



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA: PETRÓLEO E
MEIO AMBIENTE**

ANA CARINA MATOS SILVA

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS RELACIONADOS À FORMAÇÃO
DE AGREGADOS ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM
SUSPENSÃO (OSAs) EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAL**

Salvador

2014

ANA CARINA MATOS SILVA

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS RELACIONADOS À FORMAÇÃO
DE AGREGADOS ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM
SUSPENSÃO (OSAs) EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente - POSPETRO da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente.

Orientador: Jorge Alberto Trigüis

Orientadora: Olívia Maria Cordeiro de Oliveira

Co-Orientador: Ícaro Thiago Andrade Moreira

Salvador

2014

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial à minha mãe, Márcia, ao meu pai, Alberto, aos meus avós e principalmente à minha tia Gil (*in memoriam*) que sempre será uma grande fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, ao meu pai e irmã, que com todo apoio e dedicação tornaram esta jornada possível e a minha cadelinha, por me receber feliz todos os dias.

Aos meus familiares, pela paciência, compreensão e por me incentivarem a crescer, sempre.

Aos amigos sempre presentes (Nailinha, Celi, Italo, Samy, Gabi, Sil, Laise, Letícia, Monta) por me proporcionarem momentos maravilhosos de distração.

Amigos conquistados na pós-graduação (Bel, Andressa, Maria, Nuria, Daiane, Carine, Verônica, Alexandre) por todas as experiências incríveis mesmo neste curto tempo juntos.

Ao professor Jorge Alberto Triguis, por me acolher como orientanda, acreditar no projeto e me enriquecer com doses enormes de incentivo.

À professora Olívia Oliveira, por toda a ajuda, e principalmente por me adotar como um dos seus filhos nessa família enorme e por estar sempre solícita e se dispor a resolver de forma simples e eficaz cada um dos meus problemas.

Ao amigo e doutor Ícaro Thiago, pelo estímulo, pela presença, por acreditar no meu potencial, pela confiança, pela ajuda nos momentos mais críticos, e por me apadrinhar nesse processo corrente de desenvolvimento acadêmico.

Ao Professor Antônio Fernando Queiroz, pelo empenho em possibilitar que este projeto acontecesse, juntamente aos professores e funcionários do POSPETRO.

À toda família NEA-LEPETRO (em especial Eduardo, Gisele, Jorginho, Marcos, Sara, Daniela, Claudia, Isabel, Karina, Cícero, Alex, Lula e Adriana) por darem todo apoio aos velhos e novos pesquisadores do nosso grupo.

Aos funcionários da Fundação Universidade Rio Grande (FURG) por possibilitarem hospedagem, transporte, alimentação e segurança durante o tempo em que estive realizando meu projeto no Rio Grande.

Ao CONECO, professores, pesquisadores e técnicos, pelo amparo ao projeto, por proporcionar a realização dos ensaios e orientações mais básicas.

Ao professor Gilberto Filmann, Professora Grasiela Pinho e Ítalo Castro pelo socorro, boas idéias e por todos os esclarecimentos.

À Sanye por estar do meu lado o tempo todo (nunca terei como agradecer o esforço) à Júlia, ao Rodrigo e Natália, pelos passeios turísticos e gastronômicos, pela diversão pelo acolhimento.

Ao LAMEB e professora Marlene pela confiança em gentilmente me emprestar equipamentos de monitoramento.

Aos técnicos do Laboratório do Plasma (IGEO/UFBA) e em especial ao doutorando Antônio Bonfim pelos litros de água destilada emprestada e por disponibilizar seus equipamentos para parte das análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao projeto Diagnóstico Geoambiental de Zonas de Manguezal e Desenvolvimento de Processos Tecnológicos Aplicáveis a Remediação dessas Zonas: Subsídios a um Programa de Prevenção de Impactos em Áreas com Potencial para Atividades Petrolíferas na Região Litoral Sul do Estado da Bahia (PETROTECMANGUE-BASUL), que disponibilizou recursos que tornaram possíveis a presente pesquisa.

A cada um dos indivíduos que precisou ser sacrificado para a execução desta pesquisa.

Sim, eu sei. Pode parecer maluquice, mas eu vou mesmo desparafusá-las e arremessá-las no jardim. Mesmo que não possam voar, ficarão entre as flores, o devido lugar das borboletas paralíticas. Não suporto mais essa ideia de abrir a janela, levantar os vidros e vê-las ali: disfarçadas de dobradiças

Rita Apena

RESUMO

Em um derramamento de petróleo em zonas de manguezal existe grande possibilidade da agregação do óleo com o material particulado em suspensão, o que poderá determinar o sedimento de fundo como destino final do OSA (Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão). Essa formação, em muitos casos poderá representar um grande risco aos organismos bentônicos e nectônicos. Testes de ecotoxicidade com esses organismos têm sido amplamente utilizados como uma das formas mais precisas de monitoramento biológico aos impactos antrópicos em diferentes ecossistemas. O presente trabalho avalia a ecotoxicidade da formação do OSA em simulações de manguezal, a partir de amostras de sedimento coletadas ao longo do estuário do Rio Pardo, município de Canavieiras, Bahia, por meio de ensaios em escala piloto com unidades de simulação, realizados com óleo da bacia de Campos. O procedimento foi feito através de testes toxicológicos de exposição aguda e crônica para determinar a CL_{50} (concentração letal 50%) utilizando o copépode *Nitokra sp.* e o microcrustáceo *Artemia salina*. Com base nos testes de sensibilidade foram caracterizados efeitos toxicológicos exibidos nos bioensaios onde foram analisados os níveis de mortalidade (sobrevivência). Foi verificado que, para *Nitokra sp.* o cenário onde se verificou a formação do OSA tem potencial menos tóxico (CL_{50} 70,71) em relação ao elutriado (CL_{50} 5,59) confirmando seu potencial como efetiva forma de limpeza para tratamento de óleo na água. Para *Artemia salina*, a concentração de sedimento em simulação de formação de OSA que apresentou maior potencial tóxico foi 200 mg/L apresentando valores iguais para superfície e fundo (CL_{50} 7,91%), já a concentração com menor potencial tóxico foi a de 300 mg/L (CL_{50} 31,5) para amostras de superfície. Com isso, o presente trabalho apresenta procedimentos inovadores para avaliação de ecotoxicidade da formação do OSA em ambientes simulados de manguezal, evidenciando a potencial adequação da *Nitokra sp.* e da *Artemia salina* em testes laboratoriais.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. *Nitokra sp.* *Artemia salina*. Sedimento de Manguezal. Petróleo. Agregado óleo-material particulado em suspensão (OSA).

ABSTRACT

In an oil spill in mangrove areas there is a high possibility of oil aggregation with the suspended particulate matter, which could determine the bottom sediment as the final destination of the OSA (Oil Suspended Particulate Matter Aggregates). This training, in many cases can pose a major risk to benthic organisms and nektonic. Ecotoxicity tests with those bodies have been widely used as one of the most accurate forms of biological monitoring the human impacts in different ecosystems. This study evaluates the ecotoxicity of the OSA formation in mangrove simulations, from sediment samples collected along the estuary of the Pardo river in the municipality of Canavieiras, Bahia State, through trials in pilot scale simulation units, carried out with oil in the Campos basin. The procedure was done through toxicological testing of acute and chronic exposure to determine the LC50 (lethal concentration 50%) using the copepod *Nitokra* sp. and the *Artemia salina* microcrustacean. Based on sensitivity testing toxicological effects were characterized shown in bioassays where mortality levels were analyzed (survival). It has been found that for *Nitokra* sp. the scenario where there was the formation of OSA has less potential toxicity (LC50 70,71) relative to the elutriate (LC50 5.59) confirming its potential as an effective treatment for cleaning of oil in water. For *Artemia salina*, the sediment concentration in OSA training simulation with the highest potential toxicity was 200 mg / L having the same values for surface and bottom (LC50 7.91%), since the concentration with less toxic potential was 300 mg/L (LC50 31.5) for sample superfície. Thus, this paper presents innovative procedures for ecotoxicity evaluation of the formation of OSA in simulated mangrove environments, demonstrating the potential suitability of *Nitokra* sp. and *Artemia salina* in laboratory tests.

Keywords: Ecotoxicology. *Nitokra* sp. *Artemia salina*. Mangrove sediment. Oil. Oil Suspended Particulate Matter Aggregates (OSA).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
1.2	JUSTIFICATIVA	15
1.3	PREMISSAS E HIPÓTESES	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	COLETA E ARMAZENAMENTO DO SEDIMENTO	19
3.2	ANÁLISES LABORATORIAIS DE CARACTERIZAÇÃO	22
3.3	BIOENSAIOS DE TOXICIDADE COM <i>Nitokra</i> sp.	24
3.4	BIOENSAIOS DE TOXICIDADE COM <i>Artemia salina</i>	31
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS	34
4	COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO COPÉPODE <i>Nitokra</i> SP. PARA TESTES TOXICOLÓGICOS EM SEDIMENTO ESTUARINO DURANTE A FORMAÇÃO DE AGREGADOS ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO (OSAS) E ELUTRIATO A PARTIR DE SEDIMENTO E ÓLEO CRU HOMOGENEIZADO	35
5	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO (OSAS) EM EXPERIMENTO DE SIMULAÇÃO A NÍVEL DE MICROESCALA	60
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICES	95

1 INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema costeiro de interface característicos de zona de estuário em regiões tropicais e subtropicais, sujeito à influência oceanográfica das mudanças de marés, dominado por espécies vegetais típicas, às quais se associam outros componentes da flora e da fauna, microscópicos e macroscópicos, adaptados a um substrato periodicamente inundado, com adaptações biogeoquímicas às grandes variações de salinidade. (SANTOS et al., 2012; QUEIROZ; CELINO, 2008). Nesse ambiente, embora altamente resiliente e resistente, a constituição granulométrica do sedimento proporciona retenção de poluentes, sendo sua toxicidade ampliada afetando de forma significativa a integridade do ecossistema. Os hidrocarbonetos de petróleo destacam-se como compostos mais prejudiciais, capazes de produzir danos imediatos para os organismos e seu dano vai depender tanto das características do óleo (tipo, quantidade, qualidade e estado de intemperismo) quanto das variações sazonais das condições climáticas e de maré dominantes (BRITO et al., 2009).

Considerando a vulnerabilidade das regiões de manguezal e diversos outros ecossistemas costeiros, a dispersão natural é altamente desejável para a remoção da mancha de óleo, pois favorece a dissolução dos hidrocarbonetos solúveis ou mais voláteis, que acabam sendo preferencialmente removidos por evaporação, e aumentam a área de interface óleo/água disponível para a atividade biológica podendo aumentar a degradação, tornando-se um processo mais rápido comparado a alternativas de limpeza de áreas submetidas a derrame de óleo (ITOPF, 2013).

Nesse aspecto, recentemente tem tido grande destaque estudos relacionados ao Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (Oil Suspended Material Particulate Aggregates - OSAs), um complexo que surge da interação entre partículas minerais e óleo em meio aquoso e destaca-se por ter sido amplamente reconhecido, uma vez que se configura como efetiva forma de limpeza para tratamento de óleo na água (LEE et al., 2002; KHELIFA et al., 2007; WANG et al., 2013; SUN et al., 2009). As gotas de óleo são facilmente fragmentadas em tamanhos de poucos micrômetros, o que leva à rápida transferência de manchas de óleo a partir da superfície do mar para a coluna de água aumentando sua superfície de contato (LE FLOCH et al., 2002; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002). Entre os fatores que influenciam a interação do óleo incorporado com a fase sólida incluem o caráter do óleo (viscosidade, composição), tipo de mineral (mineralogia, granulometria, teor de

matéria orgânica), energia hidrodinâmica do ambiente e salinidade da água (STOFFYN-EGLI; LEE, 2002; OWENS; LEE, 2003; SERGY et al., 2003).

A formação dessas gotículas pode aumentar a concentração de hidrocarbonetos em solução, aumentando também a biodisponibilidade desses produtos, promovendo não só o aumento da degradação natural como também aumento na toxicidade do óleo por conta da exposição de compostos como benzeno, tolueno e xileno. Esses compostos apresentam considerável solubilidade em água comparada a outros, o que torna os organismos marinhos mais vulneráveis, uma vez que absorvem esses contaminantes pelos tecidos, brânquias, por ingestão direta da água ou de alimento contaminado (ITOPF, 2013).

Organismos marinhos são utilizados com muita frequência na avaliação toxicológica de sedimentos por sua associação tanto com a fase líquida quanto com a fase sólida do ambiente, provendo respostas coerentes às diferentes implicações de cada uma dessas parcelas do ecossistema (USEPA, 1991). Em contrapartida, organismos zooplancônicos possuem total interdependência do ambiente aquático, sendo sua utilização adequada para ensaios de toxicidade em ambiente salino. Ambos os hábitos apresentam relevância para estudos de toxicidade por serem um elo trófico entre as comunidades de habitat marinho e as cadeias superiores (VEIGA; VITAL, 2002).

Pode-se definir os testes de toxicidade como ensaios laboratoriais, que quando realizados sob condições experimentais específicas e controladas, possibilitam estimar a toxicidade de diferentes substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Os ensaios toxicológicos baseiam-se na exposição de organismos-testes a diferentes concentrações da amostra que se pretende analisar, e os efeitos tóxicos exibidos são observados, descritos e quantificados. A descrição do efeito tóxico das substâncias analisadas em organismos marinhos e estuarinos é essencial para a manutenção da biodiversidade (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

Os primeiros registros de testes de toxicidade com organismos aquáticos datam de 1920, sendo os peixes utilizados primeiramente. Em décadas posteriores, 1940 e 1950, os trabalhos na área foram ganhando maior destaque e outros métodos foram surgindo. As diferenças nas condições experimentais foram aprimoradas, sendo que os primeiros trabalhos relacionados à toxicologia ambiental incluíam testes de ação de pesticidas em insetos e testes de qualidade de água com cladóceros. Nas citadas décadas de 40 e 50 se iniciaram estudos de efeitos de substâncias químicas e de resíduos sobre o meio ambiente, e com eles a constatação de que estes testes precisavam ser padronizados (HUNN, 1989 apud NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

De uma forma geral, os ensaios de toxicidade devem ser regulados por órgãos que desenvolvem protocolos de testes e normas técnicas. No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento destes protocolos é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também padroniza testes de toxicidade. Outros órgãos internacionais como *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Water Work Association* (AWWA), *Deutsches Institut für Normung* (DIN), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD), também têm se concentrado no desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade que definam limites de toxicidade que são permitidos com níveis de incerteza aceitáveis e que sirvam de referência para as entidades reguladoras para a tomada de decisões (COSTA et al., 2008).

Os testes de toxicidade são classificados em agudos e crônicos. Os testes de toxicidade crônica servem para estimar os efeitos tóxicos de substâncias em condições de exposição prolongada a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que não limitem a sobrevivência dos organismos, mas que de alguma forma afetem suas funções biológicas em condições como mobilidade, reprodução, alimentação ou outras funções metabólicas. Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como CENO (Concentração de Efeito Não-Observado) ou CEO (Concentração de Efeito Observado), mas também podem ser expressos como CE₅₀ (Concentração Efetiva Média em 50% dos organismos) (ARAÚJO; ARAÚJO-CASTRO; SOUZA-SANTOS, 2006; KUSK; WOLLENBERGER, 2007; ARAÚJO-CASTRO, 2008; ARAÚJO-CASTRO et al., 2009; GARCIA, 2009; OLIVEIRA, 2011).

Os testes de toxicidade aguda são amplamente utilizados para medir os possíveis efeitos de substâncias tóxicas sobre determinadas espécies durante um curto período de tempo comparado ao período de vida do organismo-teste em questão. Avalia a dose ou concentração de um agente tóxico que permitiria produzir uma reação específica mensurável em um organismo-teste, em um período de tempo curto, geralmente de 24 à 96 h. O principal efeito mensurado em estudos de toxicidade aguda é a letalidade ou algum outro comportamento que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade. Os testes de toxicidade aguda admitem valores de CE₅₀ (Concentração Efetiva) e CL₅₀ (Concentração Letal). Os valores de concentrações efetivas e letais são sempre relacionados a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podendo ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA et al., 2008).

Diversos estudos foram realizados para determinação da toxicidade de hidrocarbonetos de petróleo, no entanto, merecem destaques alguns trabalhos que relacionam a presença de óleo em sedimento e sua resposta toxicológica pra diferentes organismos (CRUZ; TRIGÜIS; QUEIROZ, 2012; COSTA, 2010).

Em estudos de simulação de derrames de óleo, tem-se verificado através de análises toxicológicas que existem respostas significativas diretamente relacionadas à degradação do óleo (CRUZ; TRIGÜIS; QUEIROZ, 2012). Outros testes revelaram que tratamentos como peneiramento aumentam a toxicidade do sedimento contaminado com óleo e submetido a tratamentos de remediação para copépodos, reduzindo significativamente a fecundidade para esses organismos (COSTA, 2010). No Apêndice A é apresentado um referencial mais amplo acerca dos estudos recentes elaborados sobre o OSA e acerca dos organismos utilizados neste estudo.

Para Castro (2009), ensaios toxicológicos conferem uma das formas mais precisas de monitoramento biológico em ambientes de manguezal submetidos a impactos antrópicos, por isso, merecem destaque seus trabalhos realizados com três diferentes frações do hidrocarboneto onde estipulou a relação da toxicidade aguda para microorganismos com a densidade do óleo, demonstrando que a toxicidade mais acentuada varia para os tipos de óleo mais leve ao mais pesado, devido à alta volatilidade dos hidrocarbonetos, que evidenciaram ser mais tóxicos, por apresentarem uma concentração maior dos compostos aromáticos.

Com base nos testes de sensibilidade a partir da substância de referência (Dodecil Sulfato de Sódio - DSS), foram caracterizados possíveis efeitos toxicológicos e fisiológicos exibidos em diferentes bioensaios e analisados os níveis de mortalidade (sobrevivência). Com isso, o presente trabalho apresenta procedimentos inovadores para avaliação da ecotoxicidade após a formação do OSA em ambientes de manguezal evidenciando a potencial adequação da *Nitokra* sp. e da *Artemia salina* em testes laboratoriais.

1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A extensão brasileira de áreas costeiras tem sido constantemente ameaçada pelos impactos do setor petroquímico que concentra mais da metade da produção de óleo bruto e quase toda a produção de gás natural em plataformas marítimas (ZIOLLI, 2002).

Dentre os ecossistemas costeiros, o manguezal destaca-se como um dos mais produtivos da biosfera. É característico de zona de estuário em regiões tropicais e subtropicais e está sujeito à influência oceanográfica das mudanças de marés. Uma vez que os manguezais encontram-se junto à costa, local com maior frequência dos derramamentos de petróleo, o ecossistema passa a ser constantemente ameaçado por esse tipo de poluente (QUEIROZ; CELINO, 2008).

De acordo com Gundlach e Hayes (1978), o manguezal é classificado como um dos ecossistemas costeiros mais sensíveis e vulneráveis a vazamentos de óleo. O óleo pode manter-se persistente neste ecossistema por anos, o que torna as técnicas que permitam limpar ou remover o petróleo destes ambientes bastante limitadas. Por isso, a aplicação de dispersantes em derrames de óleo tem sido considerada uma opção tecnicamente viável, sendo os dispersantes definidos como formulações destinadas a reduzir a tensão superficial entre óleo e água auxiliando a dispersão do óleo em gotículas no meio aquoso (BRASIL, 2000).

Atualmente no Brasil, a utilização de dispersantes é regulamentada pela resolução do CONAMA nº 269 de 14 de setembro de 2000, que constitui, entre outras determinações, os critérios e restrições para a tomada de decisão quanto ao uso de dispersantes, embora não seja permitido o uso de dispersantes químicos em ambientes costeiros abrigados e sensíveis, como é o caso dos manguezais. Considerando a alta sensibilidade das regiões costeiras, a utilização de dispersante é criteriosamente estabelecida e aceita somente se resultar em menor prejuízo ambiental, quando comparado ao efeito causado por um derrame sem qualquer tratamento, ou empregado como opção alternativa ou, ainda, adicional à contenção e recolhimento mecânico no caso de ineficácia desses procedimentos de resposta (BRASIL, 2000).

Além da alta vulnerabilidade das regiões costeiras, o uso de dispersantes é uma alternativa controversa, pois apesar do intuito de minimizar os danos causados pela mancha de óleo, muitas espécies apresentam grande sensibilidade aos seus componentes, bem como aos hidrocarbonetos que se tornam biodisponíveis (GESAMP, 1993).

Ao contrário da dispersão atenuada pelos surfactantes, a dispersão natural através da associação do óleo com o material particulado em suspensão é altamente desejável para a remoção da mancha de óleo, pois favorece a dissolução dos hidrocarbonetos solúveis ou mais voláteis, que acabam sendo preferencialmente removidos por evaporação, e aumentam a área de interface óleo/água disponível para a atividade biológica podendo aumentar a degradação, tornando-se um processo mais rápido comparado a alternativas de limpeza de áreas submetidas a derrame de óleo (PIMENTEL, 2007).

O copépode *Nitokra* sp. embora não normatizado no Brasil para testes de toxicidade, tem sido amplamente empregada em bioensaios toxicológicos realizados em sedimento por apresentar características peculiares que favorecem sua utilização como organismo-teste. Entre estas características destacam-se o enorme potencial para cultivo em condições laboratoriais, o seu caráter generalista quanto à granulometria do sedimento, constância na sua sensibilidade quanto à substância de referência (DSS), íntima associação com o ambiente sedimentar, alta abundância e curto ciclo de vida e importância ecológicas elevada. Além disso, representantes com estágios de vida variados podem ser obtidos de cultivos a qualquer época do ano, são fáceis de cultivar em laboratório e requerem espaço mínimo e poucos equipamentos para realização dos testes (FERRAZ et al., 2010; FURLEY et al., 2010; ZARONI et al., 2010; SOUSA et al., 2012).

O microcrustáceo *Artemia salina* (LEACH, 1819), é utilizado extensivamente como organismo-teste em ensaios laboratoriais ecotoxicológicos principalmente relacionados à ambientes estuarinos, marinhos e hipersalinos. Entre as características intrínsecas que fazem com que este organismo seja amplamente utilizado em ensaios laboratoriais, podem ser citadas a ampla faixa de tolerância à salinidade (5-250) e temperatura (6-25°C); o ciclo de vida curto; alta adaptabilidade às adversidades ambientais e condições de ensaio e cultivo; alta fecundidade (reprodução bissexuada ou partenogenética); tamanho pequeno; dieta não seletiva; alta adaptabilidade a variados nutrientes, garantindo confiabilidade, viabilidade e custo-efetividade aos ensaios (NUNES et al., 2006).

O escopo deste trabalho parte da necessidade de se identificar novas técnicas com aplicabilidade metodológica para teste toxicológico, que vise validar a formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA) como mecanismo de grande eficácia à remediação em casos de acidentes com hidrocarbonetos em ambientes costeiros.

1.2 JUSTIFICATIVA

Segundo Mançú e colaboradores (2006) as empresas nacionais e estrangeiras têm dado prioridade à gestão de impactos ambientais na exploração e produção de petróleo no Estado da Bahia, destacando em suas principais iniciativas a alocação de esforços e recursos para a gradativa construção de um adequado Sistema de Gestão Ambiental, tendo em vista que a

indústria do petróleo traz na essência das suas atividades de prospecção, extração, produção e serviços, a geração de resíduos que podem representar riscos para o meio ambiente.

Levando em consideração o ritmo gradual de exploração do petróleo em ambientes costeiros, é necessária uma política de gestão plausível para tomada de decisão baseada na quantificação dos riscos da exposição a hidrocarbonetos de petróleo e outros compostos para áreas contaminadas.

A Toxicologia é uma ciência que tem como objeto de estudo o possível efeito nocivo causado pela interação entre um agente tóxico e um sistema biológico, com o objetivo principal de precaver o aparecimento desse efeito, ou seja, prover critérios para condições seguras de exposição a essas substâncias. O estudo ecotoxicológico é amplamente aplicável a diversas situações de impacto ambiental por compostos químicos, representando uma útil ferramenta para gestão ambiental de áreas costeiras afetadas por processos de derramamento de petróleo (PEDROZO et al., 2002).

Em concordância com Castro (2009) considera-se que as análises toxicológicas permitem determinar, a partir de simulações que integram métodos de avaliação de exposição e de risco fornecendo relevantes subsídios ao processo de tomada de decisão, principalmente referentes à alocação de recursos, à urgência de ações corretivas, à necessidade de remediação, aos níveis de remediação aceitáveis e às alternativas tecnológicas aplicáveis, justificando o escopo deste projeto aplicável principalmente à gestão de áreas costeiras contaminadas.

1.3 PREMISSAS E HIPÓTESES

- O Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA) compreende uma formação natural ecologicamente coerente, que contribui de forma singular para dispersão de óleo;
- testes ecotoxicológicos podem prover respostas acerca do grau de nocividade da exposição ao óleo cru e a formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA);

- *Artemia salina* e *Nitokra* sp. podem ser aplicados como organismos-teste em bioensaios com componentes de petróleo, respondendo de forma coerente às diferentes concentrações às quais são expostos;
- a formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA) é menos nociva aos organismos quando comparado à exposição ao óleo cru;
- diferentes concentrações de sedimento em unidades de simulações de manguezal, a nível de microescala, exercem potenciais de toxicidade distintos para o microcrustáceo *Artemia salina*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a resposta toxicológica do copépode harpacticóide *Nitokra sp.* e do microcrustáceo *Artemia salina* em testes de avaliação de toxicidade aguda relacionados à formação do OSA em simulação de ecossistema de manguezal a nível de microescala em comparação com a exposição ao óleo cru.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de toxicidade aguda a partir de diferentes ambientes simulados contaminados com petróleo, variando a concentração de sedimento, para determinar a CL_{50} sob a *Nitokra sp.* e à *Artemia salina* com base nos testes de sensibilidade;
- caracterizar o efeito toxicológico definindo os níveis letais de exposição após formação do Agregado Óleo-material Particulado em Suspensão (OSA) sobre a *Artemia salina* e a *Nitokra sp.* em sedimentos de manguezal;
- efetuar uma análise comparativa da toxicidade associada à exposição à fase aquosa de uma simulação onde ocorreu a formação de Agregado Óleo-material Particulado em Suspensão (OSA) em diferentes concentrações de sedimento, a partir da utilização de testes de exposição direta em simulações em microescala;
- correlacionar os parâmetros físico-químicos monitorados com os possíveis efeitos dos testes toxicológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada baseou-se em ensaios toxicológicos com testes estáticos sem renovação, onde seja possível determinar possíveis efeitos adversos da exposição à amostras colhidas em ensaios onde foi simulado a formação do OSA e ao óleo cru sobre a sobrevivência do copépode *Nitokra* sp. e do microcrustáceo *Artemia salina* (teste agudo). Os testes agudos com a fase líquida permitiram estimar o valor percentual de diluição, que representa letalidade ou imobilidade como efeito estatisticamente observável para o organismo-teste.

O copépode *Nitokra* sp. foi utilizado como organismo-teste em ensaios agudos para testes toxicológicos representativos das amostras de sedimento, devido ao seu hábito bentônico estar intimamente associado às condições do sedimento. O microcrustáceo *Artemia* s. foi utilizado para os testes agudos em simulações a nível de microescala da formação do OSA em ambiente de manguezal.

Para cada um dos ensaios foram avaliados três modelos toxicológicos de exposição. O primeiro modelo representa a exposição dos organismos ao ambiente simulado com formação do OSA, o segundo modelo é representativo da exposição ao ambiente sem formação de OSA, e o terceiro modelo corresponde ao ambiente controle.

Para realização desses ensaios foram efetuadas várias etapas, incluindo coleta e armazenamento do sedimento, análises laboratoriais e de caracterização deste sedimento, cultivo e aclimação dos organismos, pré-testes com substâncias de referência e testes definitivos.

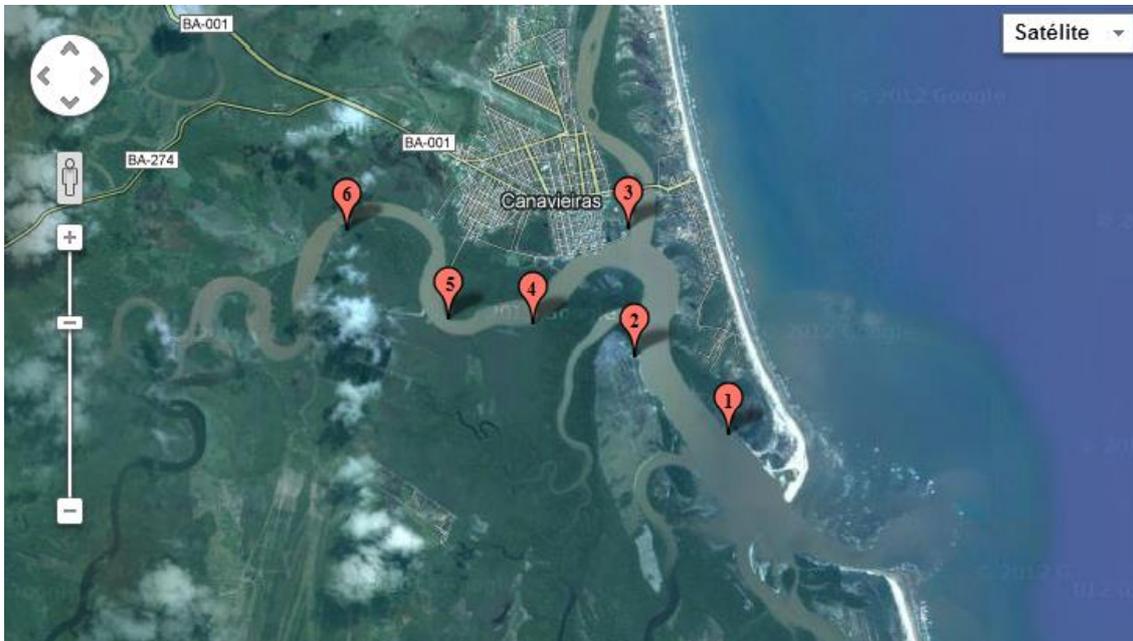
Durante todo o andamento do projeto, foram realizados levantamentos bibliográficos constantes a fim de enriquecer as informações referentes aos ensaios, processos e técnicas utilizadas e objetivando também a publicação das ações acima explicitadas.

