

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA E ECOLOGIA**

BÁRBARA DE ASSIS CANTARELA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO PETRÓLEO CRU,
UTILIZANDO *METAMYSIDOPSIS MUNDA* (CRUSTACEA:
MYSIDACEA)**

VITÓRIA
2009

BÁRBARA DE ASSIS CANTARELA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO PETRÓLEO CRU,
UTILIZANDO *METAMYSIDOPSIS MUNDA* (CRUSTACEA:
MYSIDACEA)**

Monografia apresentada ao Curso de graduação em Oceanografia do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes.

VITÓRIA
2009

BÁRBARA DE ASSIS CANTARELA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO PETRÓLEO CRU,
UTILIZANDO *METAMYSIDOPSIS MUNDA* (CRUSTACEA:
MYSIDACEA)**

Monografia apresentada ao Departamento de Oceanografia e Ecologia do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Aprovada em 07 de dezembro de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes
ORIENTADOR – UFES/ DOC

Prof. Dr. Renato Rodrigues Neto
UFES/ DOC

Msc. Júlio César Ruano da Silva

À Deus, a minha mãe, meus avôs Walter e Neném, as minhas irmãs amadas e a tia Eliete e Jô. Pelo carinho e paciência que tiveram comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á DEUS que tem sempre estado ao meu lado, me dando força, saúde e paciência.

A minhas irmãs amadas, Letícia e Débora, pelo carinho e força que me dão, por estarmos sempre juntas nos momentos mais importantes!

Agradeço a minha mãe Margareth, a tia Eliete, Jô, vovô Walter e vovó Neném, pois sem eles não teria conseguido chegar até aqui.

Ao professor e orientador Luiz Fernando por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão desta monografia.

Ao Renato Neto e Julio Ruano pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio às atividades da monografia.

Ao pessoal do laboratório Rodrigo, Thalita, Drielly, Digo, Alex, Lorena, Michel e a galera do pibic Jr. (Thaiane, Raiza, Raiane, Tulio, Patrick e Lucas) por toda a ajuda que me deram ao longo da minha monografia.

E um agradecimento especial ao Ricardo Gomide, pela amizade, lealdade, confiança e pelas conversas quase incompreensíveis, você jamais será esquecido.

Aos meus amigos da graduação, Lú, May, Tati, Mari Beltrão, Tetê, Sassá, Mari Alves, P.A., Bruno, Bermudes, enfim a todos, que me proporcionaram ótimos momentos durante a caminhada da graduação.

RESUMO

O petróleo é um dos mais preocupantes poluentes devido ao seu caráter tóxico a diversos organismos. No Brasil, 80% do petróleo é produzido através de plataformas marítimas localizadas ao longo da costa brasileira, isso representa cerca de 112 plataformas de produção. Para fins de monitoramento em plataformas marítimas de petróleo, a Conama 393/2007 estabeleceu padrão de descarte de óleos e graxas além de definir parâmetros de monitoramento através de teste de toxicidade. O presente trabalho visa observar a potencialidade do microcrustáceo *Metamysidopsis munda* em laboratório para realização de testes toxicológicos com petróleo. Para adaptação deste invertebrado ao ambiente de laboratório são necessários testes para verificação da dieta que melhor se adequa, além da avaliação do grau de sensibilidade da espécie à substâncias de referência. A CL50/96h obtida com o dodecil sulfato de sódio (DSS) foi de 3,37mg/L. A CL50/96h do petróleo para o *M. munda* foi de 22,91 mg/L, se mostrando preocupante quando comparado com os valores de 29 mg/L vigente no Conama. De modo geral, as condições de laboratório testadas no presente estudo mostraram-se adequadas para utilização do *Metamysidopsis munda* em testes toxicológicos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MACHO DE METAMYSIDOPSIS MUNDA.	15
FIGURA 2 – PROCESSO FÍSICO-QUÍMICO SOFRIDO PELO PETRÓLEO NO MAR NO DECORRER DO TEMPO.	17
FIGURA 3 – DESEMBOCADURA DO RIO PIRAQUÊ-AÇÚ EM ARACRUZ-ES.	20
FIGURA 4 – RETIRADA DA FRAÇÃO ACOMODADA DO FRASCO MARIOTTE.	23
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA PARA DETERMINAÇÃO DA CL50 PARA TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.	26

