna*

APÊNDICE C

RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA

Tabela C1.1 – Resumo dos resultados dos testes de toxicidade crônica utilizando o microcrustáceo aquático *daphnia magna* para as diferentes FSA dos combustíveis estudados.

Parâmetro	C (%)	FSA Diesel	FSA B5	FSA B100
Reprodução	controle	13,20 ± 1,48	13,20 ± 1,48	13,20 ± 1,48
	1,56	15,11 ± 1,76	12,55 ± 3,84	13,00 ± 2,38
	3,12	15,30 ± 2,98	13,11 ± 4,78	14,57 ± 2,94
	6,25	12,25 ± 0,89	14,90 ± 3,40	14,37 ± 3,11
	12,5	11,50 ± 2,88	12,25 ± 2,05	12,66 ± 2,87
	25	0 *	1,83 ± 4,49*	15,70 ± 2,67
Crescimento	controle	4,60 ± 0,52	4,60 ± 0,52	4,60 ± 0,52
	1,56	4,44 ± 0,53	4,56 ± 0,53	4,57 ± 0,53
	3,12	4,30 ± 0,48	4,62 ± 0,52	4,25 ± 0,46
	6,25	4,37 ± 0,52	4,60 ± 0,52	4,12 ± 0,35
	12,5	4,00 ± 0 *	4,20 ± 0,42	4,50 ± 0,55
	25	2,80 ± 0,45*	3,00 ± 0,71*	4,60 ± 0,52
Longevidade	controle	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	1,56	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	3,12	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	6,25	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	12,5	8,0 ± 0,42	10 ± 0	10 ± 0
	25	5,0 ± 0,53 [#]	6,0 ± 0,52 [#]	10 ± 0

LEGENDA: C = Concentração

*) média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunett.com ajuste de Bonferroni.

#) média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunett.

ANEXO A

**RESULTADOS DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS
REALIZADAS PELA EMPRESA ANALYTICAL TECHNOLOGY**

Tabela A2. 1 - Resultados da quantificação de HPA e BTEX das diferentes amostras de FSA do diesel.

Hidrocarboneto	Diesel Agudo <i>D. magna</i>	Diesel Crônico	Diesel Agudo <i>V. fischeri</i>	Diesel MN
Benzeno	786,3	821,5	590,0	756,5
Tolueno	2539,0	2798,2	2096,2	2152,4
Etilbenzeno	244,1	312,0	218,4	234,0
m,p-Xilenos	2059,9	2481,8	1873,1	1982,4
o-Xileno	822,3	931,2	741,4	788,5
C Total BTEX ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	6451,6	7344,7	5519,1	5913,8
Naftaleno	164,4	274,5	207,4	319,9
Acenaftileno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Acenafteno	< 1,50	< 1,50	3,06	< 1,50
Fluoreno	2,46	4,37	4,92	4,87
Fenantreno	2,31	4,92	5,09	5,78
Antraceno	2,39	5,37	5,61	6,41
Fluoranteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Pireno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Benzo(a)antraceno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Criseno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Benzo(b)fluoranteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Benzo(k)fluoranteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Benzo(a)pireno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Dibenzo(a,h)antraceno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Benzo(g,h,i)perileno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
C Total HPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	171,6	289,2	226,1	337,0
C Total Final ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	6.623,2	7.633,9	5.745,2	6.250,8
C Total Final (ppm)	6,62	7,63	5,75	6,25

LEGENDA : C= Concentração; MN = Micronúcleo.

Tabela A2. 2 - Resultados da quantificação de HPA e BTEX das diferentes amostras de FSA do B5

 Hidrocarboneto	B5 Agudo <i>D. magna</i>	B5 Crônico	B5 Agudo <i>V. fischeri</i>	B5 MN
 Benzeno	725,6	807,3	516,2	625,3
 Tolueno	2343,1	2510,2	1885,2	2277,1
 Etilbenzeno	225,1	250,1	199,6	229,7
 m,p-Xilenos	1980,6	2062,1	1704,7	2094,2
 o-Xileno	785,8	824,9	667,7	837,5
 C Total BTEX ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	6060,2	6454,6	4973,4	6063,8
 Naftaleno	296,6	235,8	218,7	49,3
 Acenaftileno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Acenafteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Fluoreno	3,25	5,90	3,76	< 1,50
 Fenantreno	4,50	7,81	5,36	1,90
 Antraceno	2,39	8,68	5,70	1,98
 Fluoranteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Pireno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Benzo(a)antraceno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Criseno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Benzo(b)fluoranteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Benzo(k)fluoranteno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Benzo(a)pireno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Dibenzo(a,h)antraceno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 Benzo(g,h,i)perileno	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
 C Total HPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	306,7	258,2	233,5	53,2
 C Total Final ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	6.366,9	6.712,8	5.206,9	6117,0
 C Total Final (ppm)	6,37	6,71	5,21	6,12

LEGENDA : C= Concentração; MN = Micronúcleo.

Tabela A2. 3 - Resultados da quantificação do teor de ésteres para todas as amostras de FSA do B5 e do biodiesel.

Composto	C (ppm)
Metil Erucato	< 0,0008
Metil Araquidato	< 0,00001
Metil Docos anoato	< 0,00005
Metil Eicosenoato	< 0,0006
Metil Linoleato	< 0,00004
Metil Linolenato	< 0,002
Metil Miristato	< 0,00002
Metil Oleato	< 0,0002
Metil Palmitato	< 0,00001
Metil Estearato	< 0,00005
Metil Tetracosanoato	< 0,0005

LEGENDA: C=Concentração