3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DO SEDIMENTO

Para cada uma das três simulações propostas, foram amostrados sedimento em seis pontos durante a baixa-mar ao longo do Rio Pardo, nas proximidades do município de Canavieiras, Bahia (Figuras 3.1 e 3.2), tomando-se o cuidado de coletar o sedimento nos primeiros cinco centímetros, com uma espátula de aço inoxidável previamente

descontaminada e ambientada com água local. Os parâmetros físico-químicos do sedimento (pH, Eh, temperatura, salinidade, e condutividade) foram medidos *in situ* utilizando uma sonda multiparâmetro.

Figura 3.1 - Imagem por satélite da área de estudo indicando os seis pontos de coleta ao longo do Rio Pardo, município de Canavieiras, Bahia

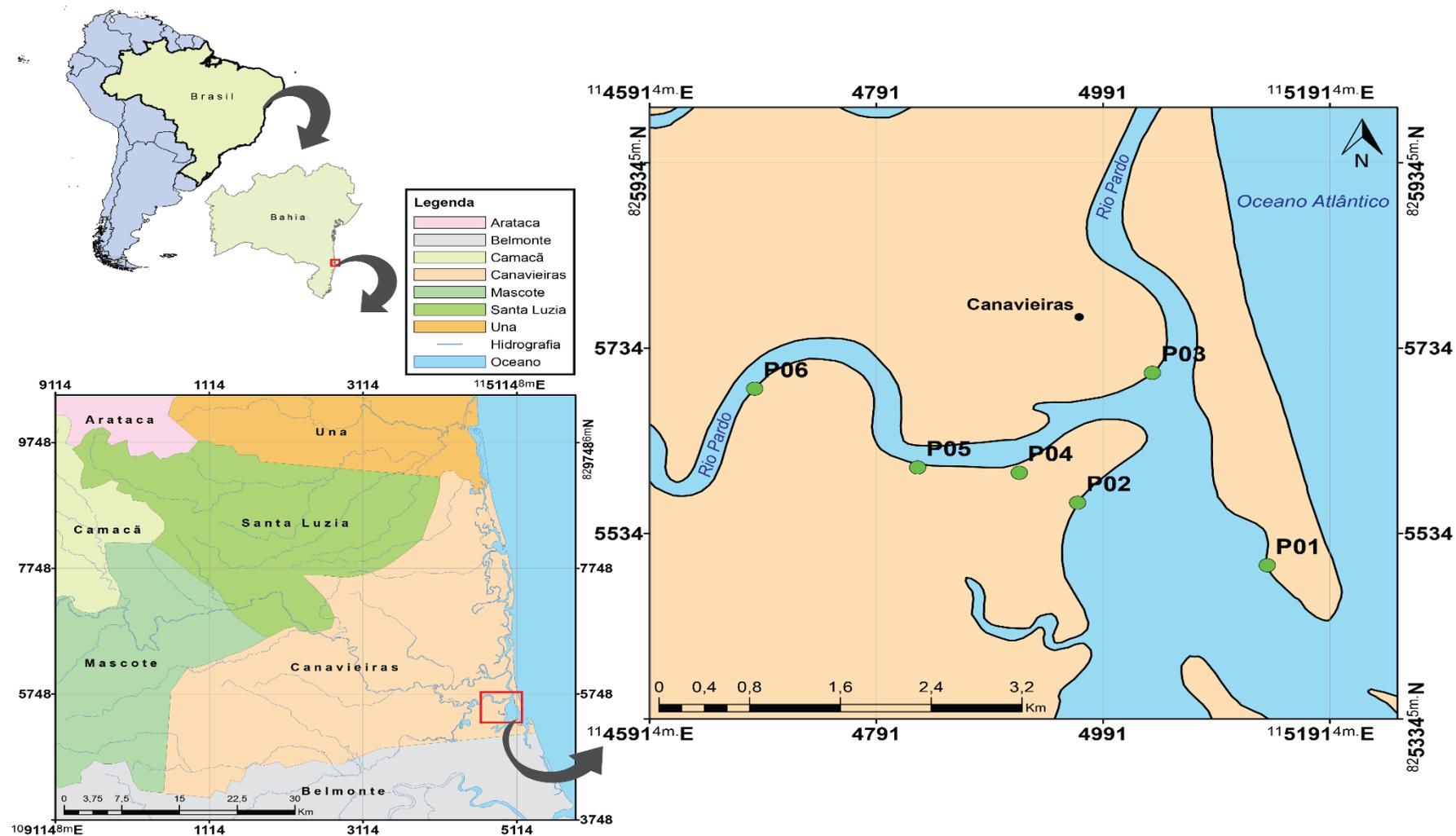


Fonte: Google Maps/BatchGeo, 2013

A coleta do sedimento respeitou os limites de um transecto com aproximadamente quatro metros de comprimento onde foram aleatoriamente coletadas 20 porções do substrato de manguezal e homogeneizados em bandeja de vidro (Figura 3.3), e devidamente acondicionados.

O sedimento foi armazenado em recipientes de vidro (para caracterização), e de alumínio (para simulação) ficando mantido durante o transporte em caixas de isopor com gelo conservando-se a temperatura de até 4°C até chegar ao Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO/IGEO/UFBA). No Apêndice B são apresentados maiores detalhes e justificativas para escolha específica da área de estudo.

Figura 3.2 - Mapa representativo da área de estudo indicando os pontos amostrais localizados ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, Bahia

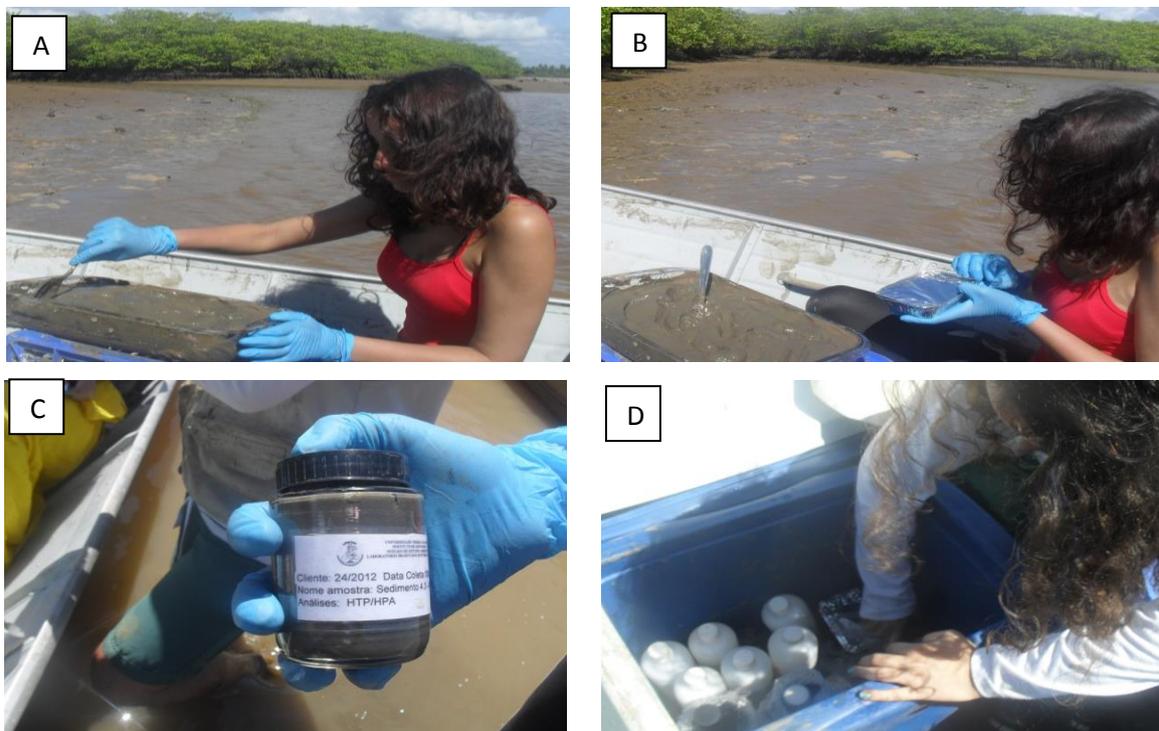


Fonte: A autora, 2013

Para a caracterização, as amostras foram liofilizadas para secagem utilizando liofilizador (Liotop modelo L101), em seguida foram moídas e desagregadas em almofariz e posteriormente homogeneizadas e peneiradas em peneiras de fibra de nylon, a fim de separar a fração inferior a 200µm, para retirada dos fragmentos mais grosseiros.

Para a simulação, cada amostra de sedimento foi calcinada em mufla a 450°C, por 6 horas para eliminação da matéria orgânica, homogeneizada, peneirada com uma malha de 100 µm. Esse material foi mantido em geladeira a 4 °C em recipientes de vidro por um período de 24 horas até a distribuição do sedimento nos recipientes-testes para o início dos bioensaios.

Figura 3.3 - Homogeneização e acondicionamento do sedimento coletado às margens do Rio Pardo no Município de Canavieiras, Bahia, para composição do protocolo de formação do OSA. (A) Homogeneização do sedimento em recipiente de vidro. (B) Armazenamento do sedimento em recipientes de alumínio para simulação. (C) Armazenamento do sedimento coletado em potes de vidro. (D) Caixa térmica para conservação do sedimento coletado.



Fonte: A autora, 2013

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS DE CARACTERIZAÇÃO

A caracterização das matrizes óleo e sedimento foram realizadas no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO/IGEO/UFBA), e compreenderam às análises de granulometria em sedimento, e grau API (densidade) e viscosidade/fluidez, HTP e HPA no

óleo. As análises de sedimento não excederam o prazo de 48 horas após as coletas. As técnicas são explicitadas no Quadro 3.1 e posteriormente descritas em maiores detalhes.

Quadro 3.1 - Relação dos parâmetros monitorados relativos às matrizes sedimento e óleo utilizados nos experimentos de simulação de OSA, precedidos de descrição do equipamento/técnica e seu limite de detecção

Análise	Equipamento /Técnica	Matriz	
		Sedimento	Óleo
pH	Medidor de pH portátil ($\pm 0,01$ unidades de pH)	x	
Eh	Medidor de Eh portátil ($\pm 0,01$ unidades de Eh)	x	
Temperatura	Termômetro acoplado ao oxímetro ($\pm 0,5^\circ$ C)	x	
Salinidade	Condutivímetro portátil (0,05%)	x	
Condutividade	Condutivímetro portátil (0,05%)	x	
Oxigênio dissolvido	Sonda Multiparâmetro	x	
Granulometria	Difração a laser (mod. Silas 1064)	x	
Grau API/Densidade	DMA 5000 Density Meter		x
Viscosidade / Fluidez	ASTM D97		x
Hidrocarbonetos totais de petróleo e Policíclicos Aromáticos (HTP e HPA)	Cromatografia líquida		x

Para exata caracterização e descrição das amostras de sedimento a serem utilizadas nos ensaios, foram necessárias análises laboratoriais que permitiram realizar uma descrição precisa das características mais relevantes desse sedimento e das variáveis que interferem na formação do OSA, possibilitando uma correlação com os posteriores resultados.

É importante destacar que antes de iniciar as análises aqui descritas, as amostras passaram por um pré-tratamento que inclui: a liofilização para retirada da umidade; a posterior desagregação, para desintegração de partículas mais grosseiras; o peneiramento e a homogeneização, que possibilitaram a realização das análises com a fidelidade estatística desejada.

- a) **Granulometria:** para a análise granulométrica foi utilizado um analisador de partículas com difração a Laser Modelo Cilas 1064. O método consistiu em pré-tratamento da amostra com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para degradar a matéria orgânica (EMBRAPA, 2009). Após essa etapa, adicionou-se hexametáfosfato de sódio

($\text{Na}_{(n+2)}\text{P}_n\text{O}_{(3n+1)}$) e deixou-se por aproximadamente 16 horas, sob agitação, para evitar floculação. As amostras foram classificadas por faixa granulométrica (areia, silte e argila) segundo a classificação de Folk e Ward (1957). Dados brutos são apresentados no Apêndice C.

- b) Hidrocarbonetos Totais de Petróleo e Policíclicos Aromáticos (HTP e HPA):** A determinação dos compostos orgânicos foi realizada com extração em cromatografia líquida e posterior análise em um cromatógrafo a gás VARIAN modelo CP 3800 equipado com coluna capilar DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de filme) e detector de ionização de chama (CG - FID). As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor de 300 °C, temperatura inicial do forno a 40 °C; 40 °C (por 2 minutos) numa rampa de 10 °C min^{-1} até 300 °C por 12 minutos. O hélio foi usado como gás carreador a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} e uma razão de separação de 10:1 (BARRAGAN, 2012).
- c) Densidade / Grau API:** Foi realizado segundo a norma ASTM 5002 e ISO 12.185 com análise no equipamento da marca DMA 5000 Density Meter.
- d) Ponto de Fluidez:** Primeiramente a amostra foi colocada numa solução com etileno glicol e água e colocada na estufa a temperatura de 60 °C para solubilizar e ser analisada no equipamento Cloud Pour Point (HERZOG HCP 852), segundo a norma ASTM D97.

3.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE COM *Nitokra* sp.

Este item descreve a utilização da *Nitokra* sp. em testes de toxicidade em simulações de ambientes que foram expostos ao derrame de óleo. Foram feitos testes de referência com uma substância de toxicidade conhecida (Dodecil Sulfato de Sódio - DSS) para composição da carta-controle, com o objetivo de ilustrar a regularização da sensibilidade do cultivo dos organismos utilizados para os testes, descrita no subtópico 3.3.2. Também foram realizados ensaios representativos da fração aquosa gerada com a simulação da formação do OSA a nível de microescala descrito no subtópico 3.3.3 e testes com elutriato oriundo da homogeneização de sedimento e óleo (subtópico 3.3.4).

É importante destacar que cada ensaio foi acompanhado de análises dos parâmetros físico-químicos associados (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade) no período

inicial e final dos testes para controlar as condições básicas de exposição e subsidiar a interpretação dos resultados (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

3.3.1 Cultivo e aquisição dos organismos

A aquisição dos organismos e realização desta etapa do trabalho foi permitida através de parceria com o Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) onde os copépodes foram cultivados.

O cultivo é realizado em erlenmeyers com capacidade para 1L, contendo cerca de 750 mL de água do mar artificial nas salinidades 5,15 e 30. Os erlenmeyers são tampados com algodão e gase para não interferir nas trocas gasosas e evitar a evaporação da água (SOUSA et al., 2002).

As culturas foram mantidas em sala climatizada na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa com fotoperíodo de 12h claro/escuro e sem aeração. A água utilizada nos cultivos e nas trocas parciais, realizadas a cada 15 dias, foi reconstituída com sal marinho artificial da marca CoralLife[®]. A alimentação é feita com algas das espécies *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii* e complementada com dieta preparada com ração para peixe da marca TetraMin[®]. A dieta foi fornecida de 2 a 3 vezes por semana, adicionando 3 mL da ração em cada erlenmeyer.

O cultivo dessa espécie no laboratório CONECO foi realizado em três salinidades diferentes (5, 15 e 30), mas em todos os testes realizados neste trabalho foram utilizados os organismos que estavam na salinidade 15 devido à comprovação das melhores condições ambientais não só para o organismo (FERRAZ et al., 2010) mas para proporcionar a formação do OSA (MOREIRA, 2014).

Para que estes organismos pudessem ser utilizados nos ensaios, foi necessário selecioná-los a partir de uma pequena porção do cultivo peneirada em malha de 125 μm para que possam ser utilizados apenas os indivíduos adultos que foram posteriormente contados e separados na lupa (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

3.3.2 Testes com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS):

O teste de sensibilidade foi realizado a partir da seleção de machos adultos e fêmeas não ovadas que são utilizados como organismo-teste. Os organismos foram selecionados com o auxílio de uma lupa (estereomicroscópio óptico) usando placa de petri com água salobra artificial, após a separação dos mesmos do meio de cultura por uma peneira de 125 μm de abertura de malha.

A solução estoque foi preparada em balões de 100 mL onde foram adicionados 10 mg de Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) para cada 100 mL de água salgada em salinidade 15 que é obtida através da diluição de 30g de sal marinho artificial em 500 mL de água e avolumado para um litro.

Cinco concentrações foram testadas, com três réplicas por concentração, com as seguintes concentrações: 0 (controle), 4, 6, 8, 10 e 12 mg.L^{-1} . Suas exatas proporções de diluição são apresentadas na Tabela 3.1. Dez machos adultos ou fêmeas não ovadas foram expostos em cada recipiente contendo 20 mL da solução de diluição.

As condições para o ensaio (Quadro 3.2) foram mantidas respeitando o fotoperíodo de 16h de claro e 8h de escuro, temperatura de 25°C durante 96h. O *endpoint* observado é CL_{50} de 96h. Ou seja, após uma exposição de quatro dias, são contados os organismos vivos e mortos e cada teste com o auxílio de um microscópio ou lupa. Foi também realizado um teste agudo com a água do cultivo para manter a certificação da qualidade das culturas (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

Tabela 3.1 - Relação entre as concentrações e proporções de diluição do DSS em água salobra artificial para preparação das soluções-teste para ensaio de toxicidade aguda com *Nitokra* sp.

Concentrações (mg.L^{-1})	Solução estoque (mL)	Água Salobra (mL)
12	12	88
10	10	90
8	8	92
6	6	94
4	4	96
0	-	100

Quadro 3.2 - Condições para ensaio de toxicidade aguda (mortalidade) com *Nitokra* sp. para substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1°C
Salinidade	15
Fotoperíodo	Natural (16h claro/8h escuro)
Sistema de ensaio	Estático
Duração do ensaio	96h
Volume da solução-teste	10 mL
Réplicas por diluição	3
Organismos por réplica	10
Idade dos organismos	Adultos
Efeito observado	Letalidade (CL ₅₀)
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de sobrevivência no controle

No presente trabalho foram realizados testes toxicológicos agudos em experimentos de simulação, com elutriato derivado de sedimento homogeneizado e com a fase aquosa do experimento de simulação de formação do OSA a nível de microescala. Foram considerados para efeito de comparação dois principais cenários, sem formação de Agregados Óleo – Material Particulado em Suspensão e com a formação de Agregados Óleo – Material Particulado em Suspensão. Os testes agudos foram realizados a partir de diluições percentuais no elutriato (oriundo do sedimento) e fase aquosa (oriunda do experimento de simulação de formação do OSA), com água salobra artificial em salinidade 15.

3.3.3 Simulação em microescala para formação do Agregado Óleo – Material Particulado em Suspensão (OSA)

Noventa erlenmeyers foram preenchidos com 250 mL de água salobra artificial em salinidade 15 e pesados 0,175g de sedimento para cada um, a fim de respeitar o valor de 0,7 g/L de concentração de sedimento, uma vez que segundo Sun e Zeng (2009) esta é a concentração máxima para formação de OSA em partículas de até 16 µm.

O sedimento foi transferido para os erlenmeyers com a ajuda de um pissete com água salobra artificial. Cada um deles foi tampado com papel alumínio, colocado por um minuto em mesa agitadora e deixado em descanso por uma noite em temperatura de 15°C em ambiente escurecido. No dia seguinte, cada um dos erlenmeyers passou mais um minuto em mesa agitadora a 2,1 Hz (126 RPM) e posteriormente foram adicionados 0,05g (50 mg ou 0,05 cm³) de óleo, considerando o valor esperado de 50 mg. Sucedeu-se mais três horas de

agitação em mesa agitadora recíproca a 126 RPM e mais um descanso por uma noite (MOREIRA, 2014).

As amostras foram filtradas a vácuo para captação dos agregados formados em filtro de acetato de celulose como descrito por Khelifa et al. (2007) e armazenadas em frascos de vidro escurecido com a ajuda de um pissete de ponta fina contendo água salobra em salinidade 15.

Foram necessários 6 dias de preparo para aquisição da massa mínima total de sedimento contaminado (12g) requerida para os ensaios de toxicidade crônica do sedimento de fundo, onde foram avaliadas três réplicas de cada uma das 6 diluições percentuais (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 1%) e um controle positivo (branco 0%).

3.3.4 Protocolo de preparação do elutriato

Muitos estudos de toxicidade de sedimento têm avaliado a extração do sedimento em suspensão, chamados de elutriato, como representação aquosa das características do sedimento. É importante destacar que os elutriatos não refletem integralmente a toxicidade total do sedimento, uma vez que existem diferenças na biodisponibilidade dos contaminantes, por isso em geral são menos tóxicos do que o sedimento em si.

O método para preparação do elutriato seguiu as normas da USEPA (United States Environmental Protection Agency) descritas no Technical Manual (USEPA, 2001) onde se sugerem os procedimentos descritos a seguir.

Foi combinado uma parte de sedimento em quatro partes de água salobra em salinidade 15, a mistura foi vigorosamente agitada por uma hora em mesa agitadora. O composto foi centrifugado por 10 minutos a 4.000 RPM com o objetivo de isolar o sedimento da fase aquosa e então foi utilizado imediatamente após o preparo. O preparo do sedimento para realização dos testes e para o elutriato seguiu as quantidades dispostas na Tabela 3.2 a seguir, onde são apresentadas as proporções ideais obtidas para realização dos ensaios de toxicidade.

Tabela 3.2 - Proporção de sedimento e óleo para a preparação do elutriato para os testes toxicológicos agudos (ideal x real) utilizando o copépode *Nitokra* sp.

Diluições Percentuais	Sedimento Limpo (g)		Sedimento + Óleo (g)		Óleo (g)
	Ideal	Real	Ideal	Real	
100%	20	20	-	-	20
50%	20	20	20	19,998	-
25%	30	29,720	10	9,938	-
12,5%	35	35,023	5	4,839	-
6,25%	37,5	37,507	2,5	2,730	-
1%	39,6	39,499	0,4	0,573	-

3.3.5 Testes toxicológicos agudos com fase aquosa da simulação em microescala de formação do OSA

Foram realizados testes toxicológicos agudos em amostras da fase aquosa dos experimentos de simulação de formação do OSA em ambiente de manguezal a nível de microescala, utilizando água salobra artificial em salinidade 15 e a parcela aquosa adicionada durante o preparo descrito no subitem 3.3.3 (simulação em microescala para formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão), adicionando frações coletadas de superfície com pipeta automática nas seguintes proporções (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Valores utilizados de fase aquosa do protocolo de formação do OSA em microescala e água salobra artificial para testes de toxicidade aguda utilizando o copépode *Nitokra* sp.

Diluições Percentuais	Fase Aquosa (mL)	Água Salobra Artificial (mL)
100%	15	-
50%	7,5	7,5
25%	3,75	11,25
12,5%	1,87	13,13
6,25%	0,94	14,6
1%	0,15	14,85

As condições do ensaio de toxicidade aguda para as amostras de simulação com a fase aquosa durante experimentos de simulação do OSA estão descritas no Quadro 3.3. Para cada

ensaio foi utilizada apenas a concentração de OSA de 700 mg/L de sedimento para aproximadamente 0,05g de óleo, em sete diluições, com três réplicas para cada diluição, com as seguintes proporções percentuais: 0% (controle); 1%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; e 100%.

Quadro 3.3 - Condições para ensaio de toxicidade aguda (mortalidade) com *Nitokra* sp. para a amostras da fase aquosa dos experimentos de simulação de formação do OSA

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1°C
Salinidade	15
Fotoperíodo	Natural (16h claro/8h escuro)
Sistema de ensaio	Estático
Duração do ensaio	96h
Volume da solução-teste	15 mL
Réplicas por diluição	3
Número de diluições	7
Organismos por réplica	10
Idade dos organismos	Adultos
Efeito observado	Letalidade (CL ₅₀)
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de sobrevivência no controle

3.3.6 Teste toxicológico agudo com elutriato

Para esse teste, foi utilizada a mesma metodologia e condições experimentais dos testes agudos supracitados. Seis diluições percentuais foram testadas, com três réplicas por concentração, nas seguintes proporções: 0% (controle); 0,5%; 1%; 6,25%; 12,5%; 25%, nas exatas proporções de diluição que são mostradas na Tabela 3.4. Dez machos adultos ou fêmeas não ovados foram adicionados em cada recipiente contendo 15 mL da solução de diluição efetuada a partir do elutriato.

As condições para o ensaio foram mantidas similarmente àquelas apresentadas no Quadro 3.3, respeitando o fotoperíodo de 16h de claro e 8h de escuro, temperatura de 25°C durante 96h.

Tabela 3.4 - Valores utilizados de elutriato e água salobra artificial para testes de toxicidade aguda com o copépode *Nitokra* sp.

Diluições Percentuais	Elutriato (mL)	Água Salobra Artificial (mL)
25%	3,75	11,25
12,5%	1,87	13,13
6,25%	0,94	14,6
1%	0,15	14,85
0,5%	0,075	14,925

3.4 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE COM *Artemia salina*

Neste item será abordada a metodologia aplicada para a utilização do microcrustáceo *Artemia salina* em testes de toxicidade agudos para determinação da concentração letal das amostras de simulações a nível de microescala de formação de OSA em manguezal para 50% dos organismos expostos por um período de 48 horas (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

A realização dos procedimentos para os ensaios em microescala foi descrita no subtópico 3.3.3, em três diferentes concentrações de sedimento: 50, 200 e 300 mgL⁻¹. Para cada unidade de simulação, foi utilizado 250 mL de água salobra artificial (salinidade 15) e aproximadamente 0,05g (50 mg ou 0,05 cm³) de óleo (MOREIRA, 2014).

A realização das coletas de água para teste em microescala está associada à existência de protocolo confeccionado com o objetivo de simular o derramamento experimental e o posterior tratamento de remediação em ecossistema manguezal. Esse protocolo pertence à uma etapa vinculada ao projeto de pesquisa financiador (Diagnóstico Geoambiental de Zonas de Manguezal e Desenvolvimento de Processos Tecnológicos Aplicáveis a Remediação dessas Zonas: Subsídios a um Programa de Prevenção de Impactos em Áreas com Potencial para Atividades Petrolíferas na Região Litoral Sul do Estado da Bahia - PETROTECMANGUE-BASUL), que visa desenvolver unidades de simulação de manguezal a nível de microescala para verificar a formação de Agregados Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA) em zonas de manguezal, realizando simulações de derrames de petróleo com o objetivo de avaliar o potencial da formação do OSA em ambiente de manguezal.

Para todos os testes toxicológicos foram mensurados em cada unidade de diluição percentual os parâmetros físico-químicos (pH, potencial redox, temperatura e oxigênio dissolvido) com o auxílio de sondas portáteis.

3.4.1 Cultivo e aquisição dos organismos:

Os cistos de *Artemia salina* foram adquiridos em uma casa de aquarismo, e mantidos ao abrigo da luz em dessecadores com sílica-gel para garantir a isenção de contaminantes e conservar sua taxa de eclosão.

Posteriormente, foram eclodidos em aquários de vidro com capacidade de 1L com aeração constante seguindo metodologia sugerida por Veiga e Vital (2002), não ultrapassando a concentração de 0,5 g/L de cistos. Em cada aquário foi mantida a salinidade 15 e a temperatura média de 25°C.

Após 48 horas da eclosão dos cistos, os organismos foram coletados com a ajuda de uma pipeta de pasteur de vidro para realização dos testes de referência e ensaios de toxicidade, visto que nessa fase são adequados para teste por já iniciarem atividade de filtração, estando mais sensíveis e diminuindo a variabilidade do teste (SORGELOOS et al., 1978).

3.4.2 Testes com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS)

Foram realizados três testes de referência com a substância Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), para avaliação da faixa de sensibilidade dos organismos utilizados no teste e confecção da carta-controle de toxicidade. Para tanto, as amostras foram diluídas em balões volumétricos nas concentrações de 0, 9, 12, 16, 21, 27 e 35 mg/L.

Cada unidade de diluição foi efetuada em triplicata com frascos-teste de vidro contendo 10 mL da solução e dez organismos. Os recipientes foram dispostos em bandeja e cobertos para minimizar perdas por evaporação.

O Quadro 3.4 ilustra as condições do ensaio que foram mantidas obedecendo o fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro, e a temperatura de 25°C durante 48h. O *endpoint* observado foi CL_{50} de 48h, ou seja, foram contados após dois dias os organismos vivos e mortos e cada teste com o auxílio de uma câmara de contagem.

Quadro 3.4 - Condições para ensaio de toxicidade aguda (mortalidade) com *Artemia salina* para substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1°C
Salinidade	15
Fotoperíodo	Natural (12h claro/ 12h escuro)
Sistema de ensaio	Estático
Duração do ensaio	48h
Volume da solução-teste	10 mL
Réplicas por diluição	3
Organismos por réplica	10
Idade dos organismos	Náuplio II e III
Efeito observado	Letalidade (CL ₅₀)
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de sobrevivência no controle

3.4.3 Testes toxicológicos agudos com fase aquosa da simulação em microescala de formação do OSA

O procedimento para os testes toxicológicos agudos com *Artemia salina* referentes à simulação em microescala de formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA) seguiu roteiro semelhante ao descrito no item 3.3.3. Os erlenmeyers foram preenchidos com 250 mL de água salobra artificial em salinidade 15 e adicionados sedimento a fim de respeitar as concentrações de 0,05, 0,3 e 0,5 g/L. Além dos erlenmeyers contendo diferentes concentrações de sedimento, o mesmo processo foi realizado para um controle positivo (branco) contendo apenas água salobra.