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA RESPOSTA PARA O TESTE COM O PETRÓLEO UTILIZANDO O <i>M. MUNDA</i>	28
GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÕES LETAIS DO ÓLEO LEVE COM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%	30
GRÁFICO 3 – MORTALIDADE DIÁRIAS DO <i>M. MUNDA</i> NO TESTE COM O PETRÓLEO.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DO PETRÓLEO PELO API.	16
TABELA 2 – SUMÁRIO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>METAMYSIDOPSIS MUNDA</i> E LABORATÓRIO.	21
TABELA 3 –. SUMÁRIO DAS CONDIÇÕES DE TESTE.	22
TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DO PETRÓLEO UTILIZADO NO TESTE.	25
TABELA 5 – PARÂMETROS FÍSICO –QUÍMICOS DOS TESTES.	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS.....	13
3.2 ORGANISMO –TESTE.....	14
3.3 O PETRÓLEO	15
3.3.1 Classificação do petróleo.....	15
3.3.2 Comportamento do petróleo no mar.....	16
3.3.3 Total de óleos e graxas (TOG)	17
3.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 CULTIVO <i>Metamysidopsis munda</i>	20
4.2 TESTES DE TOXICIDADE COM O PETRÓLEO	21
4.3 PREPARO DA FRAÇÃO ACOMODADA EM AGUA	22
4.4 TESTE COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA.....	24
4.5 LAVAGEM DE VIDRARIA	24
4.7 ANÁLISE DE DADOS.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÕES	32
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8 REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é o mais sério contaminante dos oceanos e dos mares da Terra. Todos os anos 6.000 toneladas de petróleo bruto são derramados em acidentes durante o transporte, rebentamentos de poços de petróleo, descargas ilegais de efluentes industriais e limpeza de tanques dos navios no mar (TIBURTIUS et al., 2004).

O acúmulo dessas substâncias no ambiente marinho tem causado efeitos tóxicos para a biota e desequilíbrio no ecossistema. Existe uma crescente preocupação com relação a qualidade das águas costeiras no sentido de proteger as comunidades que nelas habitam, isto tem motivado a criação de programas de gestão e manejo nestas áreas. Estudos da comunidade científica estão voltados para as questões ambientais, a fim de respaldar medidas de controle e correção de eventos adversos (VIEIRA, 2004).

Os efeitos agudos dos derramamentos de petróleo de grandes proporções, ou mesmo crônicos, têm sido estudados em diferentes níveis, desde ecossistemas até processos fisio-metabólicos, observa-se que os danos biológicos aos organismos aquáticos são função de sua persistência espaço-temporal, biodisponibilidade de hidrocarbonetos, habilidade de cada grupo em acumular e capacidade dos contaminantes de interferirem no metabolismo normal destes organismos ou comunidades (GESAMP, 1993).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água, tem se tornado bastante comum nos últimos anos no Brasil (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Os testes de toxicidade se constituem no mais comum, mais prático, mais rápido e mais barato instrumento de determinação de toxicidade de um efluente (HARDING, 1992, apud ARAÚJO; NASCIMENTO, 1999).

A legislação, para ser eficientemente aplicada, necessita de testes acessíveis, rápidos e de baixo custo, capazes de possibilitar diagnósticos e previsão de riscos de lançamentos de produtos ou efluentes em corpos receptores salinos (ARAÚJO;

NASCIMENTO, 1999). Para tanto, devem ser definidos organismos-teste que representem efetivamente o ambiente que sofrerá diretamente este impacto.

Dentre os organismos utilizados para testes de toxicidade, os misídeos são de grande representatividade, alta sensibilidade e fácil disponibilidade. Os misídeos tem grande significância na cadeia trófica, pois ocupam um lugar importante no ambiente, constituindo um dos componentes da dieta de várias espécies de peixes, muitas delas utilizadas para consumo humano (EVANS et al., 1982).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda do petróleo cru sobre o misídeo *Metamysidopsis munda*, através de bioensaios.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar um cultivo de laboratório da espécie selecionada *Metamysidopsis munda* no laboratório;
- Determinar as concentrações letais medianas (CL₅₀) para o petróleo cru em sistema estático aberto.
- Comparar os dados obtidos com a legislação vigente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

O termo ecotoxicologia vem de ecologia que é a disciplina que se ocupa das relações entre os seres vivos e o ambiente, e de toxicologia que estuda os efeitos adversos de determinada substância num dado organismo, procurando clarear o mecanismo da ação tóxica do mesmo (ZAGATTO, 2006).