O sedimento foi transferido para os erlenmeyers com a ajuda de um pissete com água salobra artificial, e cada um deles foi tampado com papel alumínio, colocado em mesa agitadora por um minuto e deixado em descanso por uma noite em temperatura de 15°C em ambiente escurecido.

No dia seguinte, cada um dos erlenmeyers passou mais um minuto em mesa agitadora a 2,1 Hz (126 RPM) e posteriormente, adicionados 0,05g (50 mg ou 0,05 cm³) de óleo. Sucedeu-se mais três horas de agitação em mesa agitadora recíproca a 126 RPM e mais um descanso por uma noite.

Para cada concentração de sedimento testada foram avaliadas três réplicas de cada uma das 5 diluições percentuais (100%, 50%, 25%, 12,5%, 1%) e um controle positivo (branco 0%). Nesse ensaio, foram adquiridas amostras de superfície e fundo. As condições para os ensaios de toxicidade aguda para aqueles em microescala seguiram condições semelhantes às descritas no Quadro 4.

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico seguindo as ferramentas do Excel 2010 e do pacote Statistica 8. Esses programas foram utilizados para realizar a estatística descritiva, verificar a normalidade dos dados e confeccionar os gráficos representativos da caracterização físico-química do sedimento de manguezal, dos resultados dos ensaios toxicológicos das unidades experimentais e monitoramento dos parâmetros físico-químicos destas unidades.

Os dados produzidos pelos testes agudos com as simulações em microescala e mesoescala e com substâncias de referência foram expressos como dados de mortalidade e sobrevivência dos indivíduos adultos (CL_{50}) através do uso do método matemático Probit ou Trimmed Spearman-Kärber Method conforme recomendado pela USEPA (2002) associando a intervalos de confiança de 95%. Os testes com sedimento e contaminante produziram respostas relacionadas à mortalidade (ou sobrevivência) e fecundidade (número de náuplios, copepoditos e ovos) que serão dadas para cada ensaio em comparação com o grupo controle.

Os resultados foram analisados em função direta do tipo de teste (agudo) sendo possível estimar concentrações letais a 50% dos organismos. O uso destas análises permite estimar a concentração que causa uma redução de 50% na reprodução dos animais expostos às diferentes concentrações, em relação às produções observadas no grupo controle.

A análise dos dados foi interpretada por meio de variância e comparação dos resultados das diferentes diluições com relação ao grupo controle. Análises de correlação linear de Pearson foram realizadas entre as variáveis toxicológicas e físico-químicas mensuradas durante o experimento. Estas correlações foram realizadas após verificação da normalidade das variáveis e homogeneidade das variâncias. Caso estes pressupostos não estivessem sido satisfeitos, a correlação de Spearman seria realizada. Também foram utilizadas análises de componentes principais para explicar a variância entre os grupos.

Os resultados provenientes desses testes permitiram a classificação das amostras como tóxicas caso a sobrevivência (ou mortalidade) e/ou a fecundidade da amostra seja significativamente diferente do parâmetro obtido com o controle e, necessariamente, se existir uma diferença mínima de 20% entre a média obtida para o controle e a substância testada (de acordo com o princípio da diferença significativa mínima). Se o resultado não atendeu a esses pré-requisitos, a amostra foi considerada como não tóxica (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

4 COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO COPÉPODE *Nitokra* sp. PARA TESTES TOXICOLÓGICOS EM SEDIMENTO ESTUARINO DURANTE A FORMAÇÃO DE AGREGADOS ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO (OSAs) E ELUTRIATO A PARTIR DE SEDIMENTO E ÓLEO CRU HOMOGENEIZADO

Resumo:

Em um derramamento de petróleo em zonas de manguezal existe grande possibilidade da agregação do óleo com o material particulado em suspensão, o que poderá determinar o sedimento de fundo como destino final do OSA (Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão). Essa formação, em muitos casos poderá representar um grande risco aos organismos bentônicos. Testes de ecotoxicidade com esses organismos têm sido amplamente utilizados como uma das formas mais precisas de monitoramento biológico aos impactos antrópicos nesse ecossistema. O presente trabalho avalia a ecotoxicidade durante a formação do OSA em sedimentos de manguezal, coletados ao longo do estuário do rio Pardo, município de Canavieiras, Bahia, por meio de ensaios em escala piloto (microescala). O procedimento foi realizado através dos testes toxicológicos de exposição aguda para determinar a CL₅₀ (concentração letal 50%) utilizando o copépode bentônico *Nitokra* sp. Para efeito de comparação, foram realizados dois cenários, o primeiro considera a fase aquosa do protocolo de simulação de formação do OSA em microescala, e o segundo, o elutriato a partir de sedimento e óleo homogeneizado em diferentes frações. Foi verificado que o cenário onde se verificou a formação do OSA tem potencial muito menos tóxico (CL₅₀ 70,71) em relação ao elutriato formado a partir dos percentuais de sedimento homogeneizado com óleo cru (CL₅₀ 5,59) confirmando seu potencial como efetiva forma de limpeza para tratamento de óleo na água.

4.1 INTRODUÇÃO

Manguezal é um ecossistema de interface característico de zona de estuário em regiões tropicais e subtropicais, sujeito à influência oceanográfica das mudanças de marés (SANTOS et al., 2012; QUEIROZ; CELINO, 2008). Nesses ambientes, a constituição granulométrica do sedimento proporciona retenção de poluentes, sendo sua toxicidade ampliada afetando de forma significativa a integridade do ecossistema. Os hidrocarbonetos de petróleo destacam-se como compostos prejudiciais, capazes de produzir danos imediatos para os organismos e esses danos vão depender tanto das características do óleo (tipo, quantidade, qualidade e estado de intemperismo) quanto das variações sazonais das condições climáticas e de maré dominantes (BRITO et al., 2009).

Considerando a vulnerabilidade do manguezal e diversos outros ecossistemas costeiros, a dispersão natural é altamente desejável para a remoção da mancha de óleo, pois favorece a dissolução dos hidrocarbonetos solúveis ou mais voláteis, que acabam sendo preferencialmente removidos por evaporação, e aumentam a área de interface óleo/água disponível para a atividade biológica podendo ainda aumentar a degradação, tornando-se um processo mais rápido, comparado a alternativas de limpeza de áreas submetidas a derrame de óleo (ITOPF, 2013).

Nesse aspecto, recentemente houve grande destaque para o Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA), um complexo que surge da interação entre partículas minerais e óleo em meio aquoso e destaca-se por ter sido amplamente aceito, uma vez que se configura como efetiva forma de limpeza para tratamento de óleo na água (LEE et al., 2002; KHELIFA et al., 2007; WANG et al., 2013; SUN et al., 2009). As gotas de óleo são facilmente fragmentadas em tamanhos de poucos micrômetros, o que leva à rápida transferência de manchas de óleo a partir da superfície do mar para a coluna de água, aumentando sua superfície de contato (LE FLOCH et al., 2002; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002).

A formação dessas gotículas pode aumentar a concentração de hidrocarbonetos em solução, aumentando também a biodisponibilidade desses produtos, promovendo não só o aumento da degradação natural como também aumento na toxicidade do óleo por conta da exposição de compostos como benzeno, tolueno e xileno. Esses compostos apresentam considerável solubilidade em água comparada a outros, o que torna os organismos marinhos mais vulneráveis uma vez que absorvem esses contaminantes pelos tecidos, brânquias, por ingestão direta da água ou de alimento contaminado (ITOPF, 2013).

O copépodo *Nitokra* sp. embora não normatizado no Brasil para testes de toxicidade, tem sido amplamente empregado em bioensaios toxicológicos realizados em sedimento por apresentar características peculiares que favorecem sua utilização como organismo-teste. Entre essas características destacam-se o enorme potencial para cultivo em condições laboratoriais, o seu caráter generalista quanto à granulometria do sedimento, constância na sua sensibilidade quanto à substância de referência (DSS), íntima associação com o ambiente sedimentar, alta abundância e curto ciclo de vida e importância ecológicas elevada. Além disso, representantes com estágios de vida variados podem ser obtidos de cultivos a qualquer época do ano, são fáceis de cultivar em laboratório e requerem espaço mínimo e poucos equipamentos para realização dos testes (FERRAZ et al., 2010; FURLEY et al., 2010; ZARONI et al., 2010; SOUSA et al., 2012).

Este estudo tem como objetivo avaliar a sensibilidade do copépode *Nitokra* sp. em ensaios toxicológicos agudos com testes estáticos sem renovação onde seja possível determinar possíveis efeitos adversos da exposição à amostras colhidas em ensaios onde foi simulado a formação do OSA em protocolo experimental em microescala bem como ao elutriato formado a partir da homogeneização de frações percentuais de óleo cru e sedimento.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foram realizados testes toxicológicos agudos em experimentos de simulação, com sedimento e sua fase aquosa considerando dois principais cenários, sem formação de Agregados Óleo – Material Particulado em Suspensão e com a formação de Agregados Óleo – Material Particulado em Suspensão. Os testes agudos foram realizados em dois principais cenários: o elutriato (oriundo do sedimento misturado ao óleo) e a fase aquosa (oriunda do experimento de simulação de formação do OSA).

Em paralelo a cada ensaio, foi realizado testes com substância de referência (Dodecil Sulfato de Sódio - DSS) para elaboração da carta-controle com o objetivo de ilustrar a regularização da sensibilidade do cultivo de organismos utilizados para os testes. Cada ensaio foi acompanhado de análises dos parâmetros físico-químicos associados (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade) no período inicial e final dos testes para controlar as condições básicas de exposição e subsidiar a interpretação dos resultados (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

Os dados produzidos pelos testes agudos com as simulações em microescala e mesoescala e com substâncias de referência foram expressos como dados de mortalidade e sobrevivência dos indivíduos adultos (CL_{50}) através do uso do método matemático Probit ou Trimmed Spearman-Kärber Method, conforme recomendado pela USEPA (2002), associando a intervalos de confiança de 95%. Os testes com sedimento e contaminante produziram respostas relacionadas à mortalidade (ou sobrevivência) que serão dadas para cada ensaio em comparação com o grupo controle.

4.2.1 Coleta e armazenamento do sedimento

Foram amostrados sedimentos em seis pontos durante a baixa-mar ao longo do Rio Pardo, nas proximidades do município de Canavieiras (Litoral Sul do Estado da Bahia - Brasil), tomando-se o cuidado de coletar os sedimentos nos primeiros cinco centímetros com

uma espátula de aço inoxidável previamente descontaminada e ambientada com água local. A coleta dos sedimentos respeitou os limites de um transecto com aproximadamente quatro metros de comprimento onde foram aleatoriamente coletadas 20 porções do substrato de manguezal. Esse material foi homogeneizado em bandeja de vidro e devidamente acondicionado conservando-se a temperatura de até 4 °C. Os parâmetros físico-químicos do sedimento (pH, potencial redox, temperatura, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, sólidos totais e turbidez) foram medidos *in situ* utilizando uma sonda multiparâmetro.

Para a realização das simulações em microescala de formação de OSA, cada amostra de sedimento foi calcinada em mufla a 450 °C, por 6 horas, homogeneizada, peneirada com uma malha de 100 µm, mantido em geladeira a 4 °C em recipientes de vidro por um período de 24 horas, até a distribuição do sedimento nos recipientes-testes para o início dos bioensaios.

4.2.2 Caracterização do óleo e do sedimento

A caracterização das matrizes óleo e sedimento foram realizadas no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO/IGEO/UFBA), e compreenderam às análises de granulometria em sedimento, grau API (densidade) e viscosidade/fluidez, HTP e HPA no óleo. As análises de sedimento foram realizadas em um período que não excedeu o prazo de 48 horas após as coletas.

Em laboratório, após liofilização, peneiramento (2 mm) e homogeneização das amostras, foram realizadas as análises de granulometria, por intermédio de um analisador de partículas com difração a Laser Modelo Cilas 1064 com pré-tratamento da amostra segundo Embrapa (2009).

Para as simulações foi utilizado óleo cru da bacia de Campos, cuja densidade foi mensurada seis vezes com densitômetro (DMA 5000 Density Meter) a 15°C. Sua viscosidade também foi determinada três vezes nas mesmas condições de temperatura, através da utilização do viscosímetro rotacional (Haake Viscotester VT500).

A distribuição de hidrocarbonetos também foi utilizada para caracterizar o óleo por Cromatografia Gasosa acoplada a um detector por ionização de chama (GC-FID) modelo Varian CP 3800, equipado com coluna capilar modelo DB5 de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, fase estacionária de 0,25 µm de espessura e fluxo de gás de arraste (hélio).

4.2.3 Cultivo e aquisição dos organismos

O cultivo do copépode *Nitokra* sp. foi realizado em erlenmeyers com capacidade para 1L, contendo cerca de 750 mL de água do mar artificial nas salinidades 15. Os erlenmeyers foram tampados com algodão e gaze para não interferir nas trocas gasosas e evitar a evaporação da água e mantidos em sala climatizada na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa com fotoperíodo de 12h claro/escuro e sem aeração (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

Para que estes organismos pudessem ser utilizados nos ensaios, foi necessário selecioná-los a partir de uma pequena porção do cultivo que foi peneirada em malha de 125 μm , para que fossem utilizados apenas os indivíduos adultos que foram posteriormente contados e separados em estereomicroscópio óptico.

4.2.4 Testes com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS)

A solução estoque foi preparada em balões de 100 mL onde foram adicionados 10 mg de Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) para cada 100 mL de água salgada em salinidade 15, que é obtida através da diluição de 30g de sal marinho artificial em 500 mL de água, avolumado para um litro.

Cinco concentrações foram testadas, com três réplicas por concentração, com as seguintes concentrações: 0 (controle), 4, 6, 8, 10 e 12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Dez machos adultos ou fêmeas não ovados foram expostos em cada recipiente contendo 20 mL da solução de diluição.

As condições para o ensaio foram mantidas respeitando o fotoperíodo de 16h de claro e 8h de escuro, temperatura de 25°C durante 96h. O *endpoint* observado é CL_{50} de 96h. Ou seja, após uma exposição de quatro dias, são contados os organismos vivos e mortos e cada teste com o auxílio de um microscópio ou lupa. Foi também realizado um teste agudo com a água do cultivo para manter a certificação da qualidade das culturas (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

4.2.5 Simulação em microescala para formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA)

Noventa erlenmeyers foram preenchidos com 250 mL de água salobra artificial em salinidade 15 e pesados 0,175g de sedimento para cada um, a fim de respeitar o valor de 0,7

g/L de concentração de sedimento, uma vez que segundo Sun & Zeng (2009) é a concentração máxima para formação de OSA em partículas de até 16 μm .

O sedimento foi transferido para os erlenmeyers com a ajuda de um pissete com água salobra artificial. Cada um deles foi tampado com papel alumínio, colocado por um minuto em mesa agitadora e deixado em descanso por uma noite em temperatura de 15°C em ambiente escurecido. No dia seguinte, cada um dos erlenmeyers passou mais um minuto em mesa agitadora a 2,1 Hz (126 RPM) e posteriormente foram adicionados 0,05g (50 mg ou 0,05 cm^3) de óleo, considerando o valor esperado de 50 mg. Sucedeu-se mais três horas de agitação em mesa agitadora recíproca a 126 RPM e mais um descanso por uma noite (MOREIRA, 2014).

As amostras foram filtradas a vácuo para captação dos agregados formados em filtro de acetato de celulose como descrito por Khelifa et al. (2007) e transferidos dos filtros para frascos de vidro escurecidos com a ajuda de um pissete de ponta fina contendo água salobra em salinidade 15.

Foram necessários seis dias de preparo para aquisição da massa mínima total de sedimento contaminado (12g) requerido para os ensaios de toxicidade, onde foram avaliadas três réplicas de cada uma das seis diluições percentuais (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 1%) e um controle positivo (branco 0%).

4.2.6 Preparo do elutriato

O método para preparação do elutriato seguiu as normas da USEPA (United States Environmental Protection Agency) descritas no Technical Manual (USEPA, 2001) combinado uma parte de sedimento em quatro partes de água salobra em salinidade 15. A mistura foi vigorosamente agitada por uma hora em mesa agitadora. O composto foi centrifugado por 10 minutos a 4.000 RPM com o objetivo de isolar o sedimento da fase aquosa e então foi utilizado imediatamente após o preparo. O preparo do sedimento para realização dos testes e para o elutriato seguiu as quantidades dispostas na Tabela 4.1 a seguir onde são apresentadas as proporções ideais e obtidas para realização dos ensaios de toxicidade.

Tabela 4.1 - Proporções de sedimento e óleo utilizadas para a preparação do elutriato para os testes toxicológicos agudos (ideal x real) utilizando o copépode *Nitokra* sp.

Diluições Percentuais	Sedimento Limpo (g)		Sedimento + Óleo (g)		Óleo(g)
	Ideal	Real	Ideal	Real	
100%	20	20	-	-	20
50%	20	20	20	19,998	-
25%	30	29,720	10	9,938	-
12,5%	35	35,023	5	4,839	-
6,25%	37,5	37,507	2,5	2,730	-
1%	39,6	39,499	0,4	0,573	-

4.2.7 Testes toxicológicos agudos:

Foram realizados testes toxicológicos agudos em amostras da fase aquosa dos experimentos de simulação de formação do OSA em ambiente de manguezal a nível de microescala, utilizando água salobra artificial em salinidade 15 e a parcela aquosa adicionada durante o experimento de simulação em microescala de formação do OSA, adicionando frações coletadas de superfície com pipeta automática nas seguintes proporções (Tabelas 4.2 e 4.3).

Para cada ensaio foi utilizada a concentração de OSA de 700 mg/L de sedimento para aproximadamente 0,05g de óleo, em sete diluições, com três réplicas para cada diluição, com as seguintes proporções percentuais: 0% (controle); 1%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; e 100%. Para o elutriato, oito diluições percentuais foram testadas, com três réplicas por concentração, nas seguintes proporções: 0% (controle); 0,5%; 1%; 6,25%; 12,5%; 25%, 50%, 100%. Dez machos adultos ou fêmeas não ovados foram adicionados em cada recipiente contendo 15 mL da solução de diluição efetuada a partir do elutriato.

A salinidade da água foi monitorada utilizando-se um refratômetro portátil e os parâmetros físico-químicos de todos os testes foram mensurados utilizando um medidor portátil de pH com precisão de ± 0.01 unidades de pH; O.D. com um medidor micro processado portátil digital com precisão de $\pm 0,05\%$; Temperatura com termômetro acoplado ao oxímetro com precisão de $\pm 0,05$ °C e condutividade com condutivímetro, portátil digital com precisão de $\pm 0,05\%$. As condições para o ensaio de toxicidade aguda estão descritas no Quadro 4.1.

Tabela 4.2 - Valores utilizados de fase aquosa do ensaio de simulação de formação do OSA e água salobra artificial para testes de toxicidade aguda utilizando o copépode *Nitokra* sp.

Diluições Percentuais	Fase Aquosa (mL)	Água Salobra Artificial (mL)
100%	15	-
50%	7,5	7,5
25%	3,75	11,25
12,5%	1,87	13,13
6,25%	0,94	14,6
1%	0,15	14,85

Tabela 4.3 - Valores utilizados de elutriato e água salobra artificial para testes de toxicidade aguda utilizando o copépode *Nitokra* sp.

Diluições Percentuais	Elutriato (mL)	Água Salobra Artificial (mL)
100%	15	-
50%	7,5	7,5
25%	3,75	11,25
12,5%	1,87	13,13
6,25%	0,94	14,6
1%	0,15	14,85
0,5%	0,075	14,925

Quadro 4.1 - Condições para ensaio de toxicidade aguda (mortalidade) com *Nitokra* sp. para a amostras da fase aquosa dos experimentos de simulação de formação do OSA

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1°C
Salinidade	15
Fotoperíodo	Natural (16h claro/8h escuro)
Sistema de ensaio	Estático
Duração do ensaio	96h
Volume da solução-teste	15 mL
Réplicas por diluição	3
Organismos por réplica	10
Idade dos organismos	Adultos
Efeito observado	Letalidade (CL50)
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de sobrevivência no controle

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Caracterização do óleo e do sedimento

Serão aqui descritos os resultados referentes à caracterização do sedimento e do óleo utilizado no presente estudo, considerando-se a etapa de campo e coleta de sedimento, que inclui medição de parâmetros físico-químicos, bem como as análises laboratoriais realizadas. Estes resultados compõem a necessidade de caracterizar o sedimento utilizado nos ensaios para controle das condições experimentais avaliadas. Na tabela 4.4 são apresentados os dados de coordenadas geográficas e os parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta no substrato de manguezal da região de estudo.

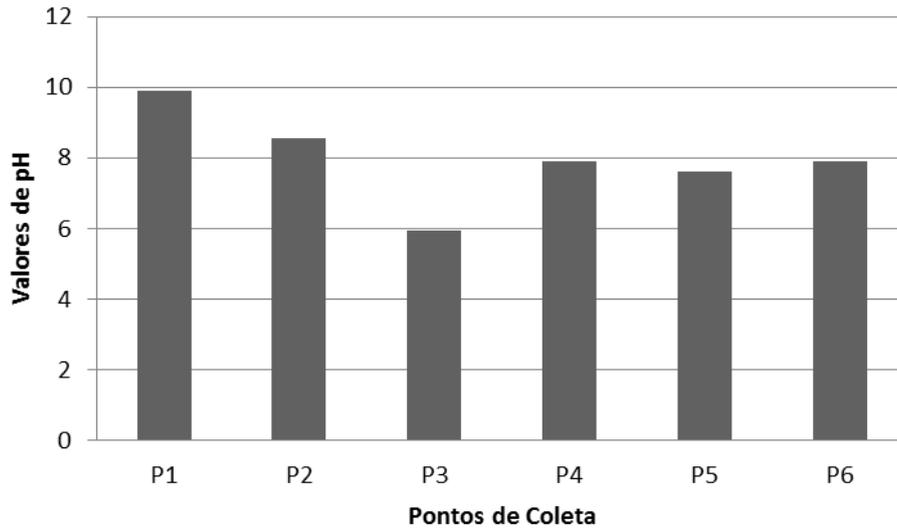
As coordenadas estão diretamente relacionadas aos pontos amostrais, como pode ser visto na Tabela 4.4, associadas aos horários de coleta nela descritos, os quais obedeceram à restrição de coleta em maré baixa (em torno de 0,3m). Os valores de pH, Eh, temperatura, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, sólidos totais e turbidez são representados graficamente abaixo.

Tabela 4.4 - Coordenadas geográficas e parâmetros físico-químicos descritivos nos pontos de coleta às margens do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia

Pontos	Coordenadas	Hora	Parâmetros físico-químicos (<i>in situ</i>)							
			pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Sal.	Condt. (S/m)	O.D. (mL/L)	S.T.D. (mg/L)	Turbidez (NTU)
P1	S 15° 41' 58" W 38° 55' 54"	07:35	9,91	45	26,56	30	30,8	15,2	17,4	121,0
P2	S 15° 41' 36" W 38° 56' 21"	08:57	8,55	163	29,62	20	35,7	18,3	21,8	26,6
P3	S 15° 40' 52" W 38° 56' 24"	09:22	5,93	325	30,02	12	23,4	17,66	14,5	30,6
P4	S 15° 41' 26" W 38° 57' 05"	10:03	7,89	245	30,82	6	15,5	21,04	9,61	49,1
P5	S 15° 41' 25" W 38° 57' 35"	10:56	7,61	240	30,37	6	14,8	19,63	9,16	99,2
P6	S 15° 40' 58" W 38° 58' 25"	11:47	7,91	222	30,08	5	12,3	18,95	7,62	179

Legenda: pH = Potencial Hidrogeniônico; Eh = Potencial de Redução; Temp.= Temperatura; Sal. = Salinidade; Condt. = Condutividade; O.D. = Oxigênio Dissolvido; S.T.D. = Sólidos Totais Dissolvidos; NTU = Unidades Nefelométricas de Turbidez

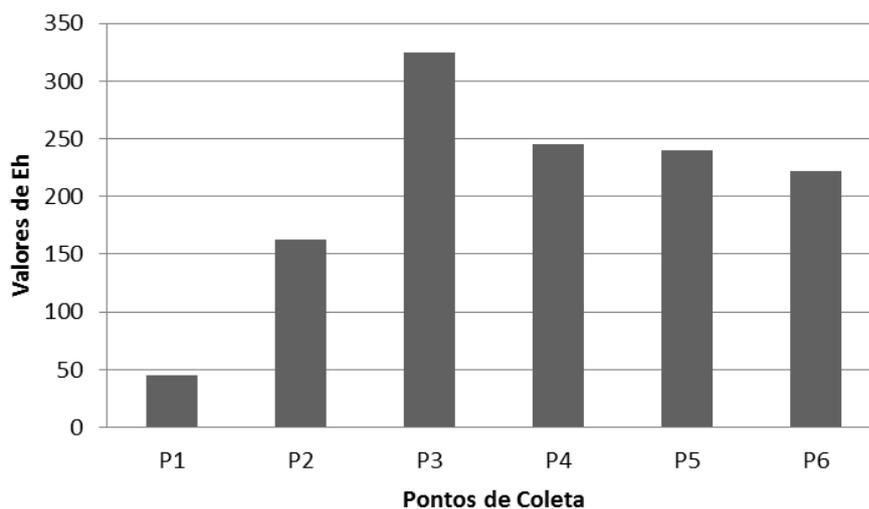
Figura 4.1 - Representação gráfica dos valores de pH ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia nos diferentes pontos amostrais



Os valores de pH apresentaram um caráter neutro a levemente básico (com exceção do ponto 3 que apresentou relativa acidez), com pequena variação entre os seis pontos amostrais, tendo seu máximo registrado no P1 (9,91) e mínimo registrado no P3 (5,93), que pode ser indicio de uniformidade de características entre esses locais, consequência de contribuições semelhantes das águas marinhas e doce nos pontos amostrais (Figura 4.1).

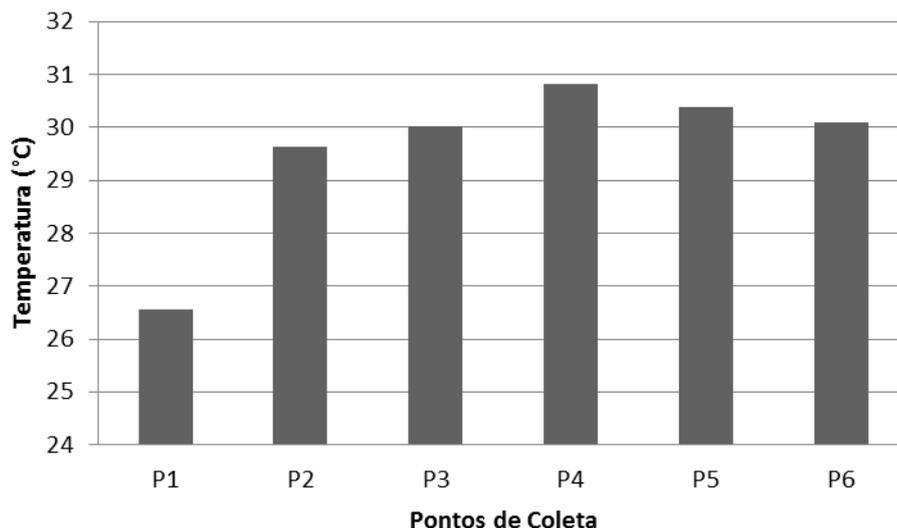
Com relação aos valores de Eh, foi registrada ampla variação entre os máximos e mínimos observados nos pontos 3 e 1 (325,0 mV) e 5 (45,0 mV), respectivamente, sendo que todos demonstram significativa característica oxidante, que representa a instabilidade deste ambiente durante a medição deste parâmetro (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Representação gráfica dos valores de Eh (em mV) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia nos diferentes pontos amostrais



A variação de temperatura não excedeu a diferença de 4,2 °C entre os pontos, sendo o valor máximo registrado no P4 (30,8 °C) e o valor mínimo visto no P1 (26,5 °C) esta variação da temperatura pode estar relacionada à influência das condições climáticas em função dos horários e locais de coleta, integradas às características intrínsecas dos pontos amostrados (Figura 4.3).

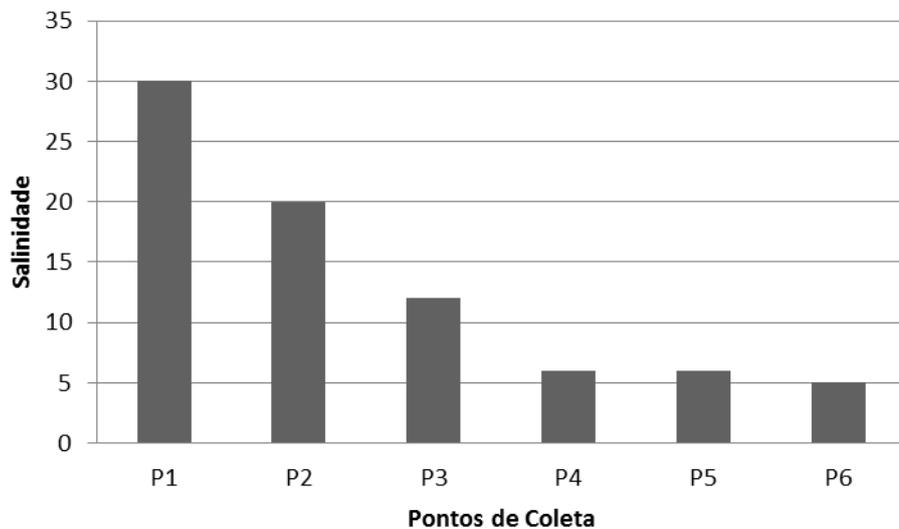
Figura 4.3 - Representação gráfica dos valores de temperatura (em °C) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Com relação ao comportamento da salinidade, conforme esperado para um ambiente de estuário, se manteve relativamente alta nos três primeiros pontos (30, 20, 12) e reduziu significativamente nos três últimos (6, 6 e 5, respectivamente). Neste caso, é relevante observar que há uma redução gradual nos valores, onde os maiores índices foram encontrados em pontos amostrais que sofrem influência da salinidade à jusante e os menores à montante do rio (Figura 4.4). Esse comportamento pode ser explicado com base na penetração da maré, que faz com que as amostras coletadas em manguezais que apresentam proximidade maior à foz do estuário tenham salinidades mais elevadas.

Os parâmetros pH, Eh, e salinidade são dependentes da temperatura, aumentando e diminuindo de acordo com a variação desta, de forma não linear. Todos esses fatores, juntos ou isoladamente contribuem para que os cátions que se encontram sorvidos às partículas que constituem os substratos dos manguezais possam tornar-se biodisponíveis (QUEIROZ; CELINO, 2008), portanto, os resultados dos parâmetros físico-químicos nas diferentes estações amostrais são determinantes para que se possa correlacionar seus possíveis efeitos como influentes para a relação de toxicidade encontrada nos sedimentos.

Figura 4.4 - Representação gráfica dos valores de salinidade no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Os valores de oxigênio dissolvido variaram entre o máximo de 21,04 mL/L e o mínimo de 15,20 mL/L (Figura 4.5). Essa variável sofre influência da composição dos sedimentos, da temperatura, da salinidade da água e de fatores hidrodinâmicos e oferece indicativos acerca das condições naturais do ambiente e possibilita detectar possíveis impactos ambientais como a eutrofização e a poluição orgânica. Gás carbônico, oxigênio molecular, íons de nitrito e nitrato e a própria água são as principais fontes para o oxigênio dissolvido (BAUMGARTEN et.al., 1996).

É possível observar que o oxigênio dissolvido teve um padrão comportamental de valores muito semelhante à temperatura. Os valores de temperatura nos diferentes pontos podem ser considerados um fator determinante para a distribuição dos valores de oxigênio dissolvido, visto que a temperatura determina a solubilidade dos gases (FIORUCCI, 2005).

Com relação aos valores encontrados para a condutividade (Figura 4.6), foi observada ampla variação com destaque para o valor máximo apresentado no P2 (35,7 mS). É possível observar uma relação inversa entre o comportamento do Eh comparado à condutividade, que pode ser interpretado pela ótica do mesmo critério visto que a presença de íons dissolvidos pode exercer enorme influência nos valores de condutividade elétrica registrados (QUEIROZ; CELINO, 2008).

Figura 4.5 - Representação gráfica dos valores de oxigênio dissolvido (em mL/L) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais

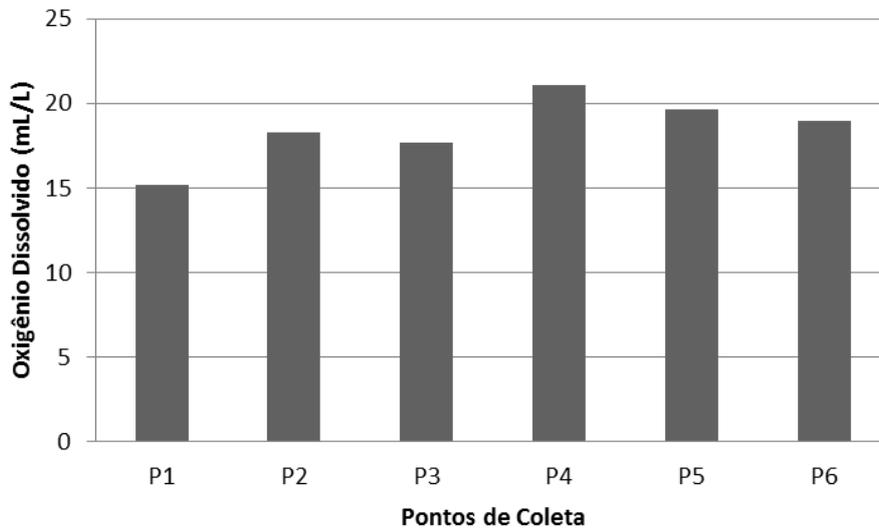
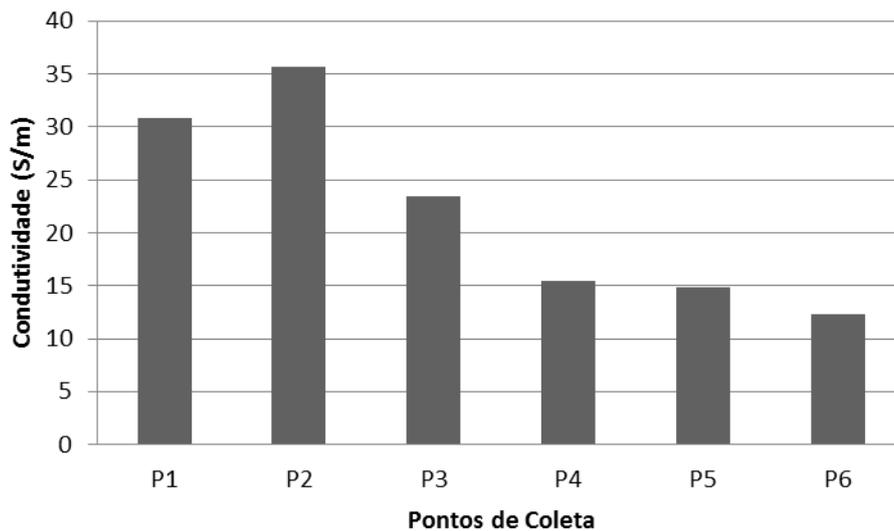
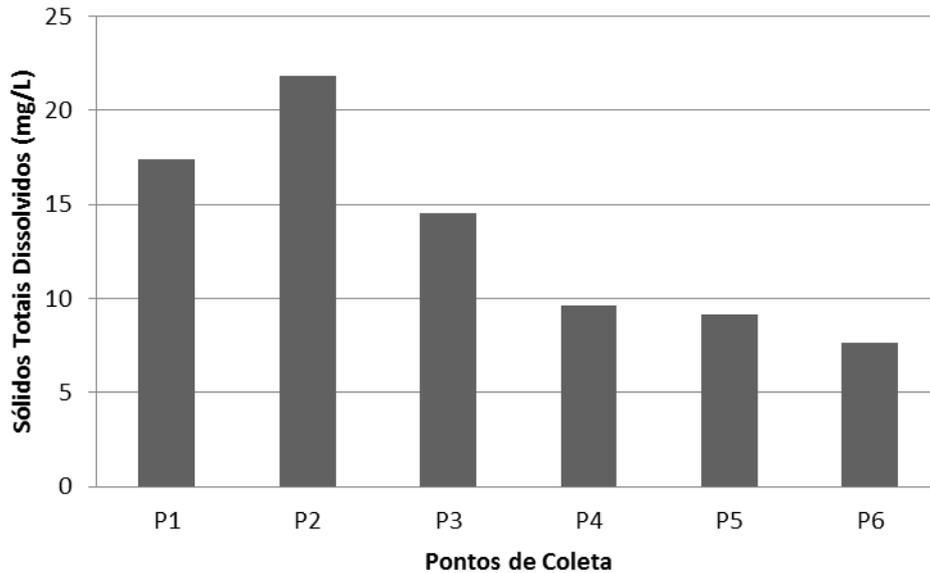


Figura 4.6 - Representação gráfica dos valores de condutividade (em S/m) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



O maior valor encontrado em sólidos totais dissolvidos foi visto no P2 (21,8 mg/L) e o menor valor no P6 (7,6 mg/L) (Figura 4.7), assim sendo, os valores de sólidos totais foram diretamente proporcionais aos encontrados para a condutividade. Sampaio e colaboradores (2007) já haviam desenvolvido estudos que demonstravam que existe uma forte correlação linear entre esses dois parâmetros, que pode ser explicada pela razão destes estarem em solução e em estado coloidal (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

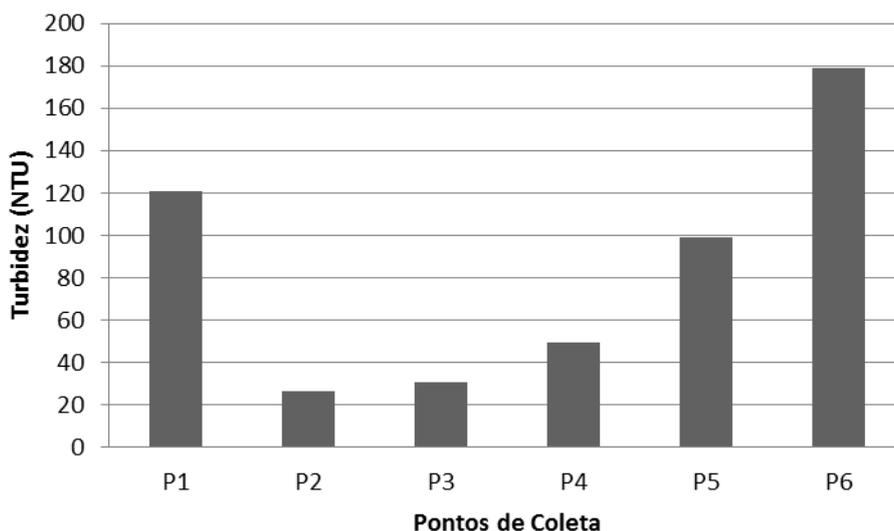
Figura 4.7 - Representação gráfica dos valores de sólidos totais dissolvidos (em mg/L) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Para a turbidez, o maior valor foi encontrado no P6 (179,0 NTU) seguido do P1 (121,0 NTU) e o menor valor foi registrado no P2 (20,6 NTU) (Figura 4.8). Segundo Pina e colaboradores (2003) a elevada turbidez do estuário é consequência do elevado escoamento de maré, da carga fluvial, da grande extensão de áreas intertidais e ainda da grande susceptibilidade para a geração de ondas que intensificam a ressuspensão.

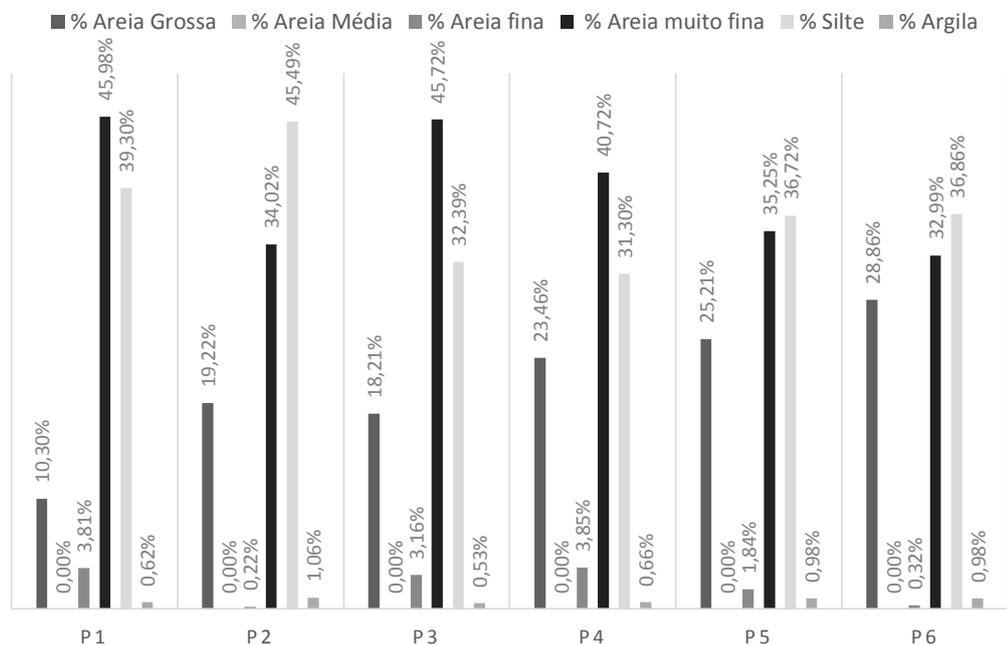
Cada um destes valores, evidenciam um conjunto de condições ambientais da área de estudo que possibilitaria e por vezes atenuaria a formação do OSA nestes locais, considerando os fatores que influenciam na formação destes agregados em ambiente natural.

Figura 4.8 - Representação gráfica dos valores de turbidez (em NTU) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Com relação ao perfil granulométrico dos pontos de coleta, as médias para os valores encontrados nas análises mostram uma predominância das frações consideradas como areia muito fina (62,5 – 125 μm) e silte (3,9 – 62,5 μm) (Figura 4.9) segundo a classificação granulométrica proposta pela escala de Krumbein (1951). Considerando que, de acordo com Sun & Zeng (2009), a granulometria é um fator determinante para formação e destino dos OSAs formados e que a formação do OSA é atenuada em sedimento com granulometria de tamanho inferior a 5 μm em função de sua maior área de superfície de contato, a predominância da fração silte no sedimento amostrado confirma a alta viabilidade para formação de OSA na área de estudo considerada.

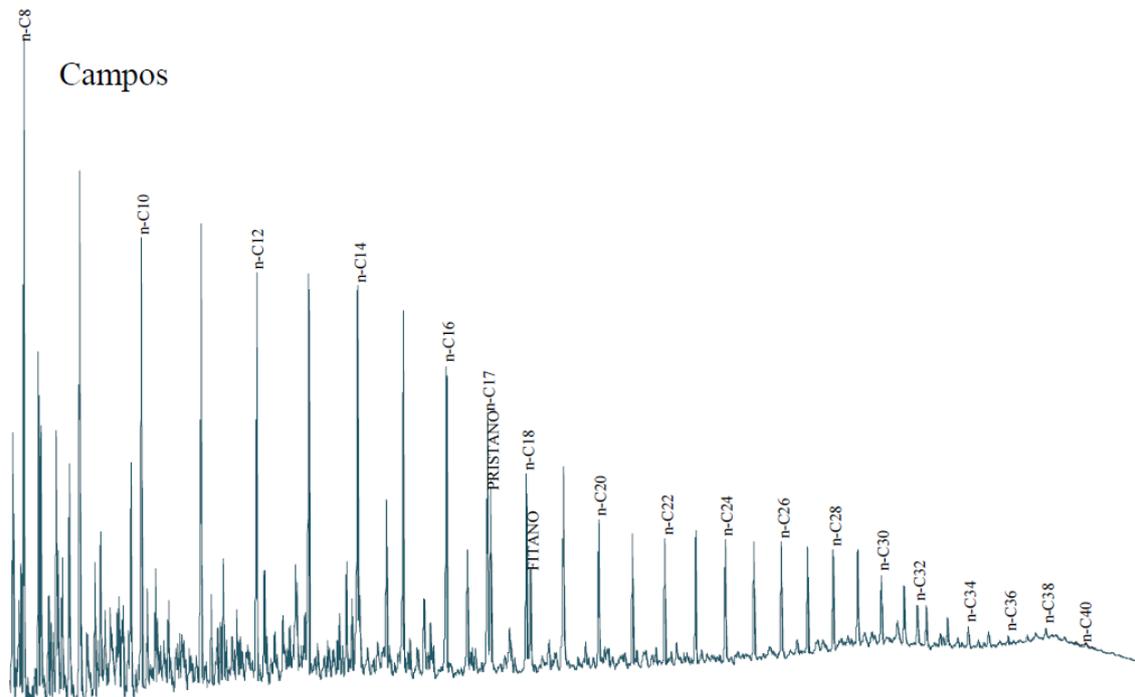
Figura 4.9 - Representação gráfica dos valores percentuais das frações granulométricas de sedimento ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



O óleo cru da bacia de Campos utilizado para a realização dos testes apresentou densidade de 0,8823 g/mL, a média da viscosidade apresentada foi de 33,44 mPa.s. Com relação a distribuição de hidrocarbonetos, o cromatograma do óleo da bacia de Campos apresenta uma maior composição de n-alcenos de baixo peso molecular (nC10-nC17), sugerindo óleos tipicamente marinhos (Figura 4.10). O valor da relação Pristano/Fitano (Pr/Ph) >1 é indicador de um ambiente de deposição com condições oxidantes (óxicas). A relação nC17/nC29 >1 (nC29 é um indicador terrestre e n-C17 é um indicador de material

marinho de algas), indica origem predominantemente de aporte de material marinho. As relações Pr/nC17 e Ph/nC18 menores que 1, e o valor de IPC=1,07, são indicativos de maturidade para esse óleo (BARRAGAN, 2012). Não foram observadas para o óleo caracterizado evidências de biodegradação justificando seu uso para os testes realizados.

Figura 4.10 - Cromatograma do óleo total para amostra da bacia sedimentar de Campos



Fonte: BARRAGAN, 2012

4.3.2 Testes com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS)

Os testes de toxicidade aguda com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) realizados simultaneamente com os testes de sensibilidade do presente estudo apresentaram resultados dentro dos limites de aceitabilidade descritos ($< 9,25 \text{ mg/L}$) (CARIELLO, 2012). Os valores de $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ foram de 4,66; 5,73 e 4,38 mg/L , estando, portanto, dentro da faixa de sensibilidade estabelecida.

A Tabela 4.5 especifica os valores de CL_{50} encontrados para cada teste, bem como os intervalos de confiança (95%), e os parâmetros físico-químicos mensurados.

Tabela 4.5 - Valores de CL₅₀ com os limites de confiança (95%) e parâmetros físico-químicos representativos dos testes de referência com DSS seguidos da Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variância

Teste de referência (DSS)	CL ₅₀ (mg/L)	Limite de Confiança	pH	O.D. (mg/L)	Temperatura (°C)
TR1	4,66	3,83 – 5,67	7,05	6,79	24,1
TR2	5,73	4,69 – 6,98	7,03	6,85	25,2
TR3	4,38	3,51 – 5,46	7,66	6,53	25,8
Média	4,92	**	7,25	6,72	25,03
Desvio padrão	0,71	**	0,36	0,17	0,86
Coef. Vari.	0,14	**	0,05	0,03	0,03

Legenda: TR = Teste de Referência; ** = Não se aplica

4.3.3 Testes toxicológicos agudos

O teste de toxicidade com a fase aquosa de formação do OSA foi realizado entre os dias 16 e 20 de outubro (96h), e os resultados das análises realizadas e seus ajustes realizados através do uso dos métodos estatísticos Probit e Trimmed Spearman-Kärber estão dispostos na Tabela 4.6 e posteriormente, na Tabela 4.7, os relativos parâmetros físico-químicos registrados no início e ao final das análises.

Tabela 4.6 - Dados percentuais de mortalidade e sobrevivência dos testes de toxicidade agudos a partir da fase aquosa de simulação da formação do OSA utilizados para determinar a CL₅₀ incluindo proporções ajustadas para cálculo e limite de confiança (95%)

Concentração	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas
0% (controle)	0,33	9,67	0,0300
1%	2,00	8,00	0,1658
6,25%	2,33	7,67	0,2002
12,5%	2,33	7,67	0,2002
25%	2,67	7,33	0,2357
50%	4,33	5,67	0,4330
100%	6,00	4,00	0,6000
CL₅₀ (%)		70,71	
Intervalo de Confiança		33,9 – 151,9	

O teste de toxicidade com o elutriado produzido a partir da matriz de sedimento e óleo homogeneizado foi realizado entre os dias 29 de outubro e 2 de novembro (96h), e os resultados das análises realizadas e suas correções estão dispostas na Tabela 4.8 e na Tabela 4.9, os parâmetros físico-químicos registrados no início e ao final das análises.

Tabela 4.7 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais representativos do teste de toxicidade aguda com o copépode *Nitokra* sp. a partir da fase aquosa de simulação da formação do OSA, seguidos da Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variância

Conc. (%)	pH		O.D. (mg/L)		Temperatura (°C)		Condutividade (µS)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
0%	7,15	6,85	6,74	5,5	23,5	23,8	23,8	21,85
1%	7,10	7,05	6,6	5,78	23,8	24	20,49	21,97
6,25%	7,15	7,1	6,48	5,99	24	24,2	21,32	20,76
12,50%	7,15	7,2	6,37	5,57	24	23,6	20,95	23,21
25%	7,12	7,05	6,03	5,37	24,5	23,3	22,05	22,63
50%	7,15	6,75	5,54	5,68	24,6	23,3	20,15	22,49
100%	7,1	7,45	5,32	5,72	25,5	23	22,49	21,49
MÉD	7,13	7,11	5,815	5,585	24,65	23,3	21,41	22,455
DP	0,0244	0,2926	0,4743	0,1567	0,6245	0,2449	1,0606	0,7148
CV	0,003	0,0411	0,0815	0,0280	0,0253	0,0105	0,0495	0,0318

Legenda: Conc. = Concentração; O.D. = Oxigênio Dissolvido.

É importante destacar que, por questões de resposta dos organismos verificados no teste piloto, foi adicionada a concentração percentual de 0,5%, que compreende o valor intermediário de mortalidade entre a primeira concentração percentual testada e o controle, auxiliando a fidelidade estatística da análise.

Tabela 4.8 - Dados percentuais de mortalidade e sobrevivência dos testes de toxicidade agudos a partir do elutriato, utilizados para determinar a CL_{50} incluindo proporções ajustadas para cálculo e limite de confiança (95%)

Concentração	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas
0% (controle)	1,67	8,33	0,000
0,5%	2,67	7,33	0,0641
1%	2,67	7,33	0,0641
6,25%	5,33	4,67	0,4037
12,5%	5,67	4,33	0,4471
25%	7,00	3,00	0,6170
50%	10,00	0,00	1,0000
100%	10,00	0,00	1,0000
CL_{50} (%)		5,59	
Intervalo de Confiança		5,59 – 2,87	

Pode-se afirmar de acordo com os dados observados, que a Concentração Letal (CL) que afeta 50% dos organismos da espécie *Nitokra* sp. para exposição no elutriato é de 5,59%, demonstrando alta toxicidade para o organismo em questão.

Verificou-se a intensidade das associações lineares do resultado dos testes com os parâmetros físico-químicos através do Coeficiente de Correlação linear de Pearson. O coeficiente da correlação mostra-se positivo se as variáveis são diretamente relacionadas e negativas se forem inversamente relacionadas, sendo seu valor máximo modular igual a 1.

Para a análise toxicológica em questão, os valores marcados em vermelho mostraram significância para correlação considerando $p > .05$. Esta análise foi utilizada para verificação dos parâmetros que mais contribuem para toxicidade, sendo encontradas fortes correlações positivas entre a diluição percentual e a mortalidade, e inversa para o oxigênio dissolvido (Tabela 4.10). A correlação negativa para o oxigênio dissolvido pode ser explicada pela menor contribuição desse fator para aumento da toxicidade, visto que a aeração não é uma exigência no cultivo destes organismos e que, por conta destes fazerem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, pode causar uma redução da sua concentração no meio e a depender da magnitude, o conseqüente aumento da toxicidade (METCALF; EDDY, 2003).

Tabela 4.9 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais representativos do teste de toxicidade aguda com o copépode *Nitokra* sp. a partir do elutriato, seguidos da Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variância

Conc. (%)	pH		O.D. (mg/L)		Temperatura (°C)		Condutividade (µS)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
0%	5,95	6,15	4,9	4,53	25,1	23,9	32,66	23,95
0,5%	5,95	5,65	5,25	5,88	24,3	22,2	29,82	29,26
1%	6,05	6,05	5,65	4,77	24,7	24,5	27,24	29,76
6,25%	6,05	5,9	4,72	4,53	24,5	24,1	24,98	23,18
12,50%	5,85	5,55	4,31	4,65	25,7	24,5	23,8	24,28
25%	5,95	5,45	4,8	4,19	25,4	25,5	23,4	21,22
50%	7,15	6,75	5,54	5,68	24,6	23,3	20,15	22,49
100%	7,1	7,45	5,32	5,72	25,5	23	22,49	21,49
MÉD	6,5125	6,3	4,9925	5,06	25,3	24,075	22,46	22,37
DP	0,7087	0,9678	0,5507	0,7627	0,4830	1,1500	1,6346	1,3856
CV	0,1088	0,1536	0,1103	0,1507	0,0191	0,0478	0,0728	0,0619

Legenda: Conc. = Concentração; O.D. = Oxigênio Dissolvido.

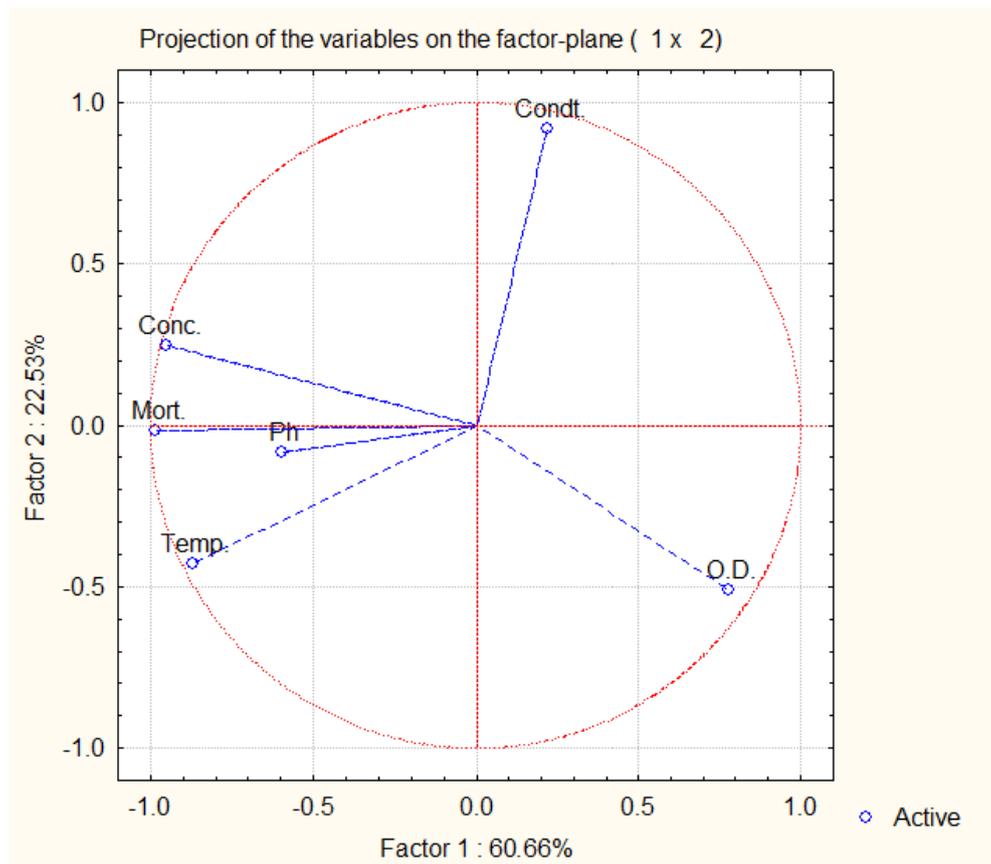
Tabela 4.10 - Matriz de correlação de Pearson para parâmetros físico-químicos e ensaios de toxicidade com o copépode *Nitokra* sp.

	Conc.	Mort.	pH	O.D.	Temp.	Condt.
D.P.	1,00					
Mort.	0,94	1,00				
pH	0,47	0,47	1,00			
O.D.	-0,87	-0,81	-0,19	1,00		
Temp.	0,72	0,82	0,61	-0,42	1,00	
Cdtv.	0,00	-0,29	0,03	-0,19	-0,52	1,00

Legenda: Conc. = Concentração; Mort. = Mortalidade; O.D. = Oxigênio Dissolvido; Temp. = Temperatura; Condt. = Condutividade.

Foi utilizada a Análise de Componentes Principais (ACP) para realizar a estimativa da similaridade dos dados, representando-os em duas dimensões ortogonais. Os dois fatores representados na Figura 4.11 explicam a maior proporção da variância total entre todas as combinações lineares dos dados originais, tendo a segunda menor proporção de variância total que a primeira e assim sucessivamente.

Figura 4.11 - Representação gráfica dos eixos principais (1 e 2) da análise de componentes principais da matriz de correlação (diluições percentuais, mortalidade e parâmetros físico-químicos)



A análise de componentes principais permitiu a representação dos dados em uma área bivariada (Figura 4.11). Os dois eixos principais – Fator 1 e 2, explicam 83,19% da variância total (22,53% e 60,66%).

Nessa representação gráfica é possível corroborar a relação negativa entre o oxigênio dissolvido e os outros parâmetros estudados, verificada através da correlação de Pearson, e a forte correlação positiva entre os fatores de toxicidade (concentração e mortalidade) sendo o pH o menos influente entre os parâmetros físico-químicos monitorados.

Com relação aos fatores de explicabilidade do teste, os autovalores (*eigenvalues*) representam a razão da variação entre os grupos pela variação dentro dos mesmos, considerando que quanto mais distante de 1, maior será a variação entre os grupos explicada pela função discriminante.

Tabela 4.11 - Autovalores (*eigenvalues*), percentual total de variância e acumulados referentes aos fatores de explicabilidade encontrados para a matriz de correlação

	Autovalores	% total da variância	Autovalor acumulado	% acumulada
Componente 1	3,639330	60,65551	3,639330	60,6555
Componente 2	1,351569	22,52615	4,990899	83,1817
Componente 3	0,863636	14,39394	5,854536	97,5756
Componente 4	0,098554	1,64257	5,953090	99,2182
Componente 5	0,046837	0,78061	5,999927	99,9988
Componente 6	0,000073	0,00122	6,000000	100,0000

Através da análise da Tabela 4.11, é possível discriminar os seis principais fatores que contribuem para o total da variância entre os parâmetros, sendo a primeira componente a que tem efetivamente o maior poder de separação intergrupar.

A destacada correlação negativa entre o O.D. e os fatores de toxicidade (concentração e mortalidade), pode ser explicada porque o oxigênio dissolvido apresenta depleção relacionada principalmente à decomposição de matéria orgânica e respiração dos organismos, embora alguns compostos como a amônia aumentem sua toxicidade em baixas concentrações de oxigênio, tendo como consequência mecanismos fisiológicos compensatórios a fim de minimizar os efeitos da hipóxia nesses organismos (AMARAL, 2012).