A junção dessas duas terminologias nos dá a definição de ecotoxicologia como sendo “a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que consistem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (ZAGATTO, 2006). Os efeitos adversos dessas substâncias incluem letalidade a curto e longo prazos, efeitos subletais, como alterações comportamentais, reprodutivas, de crescimento e alimentação (SOUZA, 2002)

O estudo sobre os efeitos de poluentes no ecossistema como um todo é extremamente complexo e, por vezes, inviável devido a diversos fatores, tais como custos, disponibilidade de tempo, extensão das áreas sob impacto e diversidade das espécies envolvidas. Entretanto, para poder estimar os efeitos deletérios de materiais tóxicos sobre o meio ambiente, freqüentemente é necessário respostas rápidas. Nesse sentido, os testes de toxicidade aguda são ferramentas importantes e confiáveis para estimar as concentrações nas quais um determinado produto tóxico provoca efeitos deletérios em uma dada população de organismos selecionada (EPA, 2002). Tais testes permitem estabelecer uma relação entre a concentração de exposição e a intensidade de efeitos adversos observados; calcular uma concentração letal (CL_{50}); estabelecer uma comparação da toxicidade de uma substância com outras substâncias na qual a toxicidade é conhecida (VIEIRA, 2004).

Segundo MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, (2008), CL_{50} é a concentração de um agente num meio que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) da população exposta, durante um determinado período de tempo.

3.2 ORGANISMO –TESTE

Os misídeos são pequenos crustáceos livres natantes, comumente conhecidos como camarão-gambá. São componentes da fauna do sublitoral, sendo escavadores, e filtradores (MAKINGS, 1977). Ocorrem em altas densidades em regiões costeiras e estuarinas de todo mundo, vivendo desde poucos centímetros até vários metros de profundidade (MAUCHLINE, 1980).

Possuem comportamento social caracterizado pela formação de cardumes (RITZ, 1994) e constituem um importante elo na cadeia alimentar, representando grande parte da dieta de alguns peixes (MAUCHLINE, 1980).

Mundialmente são conhecidas espécies de misidáceos distribuídas em 120 gêneros e 6 famílias. Para o Brasil foram registradas 22 espécies, todas pertencentes à família Mysidae. Dentre estas espécies, 19 foram encontradas na zona litoral, duas em estuários e apenas uma em água doce (ALMEIDA-PRADO, 1974). No Espírito Santo, *Metamysidopsis munda* Zimmer, 1918 é uma das espécies mais abundantes segundo apontado por estudos prévios já realizados (MARTINELLI FILHO, 2001). Muito pouco ainda é conhecido sobre a biologia desta espécie, *M. munda* (Figura 1) é caracterizada por apresentar na porção terminal do télson dois espinhos laterais de tamanho aproximadamente igual entre si e um terceiro, central, e menor e uma média de 15 espinhos na região lateral do télson (MURANO, 1999).



Figura 1 – Macho de *Metamysidopsis munda*.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Os misídeos são amplamente utilizados como organismos-testes em estudos ecotoxicológicos devido a uma série de características favoráveis como sensibilidade a vários agentes tóxicos, facilidade de manuseio e cultivo, desenvolvimento direto e ciclo de vida curto (NIMMO, HAMAKER, 1982; LUSSIER et al., 1988; WEBER, 1991 apud BADARÓ-PEDROSO et al., 2002).

3.3 O PETRÓLEO

3.3.1 Classificação do petróleo

Dentre todos os produtos químicos o petróleo é um dos mais preocupantes em termos ambientais, principalmente pelos efeitos tóxicos potenciais a diferentes organismos (BREDOLAN, 2004). Embora a composição varie de campo para campo e até entre poços em um mesmo campo, o petróleo é formado essencialmente de hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos, e pequenas quantidades de heterocompostos contendo átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio (VINHOZA, 2005).

Os diferentes tipos de petróleo possuem, essencialmente, os mesmos hidrocarbonetos, mas em proporções que variam consideravelmente. Estas diferenças na composição influenciam nas propriedades físicas dos diversos tipos de petróleo cru, como por exemplo, a coloração variando desde quase transparente até negro; o odor de quase inodoro até o forte cheiro de enxofre (STOCKER; SEAGER, 1981). Componentes de diferentes pesos moleculares, em várias combinações, formam os petróleos, que são divididos em três grupos de acordo com o peso molecular (Tabela 1) (API, 1999).