De acordo com Jiang e colaboradores (2010), a fração de óleo acomodada na água demonstra alta toxicidade para o zooplâncton marinho, principalmente nos primeiros estágios de vida, visto que compostos como o HPA e o benzeno podem se acumular nos tecidos devido às suas habilidades lipofílicas. Em algumas espécies, uma tendência à tolerância pode

se manifestar em diferentes estágios de vida e a resistência a toxicidade aos compostos do óleo pode ser variada.

É importante destacar que, mesmo considerando a exposição ao experimento de simulação de formação de OSA, onde foi observado um baixo valor de CL_{50} (5,59), demonstrando um potencial letal menos tóxico, diversos estudos evidenciam os efeitos à exposição em baixa concentração para o zooplâncton, como anormalidades comportamentais na alimentação (JENSEN et al., 2008; CALBET et al., 2007; BARATA et al., 2002), aumento no consumo de oxigênio (SMITH e HARGREAVES, 1984), crescimento e desenvolvimento anormal, e diminuição da taxa de crescimento e reprodução (BELLAS e THOR, 2007; BEJARANO et al., 2006; OLMSTEAD e LEBLANC, 2005).

4.4 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou avaliar o caráter tóxico potencial da formação do OSA a partir de experimentos de simulação em microescala utilizando como organismo-teste o copépode bentônico *Nitokra* sp. realizando um estudo comparativo com a toxicidade encontrada para elutriato formado a partir da diluição percentual de óleo e sedimento.

Foi observado que, em salvaguardo de suas diferentes características intrínsecas, a porção aquosa concentrada da simulação mostrou-se consideravelmente menos tóxica (CL_{50} 70,71%) do que o elutriato formado a partir das diluições percentuais do sedimento com óleo (CL_{50} 5,59%).

Com relação ao poder explicativo da influência das variáveis monitoradas, destacam-se as correlações fortes e positivas entre os fatores de toxicidade (concentração e mortalidade) em detrimento do oxigênio dissolvido, que demonstrou correlação forte e negativa ao passo em que o pH pareceu ser o fator menos determinante para o resultado dos testes dentre as variáveis físico-químicas avaliadas neste estudo.

Dada à complexidade e a variabilidade dos hidrocarbonetos e compostos insolúveis em água, é necessário destacar a importância da relação das análises de toxicidade juntamente com o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, uma vez que os limites de confiança dos efeitos não são muito pequenos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, K. G. C. **Correlação entre fator de toxicidade e parâmetros físico-químicos para efluentes domésticos tratados**. 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. **Padronização e aplicação do copépodo marinho *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos.** 2008. 104 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) - Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, 2008.

BARATA, C.; BAIRD, D.; MEDINA. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 230, p. 183–194, 2002.

BARRAGAN, O. L. V. **Caracterização geoquímica de óleos da América Latina.** 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) - Programa de pós-graduação em Geoquímica, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; ROCHA, J. M. B; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em oceanografia química.** Rio Grande: Editora da FURG, 1996. 132 p.

BEJARANO, A.C.; CHANDLER, G.T.; HE, L. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 332, n. 1, p. 49–59, 2006.

BELLAS, J.; THOR, P. Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 6 p. 465–474, 2007.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais.** São Paulo: CETESB, 1993. 764p.

BRITO, E. M.S.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; OTEYZA, T. G.; CRAPEZ, M. A. C.; ALELUIA, I.; WASSERMAN, J. C.A. A case study of *in situ* oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**. v. 58, n. 3, p. 418-423, 2009.

CALBET, A.; SAIZ, E.; BARATA, C. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1, 2-dimethylnaphthalene on the marine copepod *Paracartia grani*. **Marine Biology**, v. 151, n. 1, p. 195–204, 2007.

CARIELLO, M. S. **Efeito do Naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, e nos microcrustáceos estuarinos *Nitokra* sp. e *Leptocheirus plumulosus*.** 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** SILVA, F. C. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 370 p.

FERRAZ, M. A.; ZARONI, L. P.; BERGMANN FILHO, T.U.; GASPARRO, M. R. SOUSA, E. C. P. M. **Taxa de eclosão de ovos do copépodo *Nitokra* sp. em diferentes salinidades.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11, 2010. Bombinhas, Santa Catarina. **Anais...** Bombinhas, Santa Catarina. 2010.

FIORUCCI, A. R. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, v. 22, p. 10 – 16, 2005.

FURLEY, T. H.; VITALI, M. M.; SOBREIRA, R. G.; ZARONI, L. P. **Sensibilidade aguda do copépodo *Nitokra* sp. ao sulfato de zinco em diferentes salinidades**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11, 2010. Bombinhas, Santa Catarina. **Anais...** Bombinhas, Santa Catarina. 2010.

GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. **Methods of seawater analysis** 3ed. Florida: Verlage Chemie, 1999. 417p.

ITOPF. **Fate of Marine Oil Spills**: Technical Information Paper. London, UK. n 2, 2011. Disponível em: <<http://www.itopf.com/information-services/publications/documents/tip2fateofmarineoilspills.pdf>>. Acesso em 10 dez. 2013.

JENSEN, M. H.; NIELSEN, T.G.; DAHLLÖF, I. Effects of pyrene on grazing and reproduction of *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* from Disko Bay, West Greenland. **Aquat. Toxicol.** v. 87, n. 2, p. 99–107, 2008.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; XU, S.; LIAO, Y.; SHOU, L.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZENG, J. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. **Acta Ecol. Sin.** v. 30, p. 8–15, 2010.

KHELIFA, A. B.; FIELDHOUSE, Z.; WANG, C.; YANG, M. LANDRIAULT, M.F. FINGAS, C.E. BROWN, AND L. GAMBLE. **A Laboratory Study on Formation of Oil-SPM Aggregates using the NIST Standard Reference Material 1941b**. In: PROCEEDINGS OF THE THIRTIETH ARCTIC AND MARINE OIL SPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR, Environment Canada, Ottawa, Ontario, v. 1, p. 35-48, 2007.

KRUMBEIN, William Christian; SLOSS, Laurence Louis. Stratigraphy and sedimentation. **Soil Science**, v. 71, n. 5, p. 401, 1951.

LE FLOCH, S.; GUYOMARCH, J.; MERLIN, F.X.; STOFYN-EGLI, P.; DIXON, J.; LEE, K. The influence of salinity on oil–mineral aggregate formation. **Spill science e technology bulletin**, v. 8, n. 1, p.65–71, 2002.

METCALF; EDDY, INC. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4 ed. Boston: McGraw-Hill, 2003.

NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil**. São Paulo: Artes Gráficas e Ind. Ltda, 2002. 262 p.

OLMSTEAD, A.W.; LEBLANC, G.A. Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: predictive modeling of sublethal toxicity. **Aquat. Toxicol.** v. 75, n. 3, p. 253–262, 2005.

PINA, P.; BRAUNSCHWEIG, F.; SARAIVA, S.; SANTOS, M.; MARTINS, F.; NEVES, R. A importância dos Processos Físicos no controlo da Eutrofização em Estuários. **Sapientia**. Algarve, 2003. Disponível em < <http://hdl.handle.net/10400.1/40> >. Acesso em: 04 abr. 2012.

QUEIROZ, A. F. de S.; CELINO, J. J. Manguezais e Ecossistemas estuarinos na Baía de Todos os Santos. In: QUEIROZ, A. F. DE S.; CELINO, J. J. **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador - BA: EDUFBA, 2008. p. 39–58.

SMITH, R. L.; HARGREAVES, B. R.; Oxygen consumption in *Neomysis Americana* (Crustacea:Mysidacea) and the effects of naphthalene exposure, **Mar. Biol.** v. 79, n. 2, p. 109–116, 1984.

STOFFYN-EGLI, P., LEE, K. Formation and characterization of oil–mineral aggregates. **Spill science and technology bulletin**, v. 8, n. 1, p. 31 – 44, 2002.

SUN, J.; ZHENG, X. A review of oil suspended particulate matter aggregation a natural process of cleansing spilled oil in the aquatic environment. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 11, n. 10, p. 1801–1809. 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Testing Manual EPA-821-R-02-012 - Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Out. 2002. Disponível em: < http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007_07_10_methods_wet_disk2_atx1-6.pdf >. Acesso em 10 Jan 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Testing Manual EPA-823-B-01-002 - Methods for collection, storage, and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses**. Oct 2001. Disponível em: < <http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/upload/collectionmanual.pdf> >. Acesso em 04 Fev 2014.

WALKEY-BLACK, A. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. **Soil Science**, v. 63, p. 251- 263, 1947.

ZARONI, L. P.; BERGMANN FILHO, T.U.; FERRAZ, M. A.; GASPARRO, M. R. & SOUSA, E. C. P. M. **Taxa de eclosão de ovos do copépodo *Nitokra* sp. em diferentes tipos de sedimento**. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11, 2010. Bombinhas, Santa Catarina. **Anais...** Bombinhas, Santa Catarina. 2010.

5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO (OSAs) EM EXPERIMENTO DE SIMULAÇÃO A NÍVEL DE MICROESCALA

Resumo:

A agregação de material particulado em suspensão (MPS) e gotículas de óleo em ambientes com determinada energia hidrodinâmica pode proporcionar a formação de Agregados Óleo-MPS (OSA). Uma simulação em laboratório foi realizada com o objetivo de investigar o possível potencial tóxico da formação do OSA, utilizando três diferentes concentrações de material particulado (50, 200, 300 mg/L), em um experimento em microescala. Para tanto, foram utilizadas amostras de sedimento de manguezal, coletadas ao longo do estuário do rio Pardo, município de Canavieiras, região litoral sul do estado da Bahia e amostra de óleo obtida da bacia sedimentar de Campos. O procedimento foi realizado através dos testes toxicológicos de exposição aguda para determinar a CL_{50} (concentração letal 50%) utilizando como organismo teste o microcrustáceo *Artemia salina*. Foram realizadas diluições seriadas a partir de amostragem de superfície e fundo para que fosse possível caracterizar a toxicidade em diferentes parcelas. A concentração que apresentou maior potencial tóxico foi a de 200 mg/L apresentando valores iguais para superfície e fundo (CL_{50} 7,91%), já a concentração com menor potencial tóxico foi a de 300 mg/L (CL_{50} 31,5%) para amostras de superfície. Foi observada correlação negativa entre o potencial de oxi-redução e o potencial hidrogeniônico (apenas em amostras com 200 mg/L de sedimento), e a correlação positiva entre os fatores de toxicidade (diluição percentual e mortalidade) e os outros parâmetros monitorados.

5.1 INTRODUÇÃO

A interação entre gotículas de óleo suspenso na água e o material particulado em suspensão (MPS) tem sido objeto de investigação para diversos estudos, não só sobre suas propriedades, mas também as variáveis que caracterizam sua formação (OWENS, 1999; KHELIFA et al., 2002 – 2005b; LEE et al., 1998 – 2003; MUSCHENHEIM; LEE, 2002; OMOTOSO, 2002; OWENS; LEE, 2003; PAYNE et al., 2003; AJJOLAIYA, 2004). Devido às suas características, o OSA se configura como efetiva forma de limpeza para tratamento de óleo na água. As gotas de óleo são facilmente fragmentadas em tamanhos de poucos micrômetros o que leva à rápida transferência de manchas de óleo a partir da superfície do mar para a coluna de água, aumentando sua superfície de contato (LE FLOCH et al., 2002; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002). A formação do OSA no ambiente através da interação do óleo-MPS também aumenta a taxa de dispersão e de biodegradação do óleo, além de impedir que este volte a aderir no sedimento (LEE; STOFFYN-EGLI, 2001; OWENS, 1999).

É importante considerar que a disposição do óleo em gotículas pode aumentar a concentração de hidrocarbonetos em solução, aumentando também a biodisponibilidade destes produtos, promovendo não só o aumento da degradação natural como também aumento na toxicidade do óleo por conta da exposição de compostos como benzeno, tolueno e xileno. Estes compostos apresentam considerável solubilidade em água comparada a outros, o que torna os organismos marinhos mais vulneráveis, uma vez que absorvem esses contaminantes pelos tecidos, brânquias, por ingestão direta da água ou de alimento contaminado (ITOPF, 2013).

Os testes de toxicidade aguda são amplamente utilizados para medir os possíveis efeitos de substâncias tóxicas sobre determinadas espécies durante um curto período de tempo comparado ao período de vida do organismo-teste em questão. Avalia a dose ou concentração de um agente tóxico que permitiria produzir uma reação específica mensurável em um organismo-teste, em um período de tempo curto, geralmente de 24 à 96 h. O principal efeito mensurado em estudos de toxicidade aguda é a letalidade ou algum outro comportamento que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade. Os testes de toxicidade aguda admitem valores de CE₅₀ (Concentração Efetiva) e CL₅₀ (Concentração Letal). Os valores de concentrações efetivas e letais são sempre relacionados a 50% dos organismos, porque estas respostas são mais reprodutíveis, podendo ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA et al., 2008).

O microcrustáceo *Artemia salina* (LEACH, 1819), é utilizado extensivamente como organismo-teste em ensaios laboratoriais ecotoxicológicos principalmente relacionados a ambientes estuarinos, marinhos e hipersalinos. Entre as características intrínsecas que fazem com que este organismo seja amplamente utilizado em ensaios laboratoriais podem ser citadas a ampla faixa de tolerância à salinidade (5-250) e temperatura (6-25°C); ciclo de vida curto; alta adaptabilidade às adversidades ambientais e condições de ensaio e cultivo; alta fecundidade (reprodução bissexuada ou partenogenética); tamanho pequeno; dieta não seletiva e alta adaptabilidade a variados nutrientes, garantindo confiabilidade, viabilidade e custo-efetividade aos ensaios (NUNES et al., 2006).

Esta pesquisa tem como principal escopo avaliar a sensibilidade do microcrustáceo *Artemia salina* em ensaios toxicológicos com testes estáticos sem renovação onde seja possível determinar possíveis efeitos adversos da exposição às amostras colhidas em ensaios onde foi simulada a formação do OSA em protocolo experimental em microescala, a partir de diluições seriadas das frações de superfície e fundo, avaliando os efeitos sobre a sobrevivência (teste toxicológico agudo) deste organismo nestas diferentes parcelas.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foram realizados testes toxicológicos agudos em experimentos de simulação de formação de Agregados Óleo-Material Particulado em Suspensão em microescala (escala piloto). Os testes agudos foram realizados em diluições percentuais seriadas de amostras de superfície e fundo.

Em paralelo a cada ensaio, foram realizados testes com substância de referência (Dodecil Sulfato de Sódio - DSS), para elaboração da carta-controle com o objetivo de ilustrar a regularização da sensibilidade do cultivo de organismos utilizados para os testes. Cada ensaio foi acompanhado de análises dos parâmetros físico-químicos associados (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade), no período inicial e final dos testes, para controlar as condições básicas de exposição e subsidiar a interpretação dos resultados.

Os dados produzidos pelos testes agudos com as simulações em microescala e com substâncias de referência foram expressos como dados de mortalidade e sobrevivência dos indivíduos adultos (CL_{50}) através do uso do método matemático Probit ou Trimmed Spearman-Kärber Method, conforme recomendado pela USEPA (2002), associando a intervalos de confiança de 95% e produzindo respostas relacionadas à mortalidade (ou sobrevivência), que serão dadas para cada ensaio em comparação com o grupo controle.

5.2.1 Coleta e armazenamento do sedimento

Foram amostrados sedimentos em seis pontos durante a baixa-mar ao longo do Rio Pardo, nas proximidades do município de Canavieiras, região litoral sul do estado da Bahia, tomando-se o cuidado de coletar o sedimento nos primeiros cinco centímetros com uma espátula de aço inoxidável previamente descontaminada e ambientada com água local. A coleta do sedimento respeitou os limites de um transecto com aproximadamente quatro metros de comprimento, onde foram aleatoriamente coletadas 20 porções do substrato de manguezal, homogêneos em bandeja de vidro e devidamente acondicionados, conservando-se a temperatura de até 4 °C. Os parâmetros físico-químicos do sedimento (pH, potencial redox, temperatura, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, sólidos totais e turbidez) foram medidos *in situ* utilizando uma sonda multiparâmetro.

Para a realização das simulações, cada amostra de sedimento foi calcinada em mufla a 450 °C, por 6 horas, homogênea, peneirada com uma malha de 100 µm e mantida em

geladeira a 4 °C em recipientes de vidro por um período de 24 horas, até a distribuição do sedimento nos recipientes-testes para o início dos bioensaios.

5.2.2 Caracterização do óleo e do sedimento

A caracterização das matrizes óleo e sedimento foram realizadas no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO/IGEO/UFBA), e compreenderam às análises de granulometria em sedimento, e grau API (densidade) e viscosidade/fluidez, HTP e HPA no óleo. As análises de sedimento não excederam o prazo de 48 horas após as coletas.

Em laboratório, após liofilização, peneiramento (2 mm) e homogeneização das amostras, foram realizadas as análises de granulometria, obtida com analisador de partículas com difração a Laser Modelo Cilas 1064, com pré-tratamento da amostra segundo Embrapa (2009).

Para as simulações foi utilizado óleo cru da bacia de Campos, cuja densidade foi mensurada seis vezes com densitômetro (DMA 5000 Density Meter) a 15°C, sua viscosidade também foi determinada três vezes nas mesmas condições de temperatura através da utilização do viscosímetro rotacional (Haake Viscotester VT500).

A distribuição de hidrocarbonetos também foi utilizada para caracterizar o óleo por Cromatografia Gasosa acoplada a um detector por ionização de chama (GC-FID) modelo Varian CP 3800 equipado com coluna capilar modelo DB5 de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, fase estacionária de 0,25 µm de espessura e fluxo de gás de arraste (hélio).

5.2.3 Cultivo e aquisição dos organismos

Os cistos de *Artemia salina* foram adquiridos em uma casa de aquarismo, e mantidos ao abrigo da luz em dessecadores com sílica-gel para garantir a isenção de contaminantes e conservar sua taxa de eclosão.

Posteriormente, foram eclodidos em aquários de vidro com capacidade de 1L com aeração constante seguido metodologia sugerida por Veiga e Vital (2002), não ultrapassando a concentração de 0,5 g/L de cistos. Em cada aquário foi mantida a salinidade 15 e a temperatura média de 25°C.

Após 48 horas da eclosão dos cistos, os organismos foram coletados com a ajuda de uma pipeta de pasteur de vidro para realização dos testes de referência e ensaios de toxicidade, visto que nesta fase são adequados para teste por já iniciarem atividade de filtração, estando mais sensíveis e diminuindo a variabilidade do teste (SORGELLOOS et al., 1978).

5.2.4 Testes com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS)

A solução estoque foi preparada em balões de 100 mL onde foram adicionados 10 mg de Dodecil Sulfato de Sódio para cada 100 mL de água salgada em salinidade 15, que é obtida através da diluição de 30g de sal marinho artificial em 500 mL de água, e avolumada para um litro.

Foram realizados três testes de referência com a substância Dodecil Sulfato de Sódio, para avaliação da faixa de sensibilidade dos organismos utilizados no teste e confecção da carta-controle de toxicidade. Para tanto, as amostras foram diluídas em balões volumétricos nas concentrações de 0, 9, 12, 16, 21, 27 e 35 mg/L.

Cada unidade de diluição foi efetuada em triplicata com frascos-teste de vidro contendo 10 mL da solução e dez organismos. Os recipientes foram dispostos em bandeja e cobertos para minimizar perdas por evaporação.

As condições para o ensaio foram mantidas respeitando o fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro, temperatura de 25°C durante 48h. O *endpoint* observado é CL₅₀ de 48h. Ou seja, após uma exposição de dois dias, são contados os organismos vivos e mortos em cada teste com o auxílio de um microscópio ou lupa.

5.2.5 Simulação em microescala para formação do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA)

O protocolo consiste em simular as condições ambientais determinantes para formação do OSA, a partir de erlenmeyers com 250 mL de água salobra artificial em salinidade 15, e pesadas frações de sedimento para cada um, a fim de respeitar o valor de concentração de 0,05; 0,3 e 0,3 g/L de sedimento.

O sedimento foi transferido para os erlenmeyers com a ajuda de um pissete com água salobra artificial, e cada um deles foi tampado com papel alumínio, colocado por um minuto em mesa agitadora e deixado em descanso por uma noite em temperatura de 15°C em ambiente escurecido.

No dia seguinte, cada um dos erlenmeyers passou mais um minuto em mesa agitadora a 2,1 Hz (126 RPM) e posteriormente foi adicionado 0,05g (50 mg ou 0,05 cm³) de óleo, considerando-se o valor esperado de 50 mg. Sucedeu-se mais três horas de agitação em mesa agitadora reciprocante a 126 RPM e mais um descanso por uma noite. As amostras foram utilizadas logo após o termino do preparo, sendo coletadas randomicamente frações da superfície e fundo.

5.2.6 Testes toxicológicos agudos

Para os testes de toxicidade aguda das amostras de superfície e fundo dos experimentos de simulação de formação do OSA, foi utilizada água salobra artificial em salinidade 15, para que sejam diluídas as frações coletadas de superfície com pipeta automática nas proporções descritas na Tabela 5.1.

Para cada ensaio foram utilizadas concentrações de 0,05; 0,02 e 0,03 mg/L de sedimento para aproximadamente 0,05g de óleo, quatro diluições seriadas percentuais (100%, 50%, 25%, 12,5%) e um controle positivo (branco 0%) nas três concentrações de sedimento, avaliando superfície e fundo. Dez machos adultos ou fêmeas não ovadas foram adicionados em cada recipiente contendo 15 mL da solução de diluição efetuada a partir do elutriato.

Tabela 5.1 - Valores utilizados de frações da superfície e fundo para cada simulação de formação do OSA e água salobra artificial para testes de toxicidade aguda

Diluições Percentuais	Fase Aquosa (mL)	Água Salobra Artificial (mL)
100%	10	-
50%	5	5
25%	2,5	7,5
12,5%	1,25	8,75

A salinidade da água foi monitorada utilizando um refratômetro portátil e os parâmetros físico-químicos de todos os testes foram mensurados utilizando medidor portátil de pH com precisão de ± 0.01 unidades de pH; O.D. com um medidor micro processado

portátil digital com precisão de $\pm 0,05\%$; temperatura com termômetro acoplado ao oxímetro com precisão de $\pm 0,05$ °C e condutividade com condutivímetro, portátil digital com precisão de $\pm 0,05\%$. As condições para o ensaio de toxicidade aguda estão descritas no Quadro 5.1.

Quadro 5.1 - Condições para ensaio de toxicidade aguda (mortalidade) com *Artemia salina* para as amostras das frações de superfície e fundo dos experimentos de simulação de formação do OSA em ambiente de manguezal

Parâmetros	Condições
Temperatura	25 \pm 1°C
Salinidade	15
Fotoperíodo	Natural (12h claro/12h escuro)
Sistema de ensaio	Estático
Duração do ensaio	48h
Volume da solução-teste	10 mL
Réplicas por diluição	3
Organismos por réplica	10
Idade dos organismos	Adultos
Efeito observado	Letalidade (CL ₅₀)
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de sobrevivência no controle

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2.7 Caracterização do óleo e do sedimento

Serão aqui descritos os resultados referentes à caracterização do sedimento e do óleo utilizado no presente estudo, considerando a etapa de campo e coleta de sedimento, que inclui medição de parâmetros físico-químicos, bem como as análises laboratoriais realizadas. Esses resultados compõem a necessidade de caracterizar o sedimento utilizado nos ensaios para controle das condições experimentais avaliadas. Na Tabela 5.2 são apresentados os dados de coordenadas geográficas e os parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta no substrato de manguezal da região de estudo.

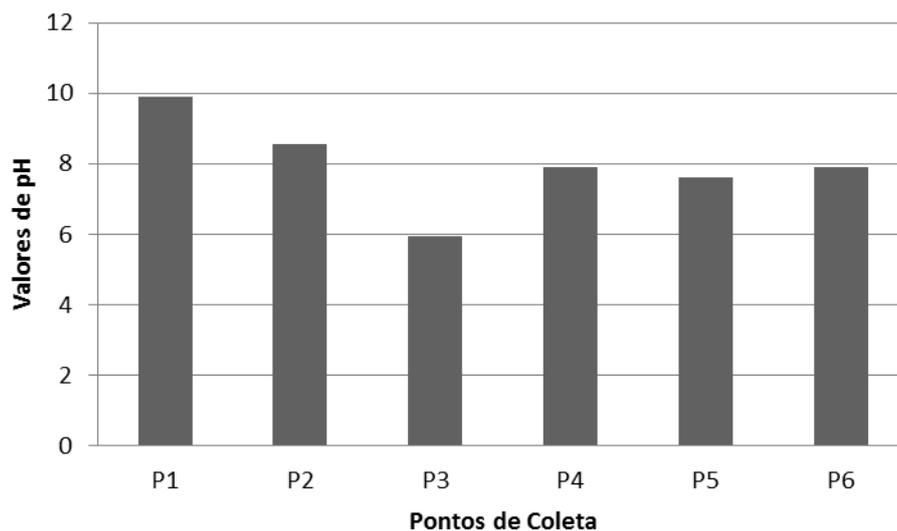
As coordenadas estão diretamente relacionadas aos pontos amostrais, como pode ser visto na Tabela 5.2, associadas aos horários de coleta nela descritos, os quais obedeceram à restrição de coleta em maré baixa (em torno de 0,3m). Os valores de pH, Eh, temperatura, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, sólidos totais e turbidez são representados graficamente abaixo.

Tabela 5.2 - Coordenadas geográficas e parâmetros físico-químicos descritivos nos pontos de coleta às margens do rio Pardo, município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais

	Coordenadas	Hora	Parâmetros físico-químicos (<i>in situ</i>)							
			pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Sal.	Condt. (S/m)	O.D. (mL/L)	S.T.D. (mg/L)	Turbidez (NTU)
P1	S 15° 41' 58" W 38° 55' 54"	07:35	9,91	45	26,56	30	30,8	15,2	17,4	121,0
P2	S 15° 41' 36" W 38° 56' 21"	08:57	8,55	163	29,62	20	35,7	18,3	21,8	26,6
P3	S 15° 40' 52" W 38° 56' 24"	09:22	5,93	325	30,02	12	23,4	17,66	14,5	30,6
P4	S 15° 41' 26" W 38° 57' 05"	10:03	7,89	245	30,82	6	15,5	21,04	9,61	49,1
P5	S 15° 41' 25" W 38° 57' 35"	10:56	7,61	240	30,37	6	14,8	19,63	9,16	99,2
P6	S 15° 40' 58" W 38° 58' 25"	11:47	7,91	222	30,08	5	12,3	18,95	7,62	179

Legenda: pH = Potencial Hidrogeniônico; Eh = Potencial de Redução; Temp.= Temperatura; Sal. = Salinidade; Condt. = Condutividade; O.D. = Oxigênio Dissolvido; S.T.D. = Sólidos Totais Dissolvidos; NTU = Unidades Nefelométricas de Turbidez.

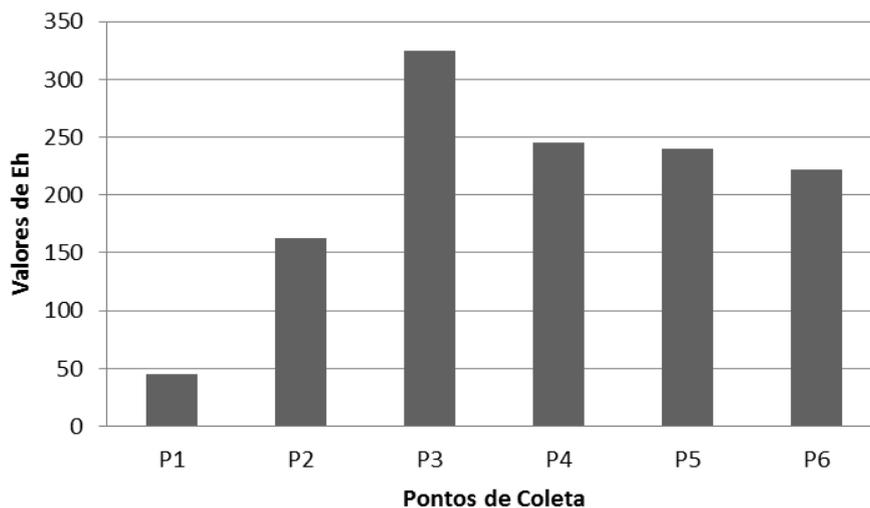
Figura 5.1 - Representação gráfica dos valores de pH ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Os valores de pH apresentaram um caráter neutro a levemente básico (com exceção do ponto 3 que apresentou relativa acidez), com pequena variação entre os seis pontos amostrais, tendo seu máximo registrado no P1 (9,91) e mínimo registrado no P3 (5,93), que pode ser indício de uniformidade de características entre esses locais, consequência de contribuições semelhantes das águas marinhas e doce nos pontos amostrais (Figura 5.1).

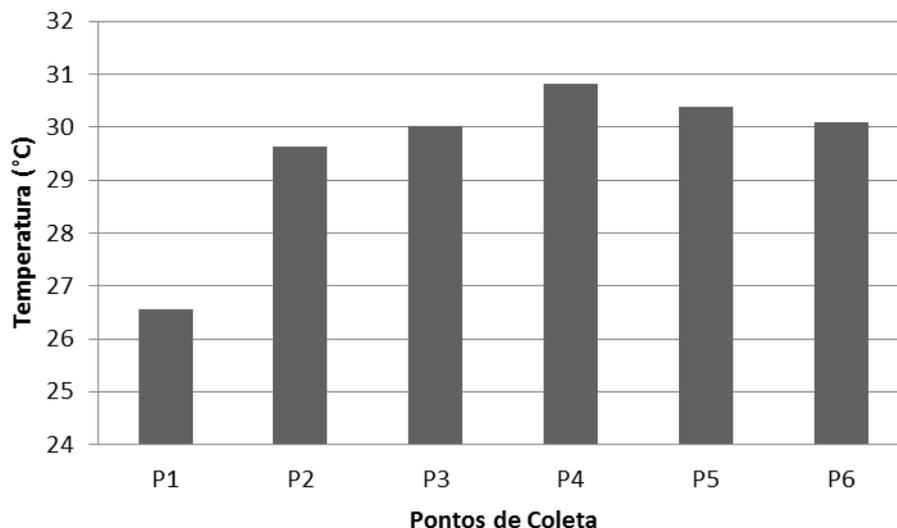
Com relação aos valores de Eh, foi registrada ampla variação entre os máximos e mínimos observados nos pontos 3 e 1 (325,0 mV) e 5 (45,0 mV), respectivamente, sendo que todos demonstram significativa característica oxidante, que representa a instabilidade deste ambiente durante a medição deste parâmetro (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Representação gráfica dos valores de Eh (em mV) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



A variação de temperatura não excedeu a diferença de 4,2 °C entre os pontos, sendo o valor máximo registrado no P4 (30,8 °C) e o valor mínimo visto no P1 (26,5 °C). Essa variação da temperatura pode estar relacionada à influência das condições climáticas em função dos horários e locais de coleta, integradas às características intrínsecas dos pontos amostrados (Figura 5.3).

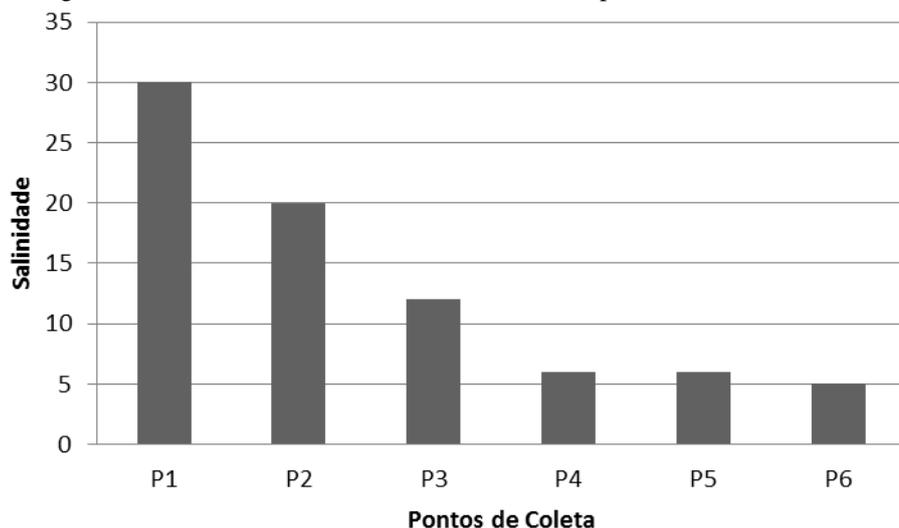
Figura 5.3 - Representação gráfica dos valores de temperatura (em °C) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Com relação ao comportamento da salinidade, conforme esperado para um ambiente de estuário, se manteve relativamente alta nos três primeiros pontos (30, 20, 12) e reduziu significativamente nos três últimos (6, 6 e 5, respectivamente). Neste caso, é relevante observar que há uma redução gradual nos valores, onde os maiores índices foram encontrados em pontos amostrais que sofrem influência da salinidade à jusante e os menores à montante do rio (Figura 5.4). Esse comportamento pode ser explicado com base na penetração da maré, que faz com que as amostras coletadas em manguezais que apresentam proximidade maior à foz do estuário tenham salinidades mais elevadas.

Os parâmetros pH, Eh, e salinidade são dependentes da temperatura, aumentando e diminuindo de acordo com a variação desta, de forma não linear. Todos esses fatores, juntos ou isoladamente contribuem para que os cátions que se encontram sorvidos às partículas que constituem os substratos dos manguezais possam tornar-se biodisponíveis (QUEIROZ; CELINO, 2008), portanto, os resultados dos parâmetros físico-químicos nas diferentes estações amostrais são determinantes para que se possa correlacionar seus possíveis efeitos como influentes para a relação de toxicidade encontrada nos sedimentos.

Figura 5.4 - Representação gráfica dos valores de salinidade ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



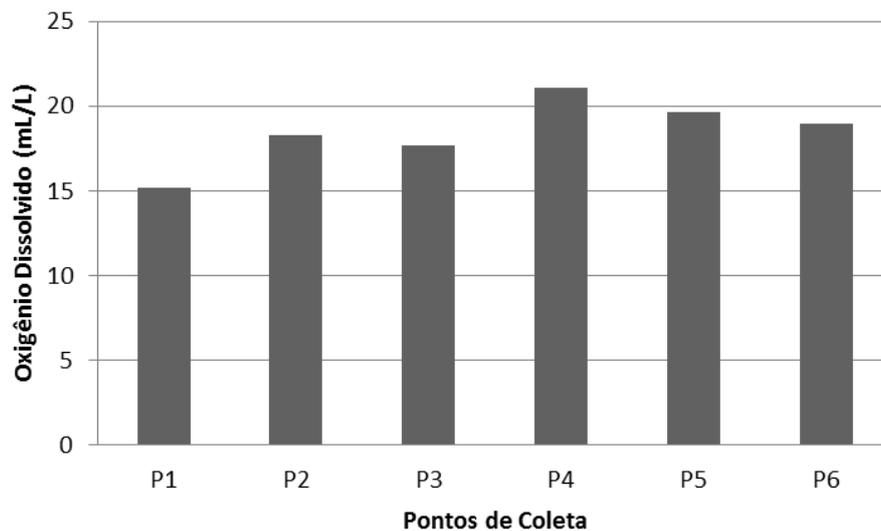
Os valores de oxigênio dissolvido variaram entre o máximo de 21,04 mL/L e o mínimo de 15,20 mL/L (Figura 5.5). Essa variável sofre influência da composição dos sedimentos, da temperatura, da salinidade da água e de fatores hidrodinâmicos e oferece indicativos acerca das condições naturais do ambiente e possibilita detectar possíveis impactos ambientais como a eutrofização e a poluição orgânica. Gás carbônico, oxigênio

molecular, íons de nitrito e nitrato e a própria água são as principais fontes para o oxigênio dissolvido (BAUMGARTEN et.al., 1996).

É possível observar que o oxigênio dissolvido teve um padrão comportamental de valores muito semelhante à temperatura. Os valores de temperatura nos diferentes pontos podem ser considerados um fator determinante para a distribuição dos valores de oxigênio dissolvido, visto que a temperatura determina a solubilidade dos gases (FIORUCCI, 2005).

Com relação aos valores encontrados para a condutividade (Figura 5.6), foi observada ampla variação com destaque para o valor máximo apresentado no P2 (35,7 mS). É possível observar uma relação inversa entre o comportamento do e comparado à condutividade, que pode ser interpretado pela ótica do mesmo critério visto que a presença de íons dissolvidos pode exercer enorme influência nos valores de condutividade elétrica registrados (QUEIROZ; CELINO, 2008).

Figura 5.5 - Representação gráfica dos valores de oxigênio dissolvido (em mL/L) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



O maior valor encontrado em sólidos totais dissolvidos foi visto no P2 (21,8 mg/L) e o menor valor no P6 (7,6 mg/L) (Figura 5.7), assim sendo, os valores de sólidos totais foram diretamente proporcionais aos encontrados para a condutividade. Sampaio e colaboradores (2007) já haviam desenvolvido estudos que demonstravam que existe uma forte correlação linear entre esses dois parâmetros, que pode ser explicada pela razão destes estarem em solução e em estado coloidal (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Figura 5.6 - Representação gráfica dos valores de condutividade (em S/m) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais

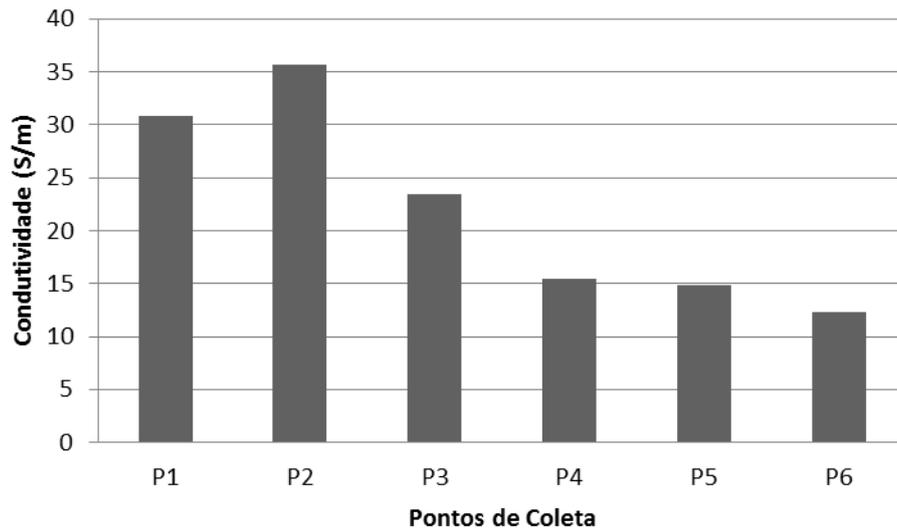
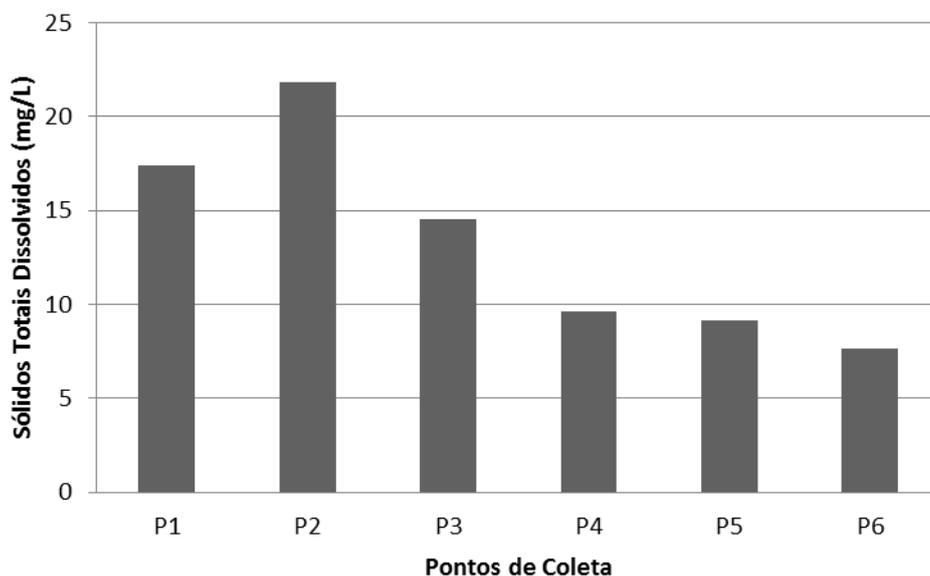


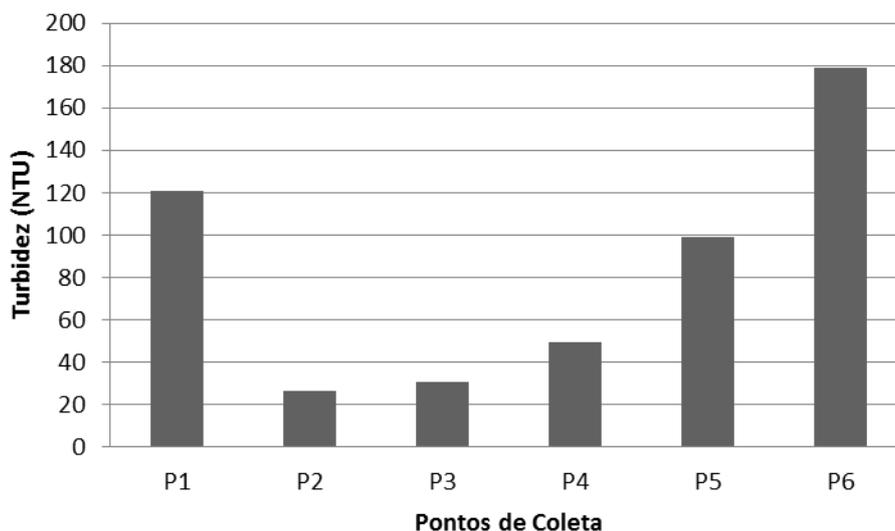
Figura 5.7 - Representação gráfica dos valores de sólidos totais dissolvidos (em mg/L) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Para a turbidez, o maior valor foi encontrado no P6 (179,0 NTU) seguido do P1 (121,0 NTU) e o menor valor foi registrado no P2 (20,6 NTU) (Figura 5.8). Segundo Pina e colaboradores (2003) a alta turbidez do estuário é consequência do elevado escoamento de maré, da carga fluvial, da grande extensão de áreas intertidais e ainda da grande susceptibilidade para a geração de ondas que intensificam a ressuspensão.

Cada um desses valores, evidenciam um conjunto de condições ambientais da área de estudo que possibilitaria e por vezes atenuaria a formação do OSA nestes locais, considerando os fatores que influenciam na formação destes agregados em ambiente natural.

Figura 5.8 - Representação gráfica dos valores de turbidez (em NTU) ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais



Com relação ao perfil granulométrico dos pontos de coleta (Figura 5.9), as médias para os valores encontrados nas análises mostram uma predominância das frações consideradas como areia muito fina (62,5 – 125 μm) e silte (3,9 – 62,5 μm) segundo a classificação granulométrica proposta pela escala de Krumbein (1951). Considerando que, de acordo com Sun & Zeng (2009), a granulometria é um fator determinante para formação e destino dos OSAs formados e que a formação do OSA é atenuada em sedimento com granulometria de tamanho inferior a 5 μm em função de sua maior área de superfície de contato, a predominância da fração silte no sedimento amostrado confirma a alta viabilidade para formação de OSA na área de estudo considerada.

O óleo cru da bacia de Campos utilizado para a realização dos testes apresentou densidade de 0,8823 g/mL, a média da viscosidade apresentada foi de 33,44 mPa.s. Com relação a distribuição de hidrocarbonetos, o cromatograma do óleo da bacia de Campos apresenta uma maior composição de n-alcenos de baixo peso molecular (nC10-nC17), sugerindo óleos tipicamente marinhos (Figura 5.10). O valor da relação Pristano/Fitano (Pr/Ph) >1 é indicador de um ambiente de deposição com condições oxidantes (óxicas). A relação nC17/nC29 >1 (nC29 é um indicador terrestre e n-C17 é um indicador de material marinho de algas), indica origem predominantemente de aporte de material marinho. As relações Pr/nC17 e Ph/nC18 menores que 1, e o valor de IPC=1,07, são indicativos de maturidade para esse óleo (BARRAGAN, 2012). Não foram observadas para o óleo caracterizado evidências de biodegradação, justificando seu uso para os testes realizados.

Figura 5.9 - Representação gráfica dos valores percentuais das frações granulométricas de sedimento ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais

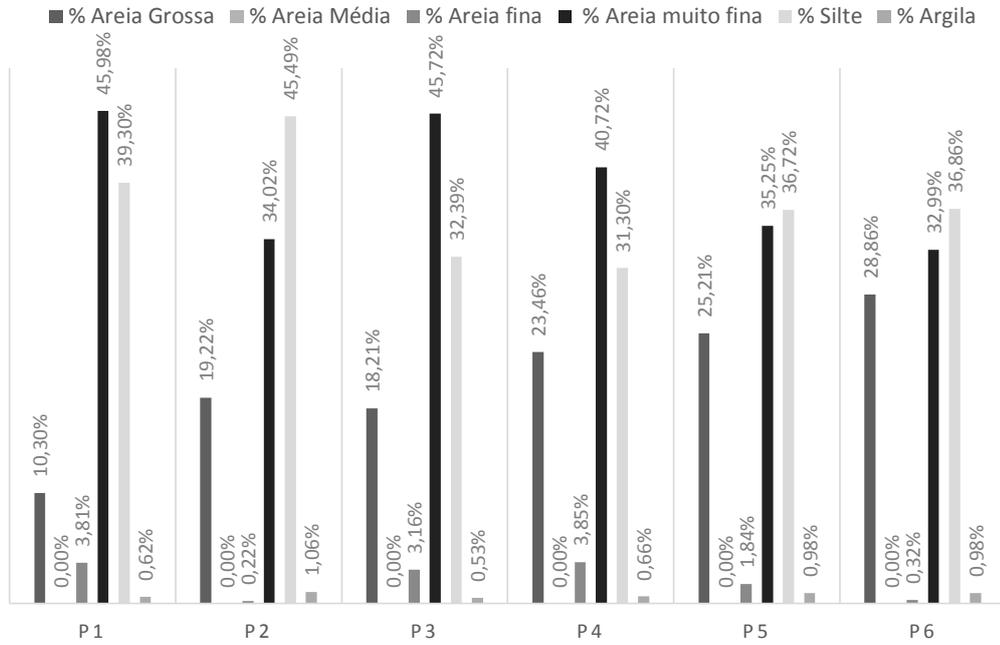
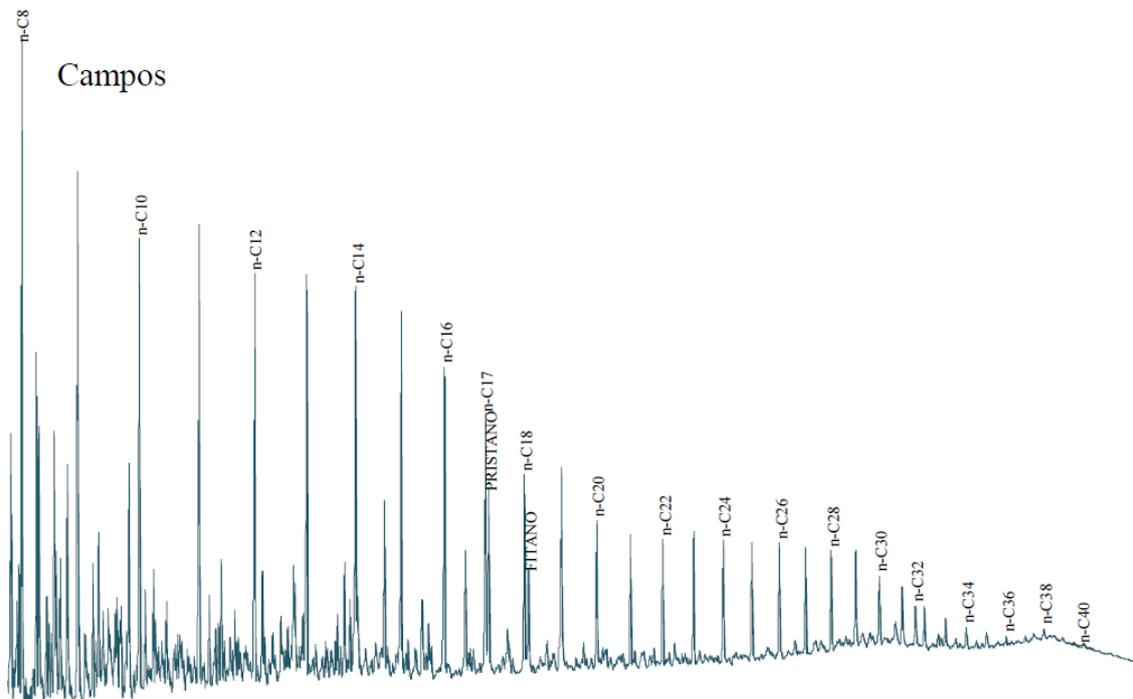


Figura 5.10 - Cromatograma do óleo total para amostra da bacia sedimentar de Campos



Fonte: BARRAGAN, 2012

5.3.1 Testes com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS):

Os testes de toxicidade aguda com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) realizados simultaneamente com os testes de sensibilidade do presente estudo apresentaram resultados dentro dos limites de aceitabilidade descritos (13 - 30,9 mg/L) (VEIGA; VITAL, 2002). Os valores de $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ foram de 27,06; 14,19 e 14,51 mg/L, estando, portanto, dentro da faixa de sensibilidade estabelecida.

A Tabela 5.3 especifica os valores de CL_{50} encontrados para cada teste, bem como os intervalos de confiança (95%), e os parâmetros físico-químicos mensurados.

Tabela 5.3 - Valores de CL_{50} com os limites de confiança (95%) e parâmetros físico-químicos representativos dos testes de referência com DSS seguidos da Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variância

Teste de referência (DSS)	CL_{50} (mg/L)	Limite de Confiança	pH	O.D. (mg/L)	Temperatura (°C)
TR1	27,06	23,18 – 31,58	7,12	6,57	25,1
TR2	14,19	12,5 – 16,1	7,33	6,65	24,8
TR3	14,51	11,75 – 18,17	7,06	6,93	25,3
Média	18,58	**	7,17	6,71	25,06
Desvio padrão	7,33	**	0,14	0,18	0,25
Coef. Vari.	0,39	**	0,01	0,02	0,01

Legenda: TR = Teste de Referência; ** = Não se aplica

5.3.2 Testes toxicológicos agudos:

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com a fase aquosa do protocolo de simulação de formação do OSA (MOREIRA, 2014) e com elutriato produzido a partir da matriz de sedimento e óleo homogeneizados. Cada um desses ensaios foi caracterizado de acordo com o número de mortalidades parciais ajustadas para produzir valores de CL_{50} associados a um intervalo de confiança de 95%.

O teste de toxicidade com a fase aquosa de formação do OSA foi realizado entre os dias 22 e 24 de fevereiro de 2014 (48h), e os resultados das análises realizadas e seus ajustes realizados através do uso dos métodos estatísticos Probit e Trimmed Spearman-Kärber estão dispostos na Tabela 5.4, e posteriormente, na Tabela 5.5, são apresentados os relativos parâmetros físico-químicos registrados no início e ao final das análises.

Tabela 5.4 - Dados percentuais de mortalidade e sobrevivência dos testes de toxicidade agudos a partir da fase aquosa de simulação da formação do OSA utilizados para determinar a CL₅₀ incluindo proporções ajustadas para cálculo e limite de confiança (95%) nas diferentes concentrações de sedimento (50, 200, 300 mg/L)

50 mg/L		Superfície			Fundo		
Diluição Percentual	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas	
1%	3,4	6,6	0,334	4,4	5,6	0,44	
12,50%	3	7	0,3	4,4	5,6	0,44	
25%	5,4	4,6	0,54	4,7	5,3	0,47	
50%	7	3	0,7	5	5	0,5	
100%	8,67	1,33	0,867	5,7	4,3	0,57	
CL ₅₀ (%)		25			70,71		
Intervalo de Confiança		13,01 - 48,03			**		

200 mg/L		Superfície			Fundo		
Diluição Percentual	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas	
1%	4,7	5,3	0,47	4,4	5,6	0,44	
12,50%	5,7	4,3	0,57	5,4	4,6	0,54	
25%	6	4	0,6	6	4	0,6	
50%	6,7	3,3	0,67	6,67	3,33	0,667	
100%	7	3	0,7	6,67	3,33	0,667	
CL ₅₀ (%)		7,91			7,91		
Intervalo de Confiança		0,31 - 204,80			0,31 - 204,80		

300 mg/L		Superfície			Fundo		
Diluição Percentual	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas	Mortalidade	Sobrevivência	Proporções ajustadas	
1%	4	6	0,4	3,34	6,66	0,334	
12,50%	4,4	5,6	0,44	5	5	0,5	
25%	5	5	0,5	5	5	0,5	
50%	5,4	4,6	0,54	6,67	3,33	0,667	
100%	8	2	0,8	7,7	2,3	0,77	
CL ₅₀ (%)		31,5			13,5		
Intervalo de Confiança		7,10 - 139,68			2,28 - 77,51		

Legenda: ** = Não foi alcançado.

Tabela 5.5 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais (representativos do teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina* a partir da fase aquosa de simulação da formação do OSA, seguidos da Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variância nas diferentes concentrações de sedimento

50 mg/L	Superfície								Fundo							
	pH		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Eh (mV)		pH		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Eh (mV)	
Conc. (%)	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
12,50%	7,15	6,6	9,18	9,56	21,1	21,9	-24,6	12,8	7,62	6,68	9,23	9,52	21,5	22,8	-46,8	-2,3
25%	7,19	6,02	9,13	6,51	21,5	22,7	-27,6	19,8	7,64	6,15	9,23	9,4	21,4	22,5	-43,1	4,9
50%	6,84	6,55	9	9,41	23,7	23,1	-19,3	11,7	7,55	6,48	9,24	9,39	21,4	22,6	-37,4	-3,4
100%	7,07	8,45	9,14	9,63	22,2	22,9	-21,2	-88,7	7,27	6,26	9,26	9,44	21,5	21,3	-36,1	16,3
MÉD	7,0625	6,905	9,112	8,777	22,125	22,65	-23,15	-11,1	7,52	6,392	9,24	9,437	21,45	22,3	-40,8	3,875
DP	0,1564	1,062	0,078	1,514	1,1441	0,5259	3,675	51,857	0,171	0,235	0,0141	0,059	0,0577	0,6782	4,997	9,064
CV	0,0221	0,153	0,008	0,172	0,0517	0,0232	-0,158	-4,671	0,022	0,036	0,0015	0,006	0,0026	0,0304	-0,12	2,339

200 mg/L	Superfície								Fundo							
	pH		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Eh (mV)		pH		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Eh (mV)	
Conc. (%)	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
12,50%	7,61	6,6	9,25	9,04	21,9	20	-45,7	3,9	7,59	6,77	9,22	8,89	22	21,4	-46,4	5,9
25%	7,29	6,82	9,13	9,12	21,8	20,8	-46,3	0,8	7,52	6,58	9,21	8,92	21,8	21,2	-43,4	9,9
50%	7,6	7,07	9,25	9,16	21,9	24,9	-47,5	-22,6	7,54	6,61	9,18	8,91	21,9	22,8	-44,3	12,6
100%	7,6	7,04	9,27	9,33	21,6	24,4	-47,3	-15,7	7,57	6,36	9,22	9,09	22,1	24,1	-46,5	15,6
MÉD	7,525	6,882	9,225	9,162	21,8	22,525	-46,7	-8,4	7,555	6,58	9,207	8,952	21,95	22,375	-45,15	11
DP	0,1567	0,218	0,0640	0,122	0,1414	2,4837	0,8485	12,79	0,0310	0,168	0,018	0,092	0,1290	1,3524	1,545	4,120
CV	0,0208	0,031	0,0069	0,013	0,0064	0,1102	-0,018	-1,52	0,0041	0,025	0,002	0,010	0,0058	0,0604	-0,034	0,374

300 mg/L	Superfície								Superfície							
	pH		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Eh (mV)		pH		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Eh (mV)	
Conc. (%)	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
12,50%	7,79	6,92	9,24	8,73	21,7	25	-52,2	-4,3	7,77	7,04	9,22	8,79	21,7	22,2	-55,6	-18,9
25%	7,72	6,67	9,25	8,88	22	21,7	-52,6	8,2	7,67	7,01	9,23	8,63	21,7	21	-52,2	-19
50%	7,71	6,74	9,19	8,85	22,2	23,2	-52,8	-4,9	7,67	7,09	9,23	8,51	21,9	21,7	-51,3	-14,7
100%	7,61	6,1	9,22	8,78	22,3	25	-48,9	-4,3	7,61	6,75	9,21	8,5	22,2	21,4	-49,6	-13,1
MÉD	7,7075	6,6075	9,225	8,81	22,05	23,725	-51,625	-1,325	7,68	6,9725	9,2225	8,6075	21,875	21,575	-52,175	-16,425
DP	0,0741	0,3543	0,0264	0,0678	0,2645	1,5945	1,8337	6,3562	0,0663	0,1519	0,0095	0,1352	0,2362	0,5058	2,5250	2,9881
CV	0,0096	0,0536	0,0028	0,0076	0,0119	0,0672	-0,035	-4,7972	0,0086	0,0217	0,0010	0,0157	0,0108	0,0234	-0,0484	-0,18193

Legenda: Conc. = Concentração; O.D. = Oxigênio Dissolvido; Temp. = Temperatura; Eh = Potencial redox.

De acordo com os dados observados na Tabela 5.4, conclui-se que a concentração que apresentou maior potencial tóxico foi a de 200 mg/L apresentando valores iguais para superfície e fundo (CL₅₀ 7,91%). Já a concentração com menor potencial tóxico foi a de 300 mg/L (CL₅₀ 31,5) para amostras de superfície.

Verificou-se a intensidade das associações lineares do resultado dos testes com os parâmetros físico-químicos através do Coeficiente de Correlação linear de Pearson. O coeficiente da correlação mostra-se positivo se as variáveis são diretamente relacionadas e negativas se forem inversamente relacionadas, sendo seu valor máximo modular igual a 1.

Para a análise toxicológica em questão, os valores marcados em vermelhos mostraram significância para correlação considerando $p > 0,05$. Essa análise foi utilizada para verificação dos parâmetros que mais contribuem para toxicidade, sendo encontradas fortes correlações positivas em todas as concentrações de sedimento testadas entre a diluição percentual e a mortalidade (Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8).

Tabela 5.6 - Matriz de correlação de Pearson para parâmetros físico-químicos e ensaios de toxicidade para a concentração de sedimento 50 mg/L

50 mg/L	Conc.	Mort.	pH	O.D.	Temp.	Eh
Conc.	1,00					
Mort.	0,93	1,00				
pH	0,97	0,88	1,00			
O.D.	0,39	0,15	0,59	1,00		
Temp.	0,52	0,74	0,56	0,16	1,00	
Eh	-0,90	-0,71	-0,86	-0,41	-0,11	1,00

Legenda: Conc. = Concentração; Mort. = Mortalidade; O.D. = Oxigênio Dissolvido; Temp. = Temperatura; Eh = Potencial redox.

Tabela 5.7 - Matriz de correlação de Pearson para parâmetros físico-químicos e ensaios de toxicidade para a concentração de sedimento 200 mg/L

200 mg/L	Conc.	Mort.	pH	O.D.	Temp.	Eh
Conc.	1,00					
Mort.	0,82	1,00				
pH	-0,96	-0,93	1,00			
O.D.	0,86	0,45	-0,74	1,00		
Temp.	0,96	0,78	-0,90	0,78	1,00	
Eh	0,76	0,95	-0,90	0,46	0,63	1,00

Legenda: Conc. = Concentração; Mort. = Mortalidade; O.D. = Oxigênio Dissolvido; Temp. = Temperatura; Eh = Potencial redox.

Tabela 5.8 - Matriz de correlação de Pearson para parâmetros físico-químicos e ensaios de toxicidade para a concentração de sedimento 300 mg/L

300 mg/L	D.P.	Mort.	pH	O.D.	Temp.	Eh
Conc.	1,00					
Mort.	0,98	1,00				
pH	0,97	0,93	1,00			
O.D.	0,39	0,33	0,59	1,00		
Temp.	0,52	0,37	0,56	0,16	1,00	
Eh	-0,90	-0,96	-0,86	-0,41	-0,11	1,00

Legenda: Conc. = Concentração; Mort. = Mortalidade; O.D. = Oxigênio Dissolvido; Temp. = Temperatura; Eh = Potencial redox.

Através da Análise de correlação de Pearson (ACP) observa-se em todas as concentrações uma correlação expressiva entre o pH e o Eh (potencial de oxi-redução) exercendo influências positivas e negativas a depender da concentração de sedimento adotada.

Na concentração de 200 mg/L, observa-se comportamento anômalo dessas variáveis, tendo o pH uma forte influência negativa e a temperatura como fator de influência positiva para o aumento da toxicidade. É importante destacar que o potencial redox está diretamente ligado à biodisponibilidade de compostos tóxicos no ambiente, principalmente de metais associados aos sedimentos de estuários (NIZOLI; LUIZ-SILVA, 2009).

Foi utilizada a Análise de Componentes Principais para realizar a estimativa da similaridade dos dados, representando-os em duas dimensões ortogonais. Os dois fatores representados na Figura 5.11, 5.12 e 5.13 explicam a maior proporção da variância total entre todas as combinações lineares dos dados originais, tendo a segunda menor proporção de variância total que a primeira.

Observa-se para a concentração de sedimento de 50 mg/L uma forte correlação positiva entre os fatores de toxicidade (diluição percentual e mortalidade) sendo o oxigênio dissolvido o menos influente entre os parâmetros físico-químicos monitorados. É possível também visualizar a forte correlação negativa do Eh com os fatores de toxicidade e os outros parâmetros, corroborando com os valores apresentados na correlação de Pearson.

Figura 5.11 - Representação gráfica dos eixos principais (1 e 2) da análise de componentes principais da matriz de correlação (diluições percentuais, mortalidade e parâmetros físico-químicos) para a concentração de sedimento 50 mg/L

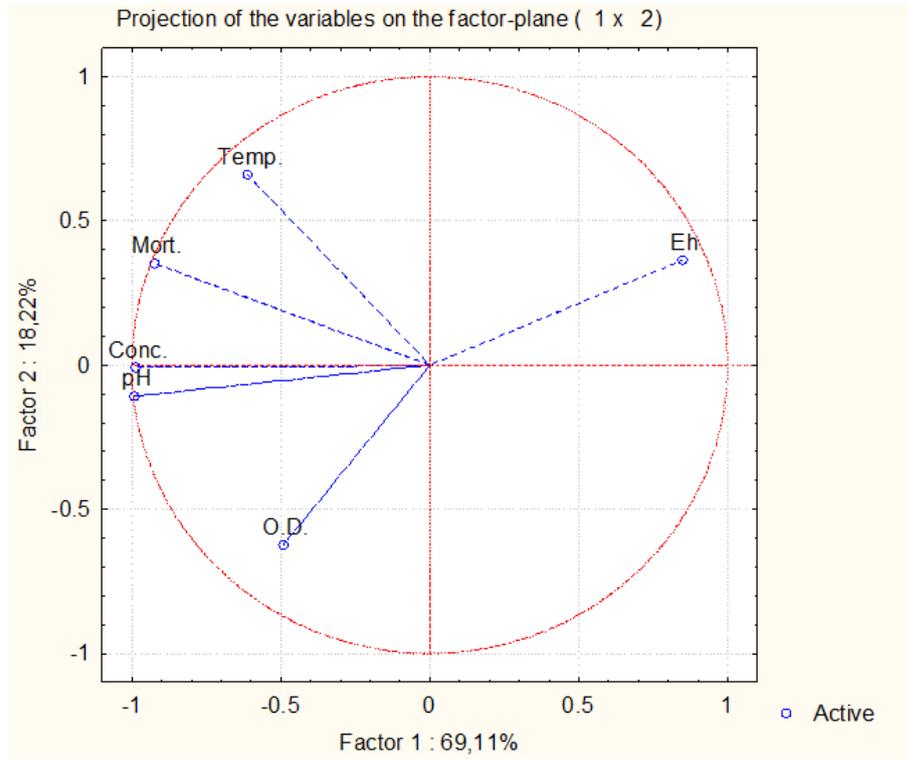
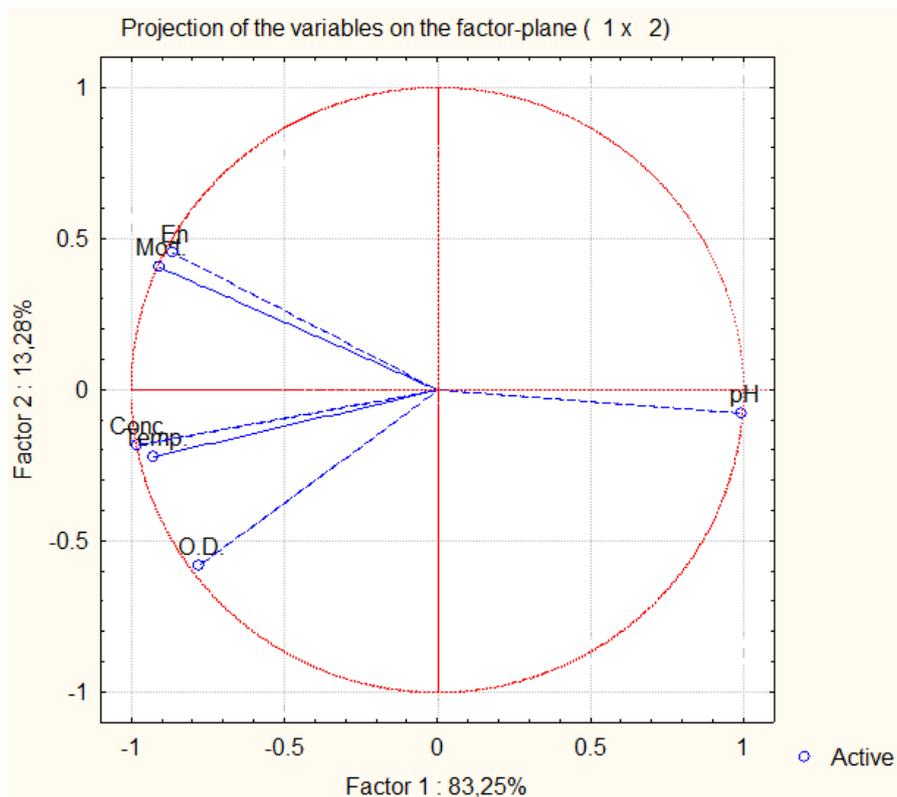
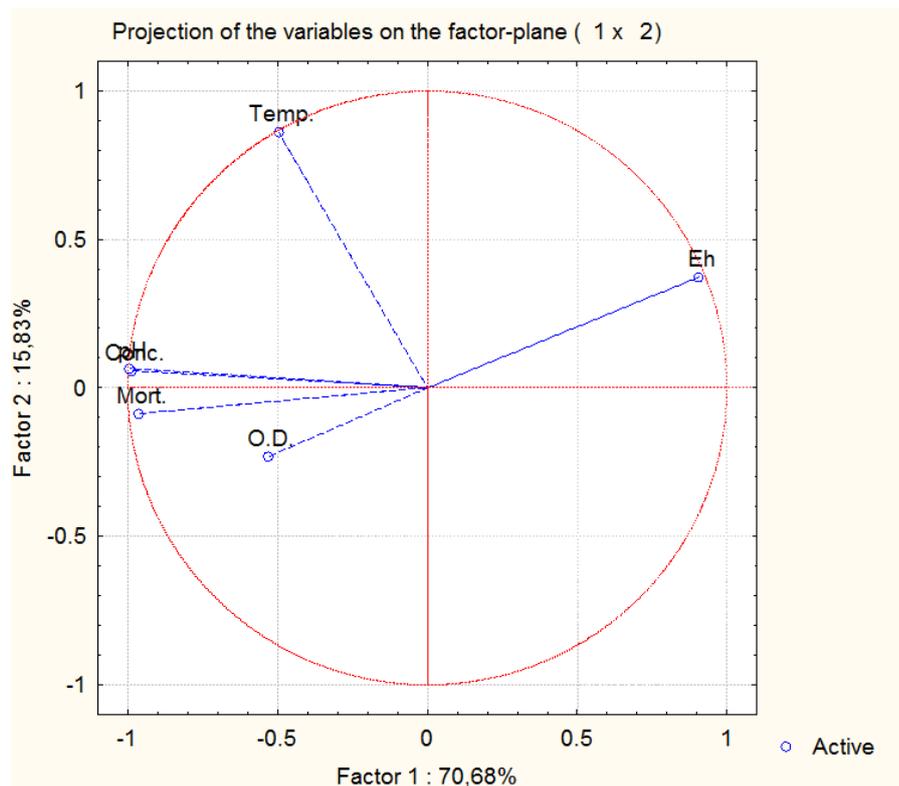


Figura 5.12 - Representação gráfica dos eixos principais (1 e 2) da análise de componentes principais da matriz de correlação (diluições percentuais, mortalidade e parâmetros físico-químicos) para a concentração de sedimento 200 mg/L



O gráfico representativo da Análise de Componentes Principais relacionado à concentração de 200 mg/L mostra mais uma vez uma correlação forte e positiva entre os fatores de toxicidade, sendo o pH o parâmetro que exerce uma influência inversa para o resultado, conforme apresentado na tabela de Correlação de Pearson. Os fatores de toxicidade (concentração e mortalidade) mais uma vez mostram-se próximos à temperatura e oxigênio dissolvido como fatores de forte influência para os resultados.

Figura 5.13 - Representação gráfica dos eixos principais (1 e 2) da análise de componentes principais da matriz de correlação (diluições percentuais, mortalidade e parâmetros físico-químicos) para a concentração de sedimento 300 mg/L



A análise de componentes principais permitiu a representação dos dados em uma área bivariada. Para as análises toxicológicas considerando a concentração de sedimento de 50 mg/L, os dois eixos principais – Fator 1 e 2, explicam 87,33% da variância total (18,22% e 69,11%). Para a concentração de sedimento de 200 mg/L, 96,53% da variância total dos dados são explicadas pelos dois primeiros fatores (83,25% e 13,28%) e em 300 mg/L, a variação de 86,51% dos dados é explicada pelo fator 1 e 2 em 70,68% e 15,83%, respectivamente.

Nesta representação gráfica do ensaio correspondente a concentração de sedimento de 300 mg/L é possível corroborar a relação negativa entre o potencial de oxi-redução, e a correlação positiva entre os fatores de toxicidade (diluição percentual e mortalidade) e os outros parâmetros monitorados, verificada através da correlação de Pearson. Mais uma vez, o oxigênio dissolvido foi considerado um fator de baixa influência para a análise.

Estes resultados corroboram as relações encontradas entre os parâmetros físico-químicos e fatores de toxicidade verificados em estudos anteriores (AMARAL, 2012) onde a toxicidade apresentou forte relações com a sensibilidade aos parâmetros físico-químicos, observando uma correlação negativa entre o pH e a demanda bioquímica de oxigênio.

Com relação aos fatores de explicabilidade do teste, os autovalores (*eigenvalues*) representam a razão da variação entre os grupos pela variação dentro dos mesmos, considerando que quanto mais distante de 1, maior será a variação entre os grupos explicada pela função discriminante (Tabelas 5.9, 5.10, 5.11).

Tabela 5.9 - Autovalores (*eigenvalues*), percentual total de variância e acumulados referentes aos fatores de explicabilidade encontrados para a matriz de correlação para a concentração de sedimento 50 mg/L

	Autovalores	% total da variância	Autovalor acumulado	% acumulada
Componente 1	4,146636	69,11060	4,146636	69,1106
Componente 2	1,093035	18,21725	5,239671	87,3279
Componente 3	0,760329	12,67215	6,000000	100,0000

Tabela 5.10 - Autovalores (*eigenvalues*), percentual total de variância e acumulados referentes aos fatores de explicabilidade encontrados para a matriz de correlação para a concentração de sedimento 200 mg/L

	Autovalores	% total da variância	Autovalor acumulado	% acumulada
Componente 1	4,995278	83,25463	4,995278	83,2546
Componente 2	0,796805	13,28009	5,792083	96,5347
Componente 3	0,207917	3,46528	6,000000	100,0000

Tabela 5.11 - Autovalores (*eigenvalues*), percentual total de variância e acumulados referentes aos fatores de explicabilidade encontrados para a matriz de correlação para a concentração de sedimento 300 mg/L

	Autovalores	% total da variância	Autovalor acumulado	% acumulada
Componente 1	4,146636	69,11060	4,146636	69,1106
Componente 2	1,093035	18,21725	5,239671	87,3279
Componente 3	0,760329	12,67215	6,000000	100,0000

Através da análise das Tabela 5.9, 5.10 e 5.11 é possível discriminar os três principais fatores que contribuem para o total da variância entre os parâmetros, sendo a primeira componente a que tem efetivamente o maior poder de separação intergrupala.

Considerando os diversos processos que se combinam para conduzir o resultado observado, é possível associar a toxicidade observada em amostras de superfície com resultados demonstrados em relatos anteriores. Estudos avaliaram a persistência do óleo e a resposta do ecossistema após quatorze anos decorridos do acidente com o navio petroleiro Exxon Valdez e concluíram que os compostos derivados do óleo em superfície persistiram em quantidades surpreendentes na sua forma mais tóxica, estando suficientemente biodisponível para induzir exposições biológicas crônicas, e que os impactos estão estritamente associados com a existência de sedimentos superficiais (PETERSON et al. 2003).

Assim sendo, as concentrações residuais de compostos químicos tóxicos na superfície somado à existência de sedimento superficial induz efeitos indiretos nas cadeias tróficas e de interação transmitindo impactos que vão muito além da mortalidade aguda.

5.4 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou avaliar o caráter tóxico potencial da formação do OSA a partir de três experimentos de simulação em microescala utilizando como organismo-teste o microcrustáceo *Artemia salina*. Para tanto foi realizado um estudo comparativo com três diferentes concentrações de sedimento a partir da diluição percentual de sua fase aquosa em frações de superfície e fundo.

A concentração que apresentou maior potencial tóxico foi a de 200 mg/L, apresentando valores iguais para superfície e fundo (CL50 7,91%). Já a concentração com menor potencial tóxico foi a de 300 mg/L (CL50 31,5) para amostras de superfície.

Foi observada a relação negativa entre o potencial de oxi-redução e o potencial hidrogeniônico (apenas em amostras com 200 mg/L de sedimento) e os outros parâmetros estudados. E foi verificada a correlação positiva entre os fatores de toxicidade (diluição percentual e mortalidade) e os outros parâmetros monitorados.

Dada a complexidade e a variabilidade dos hidrocarbonetos e compostos insolúveis em água, é necessário destacar a importância da relação das análises de toxicidade juntamente com o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, uma vez que os limites de confiança dos efeitos não são muito pequenos e em um dos ensaios não puderam ser calculados.

REFERÊNCIAS:

- AJIJOLAIYA, L.O. **The Effects of Mineral Size and Concentration on the Formation of Oil-Mineral Aggregates**. 2004. 80f. Master Thesis, Department of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Dalhousie University, Halifax, Canada, 2004.
- AMARAL, K. G. C. **Correlação entre fator de toxicidade e parâmetros físico-químicos para efluentes domésticos tratados**. 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.
- BARRAGAN, O. L. V. **Caracterização geoquímica de óleos da América Latina**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) - Programa de pós-graduação em Geoquímica, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.
- BAUMGARTEN, M. G. Z.; ROCHA, J. M. B ; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em Oceanografia Química**. Rio Grande: Editora da FURG, 1996. 132 p.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 764p.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- FIORUCCI, A. R. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, n. 22, p. 10 – 16, nov. 2005.
- ITOPF. **Fate of Marine Oil Spills**: Technical Information Paper. London, UK. n 2, 2011. Disponível em: < <http://www.itopf.com/information-services/publications/documents/tip2fateofmarineoilspills.pdf> >. Acesso em: 10 dez. 2013.
- KHELIFA, A.; AJIJOLAIYA, L.O.; MACPHERSON, P.; Lee, K.; HILL, P.S.; GHARBI, S.; BLOUIN, M. **Validation of OMA Formation in Cold Brackish and Sea Waters**. In: PROCEEDINGS OF THE TWENTY-EIGHTH ARCTIC AND MARINE OILSPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR, ENVIRONMENT. Canada, Ottawa, Ontario, p. 527-538, 2005b.
- KHELIFA, A.; P.S. HILL; K. LEE. **A stochastic model to predict the formation of Oil-Mineral Aggregates**. In: PROCEEDINGS OF THE TWENTY-SIXTH ARCTIC AND MARINE OILSPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR. Environment Canada, Ottawa, Ontario, vol. 2, p. 893-909, 2003.
- KHELIFA, A.; P.S. HILL; K. LEE. **Modelling the effect of sediment size on OMA formation**. In: PROCEEDINGS OF THE TWENTY-SEVENTH ARCTIC AND MARINE OILSPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR, Environment Canada, Ottawa, Ontario, vol. 1, p. 383-396, 2004.

KHELIFA, A.; P.S. HILL; P. STOFFYN-EGLI; K. LEE. Effects of salinity and clay composition on Oil-Clay Aggregations. **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 235-254, 2005a.

KRUMBEIN, W. C.; SLOSS, L. L. Stratigraphy and sedimentation. **Soil Science**, v. 71, n. 5, p. 329-401, 1951.

LE FLOCH, S.; GUYOMARCH, J.; MERLIN, F.X.; STOFYN-EGLI, P.; DIXON, J.; LEE, K. The influence of salinity on oil–mineral aggregate formation. **Spill Science e Technology Bulletin**, v.8, n. 1, p. 65–71, 2002.

LEACH, W.E. Entomostraca, **Dictionnaire des Science Naturelles**, v. 14, pág. 524. 1819.

LEE, K.; P. STOFFYN-EGLI; G.H. TREMBLAY; E.H. OWENS; G.A. SERGY; C.C. GUENETTE; R.C. PRINCE. Oil–Mineral Aggregate formation on oiled beaches: natural attenuation and sediment relocation. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, n. 3, p. 285-296, 2003.

LEE, K.; STOFFYN-EGLI P. **Characterization of Oil-Mineral Aggregates**. In: PROCEEDINGS OF THE 2001 INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE. American Petroleum Institute, Washington, D.C., p. 991-996, 2001.

LEE, K.; STOFFYN-EGLI, P.; WOOD, P.A.; LUNEL, T. **Formation and structure of Oil-Mineral Fines Aggregates in coastal environments**. In: PROCEEDINGS OF THE TWENTY-FIRST ARCTIC AND MARINE OILSPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR. Environment Canada, Ottawa, Ontario, pp. 911-921, 1998.

MUSCHENHEIM, D.K.; LEE, K. Removal of oil from the sea surface through particulate interactions: review and prospectus, **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 9-18, 2002.

NIZOLI, É. C.; LUIZ-SILVA, W. The role of acid volatile sulfide in the control of potential metal bioavailability in contaminated sediments from a tropical estuary, southeast Brazil. **Quím. Nova**. v. 32, n. 2, p. 365-372, 2009.

NUNES, B. S.; CARVALHO F. D.; GUILHERMINO L. M.; STAPPEN G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Polution**, v. 144, p. 453-462, 2006.

OMOTOSO, O. E.; MUNOZ, V.A.; MIKULA, R.J. Mechanisms of crude oil–mineral interactions, **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 45–54, 2002.

OWENS, E.H. The interaction of fine particles with stranded oil. **Pure Appl. Chem.**, vol. 71 (1), p. 83-93, 1999.

OWENS, E.H.; LEE, K. Interaction of oil and Mineral fines on shorelines: review and assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, p. 397-405, 2003.

PAYNE, J. R.; CLAYTON J. R.; KIRSTEIN, B.E. Oil/Suspended particulate material interactions and sedimentation. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 201-221, 2003.

PETERSON C. H.; RICE S. D.; SHORT J. W.; ESLER D.; BODKIN J. L.; BALLACHEY B. E. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. **Science**, v. 302, p. 2082–2086. 2003.

PINA, P.; BRAUNSCHWEIG, F.; SARAIVA, S.; SANTOS, M.; MARTINS, F.; NEVES, R. A importância dos Processos Físicos no controlo da Eutrofização em Estuários. **Sapientia**. Algarve, 2003. Disponível em < <http://hdl.handle.net/10400.1/40> >. Acesso em: 04 abr. 2012.

QUEIROZ, A. F. de S.; CELINO, J. J. Manguezais e Ecossistemas estuarinos na Baía de Todos os Santos. In: QUEIROZ, A. F. DE S.; CELINO, J. J. **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador - BA: EDUFBA, 2008. p. 39–58.

SORGELOOS, P.; VAR DER WILEN C.; PERSOONE, G. The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests – a critical analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 2, p. 249-255, 1978.

STOFFYN-EGLI, P., LEE, K. Formation and characterization of oil–mineral aggregates. **Spill Science e Technology Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 31 – 44, 2002.

SUN, J.; ZHENG, X. A review of oil suspended particulate matter aggregation a natural process of cleansing spilled oil in the aquatic environment. **Journal of environmental monitoring : JEM**, vol. 11, p. 10, 1801–1809. 2009.

VEIGA, L.F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil**. São Paulo, p. 111-119. 2002.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou avaliar o caráter tóxico potencial da formação do OSA a partir de experimentos de simulação em microescala utilizando como organismo-teste o copépode bentônico *Nitokra* sp., realizando um estudo comparativo com a toxicidade encontrada para elutriato formado a partir da diluição percentual de óleo e sedimento. Além disso, foi realizada também a descrição do caráter tóxico potencial da formação do OSA a partir de três experimentos de simulação em microescala utilizando como organismo-teste o microcrustáceo *Artemia salina* realizando um estudo comparativo com três diferentes concentrações de sedimento (50, 200, 300 mg/L), a partir da diluição percentual de sua fase aquosa em frações de superfície e fundo.

Com relação aos objetivos alcançados no primeiro estudo, foi possível verificar que, referente ao potencial tóxico para o cópepode *Nitokra* sp. em salvaguardo das diferentes características intrínsecas de cada amostra, a porção aquosa concentrada da simulação de formação de OSA em microescala mostrou-se consideravelmente menos tóxica (CL₅₀ 70,71%) do que o elutriato formado a partir das diluições percentuais do sedimento com óleo (CL₅₀ 5,59%). Também foi visto que, entre as correlações que determinam o poder explicativo da influência das variáveis monitoradas, destacam-se as correlações fortes e positivas entre os fatores de toxicidade (concentração e mortalidade) em contraposição ao oxigênio dissolvido, que demonstrou correlação forte e negativa.

No segundo estudo, verificou-se que a concentração de sedimento que apresentou maior potencial tóxico para o microcrustáceo *Artemia salina* nos experimentos de simulação de microescala foi a de 200 mg/L apresentando valores semelhantes para superfície e fundo (CL₅₀ 7,91%), já a concentração com menor potencial tóxico foi a de 300 mg/L (CL₅₀ 31,5%) para amostras de superfície. Foi observada a relação negativa entre o potencial de oxi-redução e o potencial hidrogeniônico (apenas em amostras com 200 mg/L de sedimento) e os outros parâmetros estudados, e a correlação positiva entre os fatores de toxicidade (diluição percentual e mortalidade) e os outros parâmetros monitorados.

Dada a complexidade e a variabilidade dos hidrocarbonetos e compostos insolúveis em água, é necessário destacar a importância da relação das análises de toxicidade juntamente com o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, uma vez que os limites de confiança dos efeitos não são muito pequenos e em um dos ensaios não puderam ser calculados.

Com esta pesquisa, buscou-se desenvolver uma metodologia para análises de toxicidade que permitisse fornecer subsídios para bases toxicológicas para o futuro

desenvolvimento de um protocolo que determine uma potencial metodologia de avaliação toxicológica provendo embasamento a aplicação do OSA em áreas impactadas por atividades petrolíferas, abrangendo diversas situações que possuirão efeitos relevantes, tanto ao longo da sua implementação como da sua execução. Pode-se ressaltar também o desenvolvimento de uma metodologia peculiar e específica que irá contribuir com as atuais técnicas de remediação; a determinação dos melhores critérios para caracterização dos agregados óleo-material em suspensão (OSA) como um dispersante natural e eficiente no processo de recuperação ambiental e biomonitoramento ecológico.

A relevância tecnológica parte do princípio de que não foi detectado nenhum protocolo, procedimento ou metodologia que esteja relacionada à determinação das potenciais condições toxicológicas relacionadas à formação do OSA em áreas de manguezal impactadas por petróleo no Brasil. Foram sugeridos então procedimentos metodológicos que descrevem a realização de testes toxicológicos referente à sua aplicação que não é disponibilizado em nenhuma metodologia existente e seu reconhecimento se consolidará como mecanismo a ser amplamente estudado devido à sua eficiência e rapidez de resposta à derramamentos de petróleo.

As extensões de manguezal e unidades de conservação que podem ser afetadas por possíveis acidentes envolvendo derramamento de óleo no município de Canavieiras, litoral Sul da Bahia, foram alvo dos estudos realizados no presente Projeto, que, ao consolidar as definições toxicológicas do Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão pode ajudar a reconhecê-lo como mecanismo que facilite a remediação desses impactos ecológicos. As regiões de pesca artesanal, empreendimentos turísticos, além da RESEX de Canavieiras, representam importantes compartimentos sociais desse local, que também serão positivamente influenciados pelos resultados promovidos por esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABÍLIO, F. J. P.; RUFFO, T. L. M.; SOUZA, A. H. F. F.; FLORENTINO, H. S.; OLIVEIRA-JUNIOR, E. T.; MEIRELES, B. N.; SANTANA, A. C. D. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecologia Brasiliense**, v. 11, n. 3, p. 397-409, 2007.

AJIJOLAIYA, L. O., HILL, P. S., KHELIFA, A., ISLAM, R. M., LEE, K., Laboratory investigation of the effects of mineral size and concentration on the formation of oil–mineral aggregations. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 920–927, 2006.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, Port City Press, cap. 1, p. 34-38, 2001.

ARAÚJO, R. J. V.; ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P. **Teste de sensibilidade de *Tisbe biminiensis* ao Dodecil Sulfato de Sódio**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 9, 2006, São Pedro - SP, **Anais...** São Paulo: USP, 2006.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. **Padronização e aplicação do copépodo marinho *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos**. 104f. 2008. Tese (Doutorado em Oceanografia) - Programa de Pós-Graduação em Oceanografia. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; TORREIRO, A. G. A. G.; GARCIA, K. S. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 57, p. 33-41, 2009.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; ROCHA, J. M. B.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em Oceanografia Química**, Rio Grande: Editora da FURG, 1996. 132 p.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 764p.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 269 de 14 de Setembro de 2000.

BRITO, E. M.S.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; OTEYZA, T. G.; CRAPEZ, M. A. C.; ALELUIA, I.; WASSERMAN, J. C.A. A case study of *in situ* oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 418-423, 2009.

CASTRO, P. A. R. **Monitoramento ecotoxicológico em sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2009.

COSTA, B. V. M. **Efeito do peneiramento sobre a toxicidade de sedimento contaminado por óleo submetido a tratamentos de biorremediação**. 2010. 60p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**. v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRUZ, J. F.; TRIGÜIS, J. A.; QUEIROZ, A. F. S. **Avaliação da efetividade versus efeitos de surfactantes em simulações de derrame de óleo no mar**. In: RIO OIL & GAS EXPO AND CONFERENCE, 2012. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2012

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. SILVA, F. C. da coord. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 370p.

FERRAZ, M. A.; ZARONI, L. P.; BERGMANN FILHO, T.U.; GASPARRO, M. R. SOUSA, E. C. P. M. **Taxa de eclosão de ovos do copépodo *Nitokra* sp. em diferentes salinidades**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11, 2010. Bombinhas, Santa Catarina. **Anais...** Bombinhas, Santa Catarina. 2010.

FIORUCCI, A. R. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, n. 22, p. 10–16, 2005.

FOLK, R.L. & WARD, W.C. Brazos river bar: a study of significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 27, p. 3-26, 1957.

FURLEY, T. H.; VITALI, M. M.; SOBREIRA, R. G.; ZARONI, L. P. **Sensibilidade aguda do copépodo *Nitokra* sp. ao sulfato de zinco em diferentes salinidades**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11, 2010. Bombinhas, Santa Catarina. **Anais...** Bombinhas, Santa Catarina. 2010.

GARCIA, K. S. **Biodisponibilidade e toxicidade de contaminantes em sedimentos na porção nordeste da Baía de Todos os Santos**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Geociências - Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution - Impact of Oil and Related Chemicals and Wastes on the Marine Environment. **GESAMP Reports and Studies**, n. 50, 1993.

GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. **Methods of Seawater Analysis** 3ed. Florida: Verlage Chemie. 1999. 417p.

GUYOMARCH, J.; LE FLOCH, S.; MERLIN, F. Effect of Suspended Mineral Load, Water Salinity and Oil Type on the Size of Oil–Mineral Aggregates in the Presence of Chemical Dispersant. **Spill Science e Technology Bulletin**, v. 8, p. 95-100, 2002.

ITOPF. Fate of Marine Oil Spills. **Technical Information Paper**. London, UK. n 2, 2011. Disponível em: < <http://www.itopf.com/information-services/publications/documents/tip2fateofmarineoilspills.pdf> >. Acesso em 10 dez. 2013.

JENNERJAHN, T. C.; ITTEKKOT, V. Organic matter in sediments in the mangrove areas and adjacent continental margins of Brazil: I. Amino acids and hexoamines. **Oceanologica Acta**, v. 20, n. 2, p. 359 – 369, 1996.

KHELIFA, A.; HILL, P. S.; STOFFYN-EGLI, P.; LEE, K. Effects of salinity and clay type on oil-mineral aggregation. **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 235–254, 2005.

KHELIFA, A. B.; FIELDHOUSE, Z.; WANG, C.; YANG, M. L.; FINGAS, M. L.; BROWN, C. E.; GAMBLE, L. A laboratory study on formation of Oil-SPM Aggregates using the NIST Standard Reference Material 1941b. In: ARCTIC AND MARINE OILSPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR, 30. 2007. **Proceedings...**, Ottawa, Ontario: Environment Canada, v. 1, p. 35-48. 2007.

KUSK, K. O.; WOLLENBERGER, L. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 183–195, 2007.

LEACH, W. E. Entomostraca, **Dictionnaire des Science Naturelles**, 14, pág. 524. 1819.

LE FLOCH, S.; GUYOMARCH, J.; MERLIN, F.X.; STOFFYN-EGLI, P.; DIXON, J.; LEE, K. The influence of salinity on Oil–Mineral Aggregate formation. **Spill Science e Technology Bulletin**, v. 8, n. 1, p.65–71, 2002.

LEE, K.; STOFFYN-EGLI, P. Characterization of oil–mineral aggregates. In: INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE. 2001. **Proceedings...** Washington, DC: American Petroleum Institute, p. 991–996, Publication Number 14710, 2001.

LEE, K.; STOFFYN-EGLI, P.; OWENS, E. H. The OSSA II pipeline oil spill: Natural mitigation of a riverine oil spill by oil–mineral aggregate formation. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 7, p.149–154, 2002.

LOTUFO, G. R.; ABESSA, D.M. S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil**. São Paulo, 2002. p. 151-162.

MANÇÚ, R. J. S.; MONTEIRO, A. O.; BRUNI, E. L. A gestão ambiental na produção de petróleo no estado da Bahia: um comparativo entre a aderência das práticas de gestão ambiental de uma empresa nacional e uma estrangeira às normas internacionais. In: COLLOQUE DE L'IFBAE, 5. Grenoble, 2009.

MORAES, R. B. C.; CRAPEZ, M. A. C.; PFEIFFER, W. C.; FARINA, M.; BAINY, A. C. D. (Org.); TEIXEIRA, V. L. (Org.). **Efeito de poluentes em organismos marinhos**. 1. ed. São Paulo: Arte Ciência Villipress, 2001, v. 1. 285 p.

MOREIRA, I. T. A. **Investigação de possíveis impactos ecológicos do petróleo sobre comunidades biológicas estuarinas na Baía de Todos os Santos e no Sul da Bahia: OSA como uma ferramenta norteadora**. 2014. 265f. Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil.** São Paulo: Artes Gráficas e Ind. Ltda, 2002. 262 p.

NIU, H.; LI, Z.; LEE, K.; KEPKAY, P.; MULLIN, J. V. Modelling the transport of Oil–Mineral-Aggregates (OMAs) in the marine environment and assessment of their potential risks. **Environmental Modeling e Assessment**, v. 16, p. 61-75, 2011.

NUNES, B. S.; CARVALHO F. D.; GUILHERMINO L. M.; STAPPEN G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462. 2006.

OLIVEIRA, D. D. **Avaliação da sensibilidade do copépodo *Tisbe biminiensis* para testes toxicológicos em água e sedimentos estuarinos.** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

OWENS, E. H., LEE, K. Interaction of oil and mineral fines on shorelines: review and assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v.47, p. 397–405. 2003.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; COURSEIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e Avaliação de risco do Petróleo.** Série de Cadernos de Referência Ambiental: CRA, Salvador. v. 12, 2002, 246 p.

PETROBRAS E. e P. **Modelagem do transporte e dispersão de óleo no mar para o Bloco BMJ-1 Bacia de Jequitinhonha,** Nov. 2007.

PIMENTEL, F. P. **Análise de estratégias de respostas a derramamento de óleo no campo de Golfinho (ES – Brasil) utilizando o modelo Oscar.** 2007. 109 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

PINA, P.; BRAUNSCHWEIG, F.; SARAIVA, S.; SANTOS, M.; MARTINS, F.; NEVES, R. A importância dos Processos Físicos no controlo da Eutrofização em Estuários. **Sapientia.** Algarve, 2003. Disponível em < <http://hdl.handle.net/10400.1/40> >. Acesso em: 04 abr. 2012.

QUEIROZ GALVÃO PERFURAÇÕES S. A. **Atividade de Perfuração Marítima no Bloco BM-J-2: Estudo de Impacto Ambiental – EIA,** Item II-9, Fev. 2006.

QUEIROZ, A. F. de S.; CELINO, J. J. Manguezais e Ecossistemas estuarinos na Baía de Todos os Santos. In: QUEIROZ, A. F. DE S.; CELINO, J. J. **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos.** Salvador - BA: EDUFBA, 2008. p. 39–58.

QUEIROZ, A. F. S.; CELINO, J. J. Impacto ambiental da indústria petrolífera em manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos (Bahia, Brasil). **Boletim Paranaense de Geociências**, n. 62-63, p. 23-34, 2008.

RODRIGUES, A. J. C. **Caracterização de agregados de Óleo-Partícula Mineral: procedimentos para aceleração da remediação de derrames de petróleo em ambientes costeiros.** 2011. 54f. Monografia (Graduação em Geologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

SAMPAIO, S. C.; SILVESTRO, M. G.; FRIGO, E. P.; BORGES, C. M. relação entre série de sólidos e condutividade elétrica em diferentes águas residuárias. **Irriga**, v. 12, n. 4, p. 557-562, 2007.

SANTOS, D. R. **Investigação da interação Óleo-mineral agregado (OMA) em ambientes costeiros sob influência de diferentes salinidades: subsídio a procedimentos de remediação de derrames de petróleo.** 2010. 59f. Monografia (Graduação em Geologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SANTOS, J. M. N. **Utilização de invertebrados bentônicos em ecotoxicologia sedimentar.** 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) - Universidade de Aveiro, Portugal, 2009.

SANTOS, L. C.; CUNHA-LIGNON, M.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CITRÓN-MORELO, G. Long-term effects of oil pollution in mangrove forests (Baixada Santista, Southeast Brazil) detected using a GIS-Based multitemporal analysis of aerial photographs. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, p. 161-172, 2012.

SANTOS, P. S.; MARQUES, A. C.; ARAÚJO, M. **Remanescentes da vegetação litorânea na região sudeste da Bahia – municípios de Una e Canavieiras.** In: GIS BRASIL: 2ª MOSTRA DO TALENTO CIENTÍFICO, 2, Curitiba, 2002. **Anais...** Curitiba, 2012.

SCHMIDT, A. J.; OLIVEIRA, M. A. e colaboradores – **Plano de ação para o caranguejo-uçá em Canavieiras.** 96p. Projeto ALMA – Ambientes Litorâneos da Mata Atlântica, Projeto Ecotuba, Ilha de Comandatuba, BA, Brasil, 2006.

SERGY, G. A.; GUÉNETTE, C. C.; OWENS, E. H.; PRINCE, R. C.; LEE, K. In-situ Treatment of Oiled Sediment Shorelines. **Spill Science e Technology Bulletin**, v. 8, n. 3, p. 237–244, 2003.

SORGELOOS, P.; VAR DER WILEN C.; PERSOONE, G. The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests – a critical analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 2, p. 249-255, 1978.

SOUSA, E. C. P. M.; ZARONI, L. P.; FILHO T. U. B.; MARCONATO, A. A.; KIRSCHBAUM, A. A.; GASPARRO, M. R. Acute sensitivity to *Nitokra* sp benthic copepod to potassium dichromate and ammonia chloride. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 7, n. 1, p. 75-81 2012.

STOFFYN-EGLI, P., LEE, K. Formation and characterization of oil– mineral aggregates. **Spill Science e Technology Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 31 – 44, 2002.

SUN, J.; ZHENG, X. A review of oil suspended particulate matter aggregation a natural process of cleansing spilled oil in the aquatic environment. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 11, n. 10, p. 1801–1809. 2009.

TRINDADE, M. C. L. F.; OLIVEIRA, O. M. C.; MOREIRA I. T. A.; QUEIROZ, A. F. S.; SILVA, C. S.; RIOS M. C. **Formação e caracterização de agregado óleo-mineral em diferentes energias hidrodinâmicas: importante papel na remoção natural de derrames**

de petróleo. In: RIO OIL & GAS EXPO AND CONFERENCE, 2012. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2012

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Testing Manual EPA-821-R-02-012 - Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.** Out. 2002. Disponível em: < http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007_07_10_methods_wet_disk2_atx1-6.pdf >. Acesso em 10 Jan 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Testing Manual 503/8-91/001 - Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal.** 1991. Fev 1991. Disponível em: < <http://water.epa.gov/type/oceb/oceandumping/dredgedmaterial/upload/gbook.pdf> >. Acesso em 10 Dez 2013.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Testing Manual EPA-823-B-01-002 - Methods for Collection, Storage, and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses.** Oct 2001. Disponível em: < <http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/upload/collectionmanual.pdf> >. Acesso em 04 Fev 2014.

VEIGA, L.F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil.** São Paulo: Artes Gráficas e Ind. Ltda, 2002. 262 p.

VENTURINI, E.; TOMMASI, L. R.; BÍCEGO, M. C.; MARTINS, C. C. Characterization of the benthic environment of a coastal area adjacent to an oil refinery, Todos os Santos bay (ne-Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52, n. 2, p. 123 – 134, 2004.

VOLKMANN-ROCCO, B. *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) new species of the gracilis group. **Archives Oceanography Limnology**, v. 8, p. 71-90, 1973.

WALKEY-BLACK, A. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. **Soil Science**, v. 63, p. 251- 263, 1947.

WANG, W.; ZHENG, Y; LEE, K. Chemical dispersion of oil with mineral fines in a low temperature environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 72, p. 205 – 212, 2013.

WILLIAMS, T. D. Survival and development of copepod larvae *Tisbe battagliai* in surface microlayer water and sediment elutriates from the German Bight. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, p. 221–228, 1992.

WILLIAMS, T. D.; JONES, M. B. Effects of temperature and food quantity on postembryonic development of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida). **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 183, p. 283–298, 1994.

ZARONI, L. P.; BERGMANN FILHO, T.U.; FERRAZ, M. A.; GASPARRO, M. R. &SOUSA, E. C. P. M. **Taxa de eclosão de ovos do copépodo *Nitokra* sp. em diferentes**

tipos de sedimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11, 2010. Bombinhas, Santa Catarina. **Anais...** Bombinhas, Santa Catarina. 2010.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v.3, n. 2, p. 32-36, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Referencial teórico

Agregados Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA)

Agregados Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA) são entidades microscópicas compostas de óleo e minerais aglutinados que são estáveis durante grandes períodos em águas salobras e salinas (LE FLOCH et al., 2002). São formados muito facilmente no meio ambiente a partir da interação de partículas minerais finas e petróleo, sendo considerados efetivos dispersantes minerais (STOFFYN-EGLI; LEE, 2002).

O mais comum tipo de OSA é o agregado do tipo gotícula (*droplets*), onde uma única gota de óleo estabelece com partículas minerais ligados à sua superfície uma agregação. Às vezes, mais do que uma gota pode estar presente em um total de gotículas múltiplas. No tipo agregados sólidos (*solid*), minerais também estão presentes dentro do petróleo, constituindo formas não esféricas. Outro tipo são os membranosos (*flakes*) onde têm a aparência de estruturas membranosas sendo geralmente flutuantes, atingindo vários milímetros de comprimento. O OSA pode ser positivamente ou negativamente flutuante isto dependerá de sua relação de volume de óleo e mineral (LEE; STOFFYN-EGLI, 2001; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002).

Estudos sugerem que esses agregados são afetados por diversos fatores, como características do óleo e do sedimento (mineralogia, granulometria, conteúdo de matéria orgânica), turbulência, salinidade e temperatura (AJJOLAIYA et al., 2006; KHELIFA et al., 2002; 2005; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002). A formação do OSA foi considerada como um processo de limpeza natural de costas com óleo, pois ela aumenta a taxa de dispersão e de biodegradação do óleo, além de impedir que este volte a aderir no sedimento (LEE, et al., 1997; OWENS, 1999).

Dentre os diversos fatores ambientais que determinam a formação deste agregado alguns principais merecem destaque. O efeito da temperatura na formação do OSA é essencialmente resultado da modificação da viscosidade do óleo, estabelecendo uma relação inversa. Baixas temperaturas diminuem a formação do OSA, visto que a viscosidade aumenta com o decréscimo da temperatura (OWENS; LEE, 2003; KHELIFA et al., 2002). O tipo de sedimento em suspensão, sua concentração, granulometria e composição mineralógica também representam fatores que controlam a taxa de formação e formato do OSA (AJJOLAIYA et al., 2006; GUYOMARCH et al., 2002; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002).

A energia do ambiente também representa um fator fundamental que limita a formação do OSA. O nível e duração da energia turbulenta do ambiente, associado à ação das ondas e correntes, é um fator chave na formação dos agregados aumentando a sua taxa de formação. A quebra da tensão superficial da mancha de óleo acelera a formação de gotículas, a alta energia age como indutor da ressuspensão do sedimento e manutenção deste na coluna d'água, promovendo colisões entre as gotículas de óleo e o sedimento (SERGY et al., 2003; NIU et al., 2010).

A salinidade possui forte efeito sobre as características das gotas de óleo estabilizadas por minerais, sendo um pré-requisito para flocculação entre óleo e material particulado em suspensão. As concentrações de gotículas de óleo aumentam rapidamente com a elevação da salinidade. Há uma salinidade de agregação crítica em que se encerra o rápido aumento da formação do OSA e as gotículas estabilizadas atingem seu valor máximo (OWENS; LEE, 2003).

No Brasil, estudos vêm sendo realizados com o intuito de caracterizar e adequar o uso dessa técnica para as condições específicas locais. Entre os principais estudos, podemos destacar a pesquisa realizada por Santos (2010) que objetivou compreender o efeito da salinidade na formação de OSA em áreas estuarinas da Baía de Todos os Santos, através de ensaios a nível laboratorial. Esses estudos concluíram que a degradação de óleo é favorecida pela formação de OSA, e torna-se aplicável tanto às águas marinhas, quanto às estuarinas.

Rodrigues (2011) também desenvolveu estudos, também a nível laboratorial, que permitiram subsidiar a utilização do OSA, facilitando o entendimento da formação deste agregado a partir da exposição a diferentes frações granulométricas do sedimento, e como estes interferem na sua formação. Esse autor concluiu que, em ambientes tropicais marinhos e estuarinos de sedimento com características granulométricas areia, silte e argila, a formação de OSA poderá favorecer a degradação de óleos derramados tanto em águas marinhas quanto em estuarinas e depende fortemente da presença de argilominerais associados.

Correlacionando as diferentes energias hidrodinâmicas e assembleias mineralógicas, Trindade e colaboradores (2013) concluíram que a energia é um fator determinante na formação de OSA, sendo influenciado também pela composição mineralógica que define a variedade de tamanho e forma (tipo) dos agregados, a partir de simulações em laboratório.

Toxicologia

Pode-se definir os testes de toxicidade como ensaios laboratoriais, que realizados sob condições experimentais específicas e controladas, contribuem para estimar a toxicidade de diferentes substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Os ensaios toxicológicos baseiam-se na exposição de organismos-testes a diferentes concentrações da amostra que se pretende analisar, e os efeitos tóxicos exibidos são observados, descritos e quantificados. A descrição do efeito tóxico das substâncias analisadas em organismos marinhos e estuarinos é essencial para a manutenção da biodiversidade (NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

Os primeiros registros de testes de toxicidade com organismos aquáticos datam de 1920, sendo os peixes utilizados primeiramente. Nas décadas de 1940 e 1950, os trabalhos na área foram aumentando e outros métodos foram surgindo e as diferenças nas condições experimentais foram aparecendo. Os primeiros trabalhos relacionados à toxicologia ambiental incluíam testes de ação de pesticidas em insetos e testes de qualidade de água com cladóceros. Na década de 40 e 50 se iniciaram estudos de efeitos de substâncias químicas e de resíduos sobre o meio ambiente, e com eles a constatação de que estes testes precisavam ser padronizados (HUNN, 1989 apud NASCIMENTO; SOUZA; NIPPER, 2002).

De uma forma geral, os testes de toxicidade devem ser regulados por órgãos que desenvolvem protocolos de testes e normas técnicas. No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento destes protocolos é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também padronizada testes de toxicidade (Quadro 1). Outros órgãos internacionais como *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Water Work Association* (AWWA), *Deutsches Institut für Normung* (DIN), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD) também tem se concentrado no desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade, que definam limites de toxicidade que são permitidos, com níveis de incerteza aceitáveis, e que sirvam de referência para as entidades reguladoras para a tomada de decisões (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

Quadro 1 - Testes de toxicidade padronizados pela ABNT e CETESB

Organismo	Efeito	Espécie	Normas brasileiras
Bactéria	Agudo	<i>Vibrio fischeri</i>	CETESB, L5.22740
Bactéria	Agudo	<i>Spirillum volatans</i>	CETESB, L5.22841
Alga	Crônico	<i>Chlorella vulgaris; Scenedesmus subspicatus; Pseudokirchneriella subcaptata.</i>	CETESB, L5.02042 e ABNT NBR 1264843
Microcrustáceo	Agudo	<i>Daphnia smilis; Daphnia magna</i>	CETESB, L5.01844 e ABNT NBR 1271345
Microcrustáceo	Agudo	<i>Artemia salina</i>	CETESB, L5.02146
Microcrustáceo	Crônico	<i>Ceriodaphnia dubia; Ceriodaphnia silvestrii</i>	CETESB, L5.02247 e ABNT NBR 1337348
Peixe	Agudo	<i>Danio rerio; Pimephales promelias</i>	CETESB, L5.01949 e ABNT NBR 1508850

Fonte: adaptado de COSTA et al., (2008).

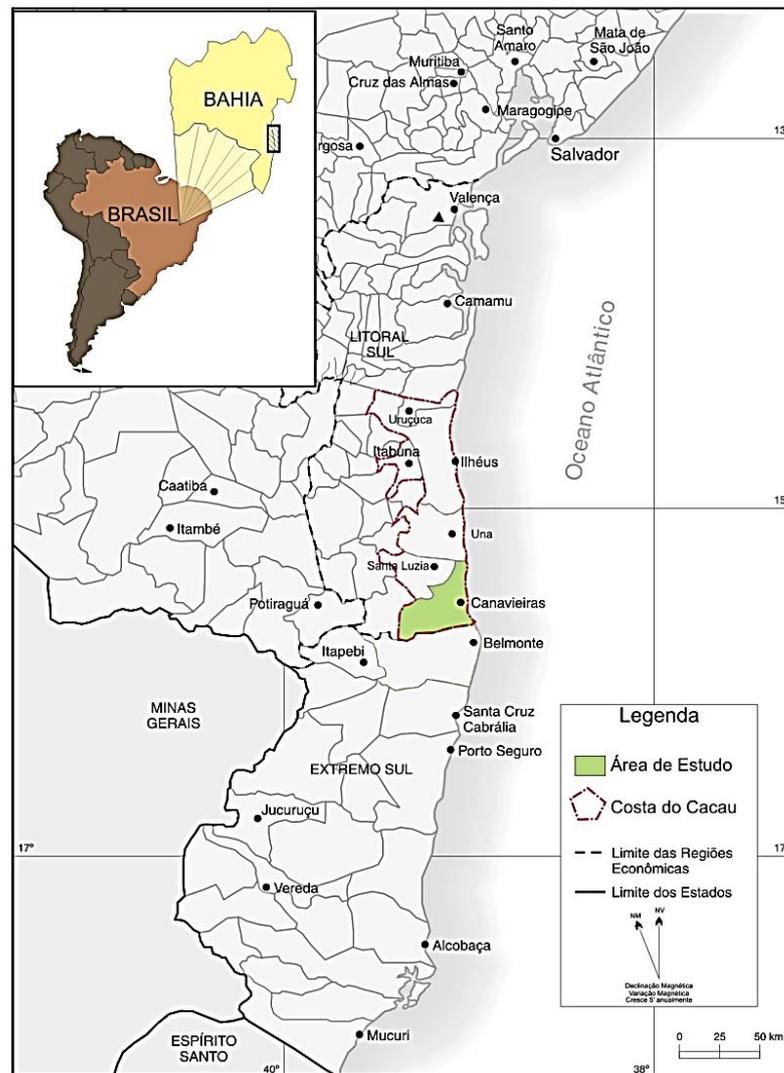
Os testes de toxicidade são classificados em agudos e crônicos. Os testes de toxicidade crônica servem para estimar os efeitos tóxicos de substâncias em condições de exposição prolongada a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que não limitem a sobrevivência dos organismos, mas que de alguma forma afetem suas funções biológicas em condições como mobilidade, reprodução, alimentação ou outras funções metabólicas. Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como CENO (Concentração de Efeito Não-Observado) ou CEO (Concentração de Efeito Observado), mas também podem ser expressos como CE₅₀ (Concentração Efetiva Média em 50% dos organismos) (ARAÚJO; ARAÚJO-CASTRO; SOUZA-SANTOS, 2006; KUSK; WOLLENBERGER, 2007; ARAÚJO-CASTRO, 2008; ARAÚJO-CASTRO et al., 2009; GARCIA, 2009; OLIVEIRA, 2011).

Os testes de toxicidade aguda são amplamente utilizados para medir os possíveis efeitos de substâncias tóxicas sobre determinadas espécies durante um curto período de tempo comparado ao período de vida do organismo-teste em questão. Avalia a dose ou concentração de um agente tóxico que permitiria produzir uma reação específica mensurável em um organismo-teste, em um período de tempo curto, geralmente de 24 à 96 h. O principal efeito mensurado em estudos de toxicidade aguda é a letalidade ou algum outro comportamento que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade. Os testes de toxicidade aguda admitem valores de CE₅₀ (Concentração Efetiva) e CL₅₀ (Concentração Letal). Os valores de concentrações efetivas e letais são sempre relacionados a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podendo ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA et al., 2008).

APENDICE B - Área de Estudo

O Município de Canavieiras (Figura 1) está situado na Região Sul do Estado da Bahia, a $15^{\circ} 41'$ latitude sul e $38^{\circ} 57'$ longitude oeste (SANTOS et al., 2002). Possui uma área de 1390 km^2 onde existem 7.404ha de manguezais economicamente explorados dentro da Reserva Extrativista (RESEX) de Canavieiras, que engloba maior parte da região estuarina (101.000ha), sustentando cerca de 37.000 habitantes (SCHMIDT et al., 2006).

Figura 1 - Mapa de localização da área de estudo



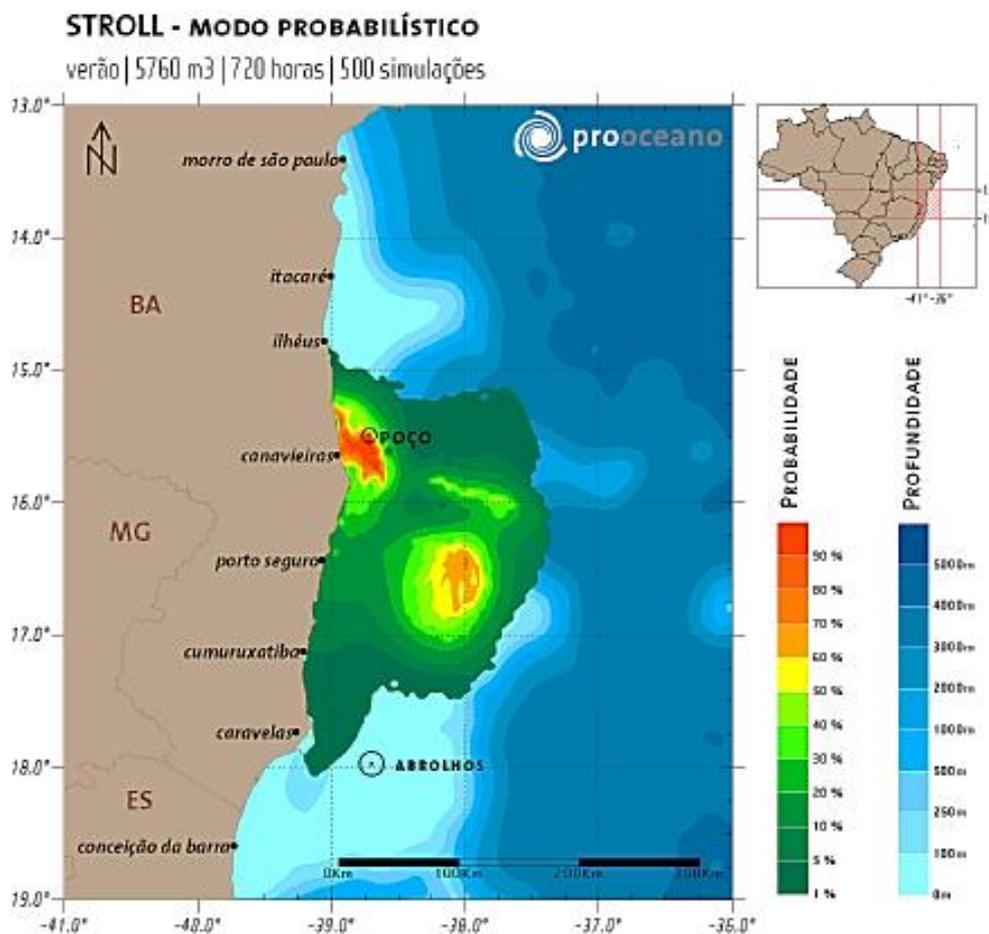
Fonte: adaptado de QUEIROZ GALVÃO PERFURAÇÕES S. A., (2006).

O Bloco BM-J-2 com 317 km^2 que foi concedido pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) à Queiroz Galvão Exploração e Produção S.A. situa-se na Bacia Sedimentar de Jequitinhonha, na costa sul do Estado da Bahia, entre a ponta de Itapuã (Ilhéus) e a Ilha de

Atalaia (Canavieiras) a cerca de 20 km da costa. Nesta localidade a fase exploratória de petróleo vem sendo realizada em profundidades em torno de 4.700 m em uma lâmina d'água com aproximadamente 44 metros de profundidade (Petrobrás, 2007).

Levando-se em consideração os riscos associados a essa operação, foi elaborado em 2006 pela Queiroz Galvão Perfurações S. A. um Plano de Emergência Individual (PEI) relativo às atividades de perfuração exploratória. Nesse estudo o município de Canavieiras é apontado em todas as simulações probabilísticas como o mais provável de ser atingido em caso de acidentes em que o óleo possa atingir a costa, afetando extensões de manguezais e unidades de conservação, regiões de pesca artesanal, empreendimentos turísticos, justificando a escolha desse município para escopo do presente estudo (Figura 2).

Figura 2 - Modelo probabilístico de contato com a mancha de um possível vazamento



Fonte: QUEIROZ GALVÃO PERFURAÇÕES S. A., (2006).

APÊNDICE C – Caracterização granulométrica do sedimento ao longo do Rio Pardo no município de Canavieiras, região litoral Sul do estado da Bahia, nos diferentes pontos amostrais

Amostra/sedimento	% Areia Grossa	% Areia Média	% Areia fina	% Areia muito fina	% Silte	% Argila
P1.1 (MANG/CAV)	14,58%	0,00%	3,08%	44,25%	37,41%	0,69%
P1.2 (MANG/CAV)	9,93%	0,00%	6,30%	46,98%	36,30%	0,52%
P1.3 (MANG/CAV)	6,40%	0,00%	2,06%	46,70%	44,18%	0,66%
P2.1 (MANG/CAV)	-	-	-	-	-	-
P2.2 (MANG/CAV)	19,68%	0,00%	0,26%	35,50%	43,53%	1,00%
P2.3 (MANG/CAV)	18,76%	0,00%	0,17%	32,54%	47,44%	1,11%
P3.1 (MANG/CAV)	18,64%	0,00%	4,21%	46,11%	30,59%	0,46%
P3.2 (MANG/CAV)	17,10%	0,00%	2,48%	46,24%	33,66%	0,56%
P3.3 (MANG/CAV)	18,89%	0,00%	2,79%	44,82%	32,93%	0,56%
P4.1 (MANG/CAV)	30,30%	0,00%	2,88%	37,14%	29,00%	0,67%
P4.2 (MANG/CAV)	21,28%	0,00%	4,07%	41,66%	32,27%	0,69%
P4.3 (MANG/CAV)	18,80%	0,00%	4,60%	43,36%	32,64%	0,63%
P5.1 (MANG/CAV)	26,35%	0,00%	2,61%	35,94%	34,17%	0,92%
P5.2 (MANG/CAV)	24,25%	0,00%	0,88%	34,50%	39,24%	1,13%
P5.3 (MANG/CAV)	25,02%	0,00%	2,02%	35,31%	36,74%	0,90%
P6.1 (MANG/CAV)	25,32%	0,00%	0,26%	34,02%	39,35%	1,08%
P6.2 (MANG/CAV)	31,30%	0,00%	0,29%	31,22%	36,20%	1,01%
P6.3 (MANG/CAV)	29,96%	0,00%	0,41%	33,73%	35,02%	0,86%