Tabela 1 – Classificação do petróleo pelo API.

CLASSIFICAÇÃO	°API
PESADO	API < 20
MÉDIO	$20 \leq \text{API} \leq 30$
LEVE	API ≥ 30

Grau API é uma escala idealizada pelo Instituto Americano de Petróleo – (API), utilizada para medir a densidade relativa de líquidos. A escala API varia inversamente com a densidade relativa, isto é, quanto maior a densidade relativa, menor o grau API. O grau API é dado pela seguinte equação:

$$^{\circ} \text{API} = (141,5/\text{Densidade do petróleo}-131,5)$$

3.3.2 Comportamento do petróleo no mar

Quando o petróleo é lançado ao mar, o destino final de seus componentes depende de vários processos físicos, químicos e biológicos (chamados de intemperismos), tais como: volatilização, dissolução, dispersão, adsorção no material particulado, sedimentação, biodegradação e fotodegradação.

De acordo com ITOPF (2003), os processos de espalhamento, evaporação, dispersão, emulsificação e dissolução são os mais importantes durante os estágios

iniciais de um derrame, enquanto que os processos de oxidação, sedimentação e biodegradação são mais importantes nos estágios posteriores (Figura 2).

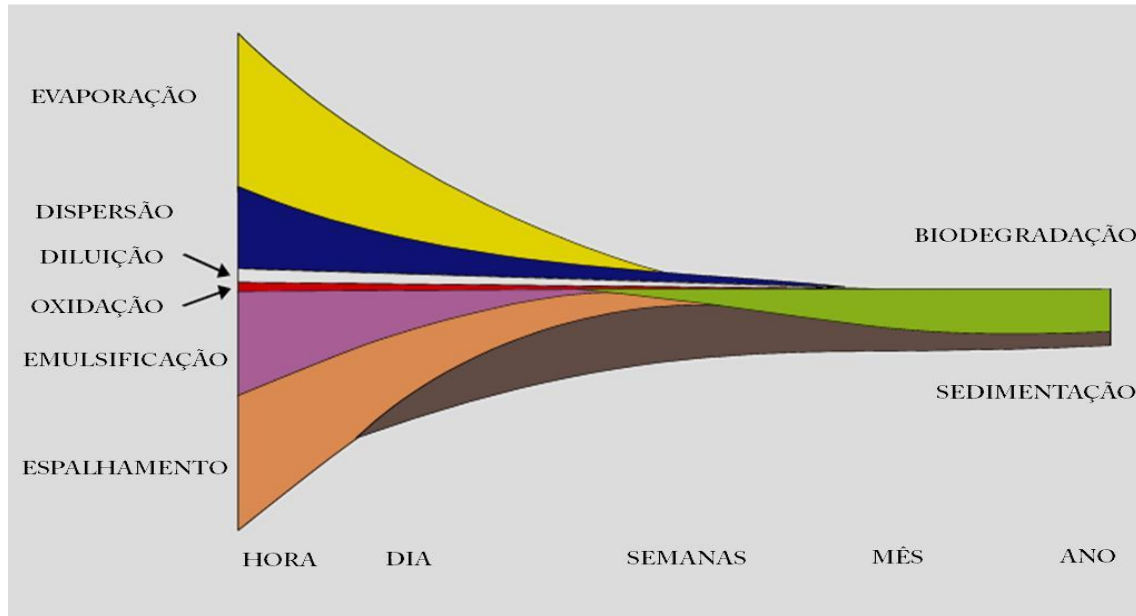


Figura 2 – Processo físico-químico sofrido pelo petróleo no mar no decorrer do tempo.

Fonte: ITOPF (2003), modificado.

O mais importante processo de degradação entre as primeiras 24 e 48 horas após um derramamento é a evaporação em relação à transferência de massa (partição molecular), remoção das substâncias mais tóxicas e eliminação de componentes de baixo peso molecular (MICHEL, 1992; ITOPF, 2002). Ela pode atingir até 75% da massa total derramada em óleos de baixa densidade (MICHEL, 1992), e este processo tem uma forte influência no balanço de massa global de modelos de transporte (PALADINO, 2000).

3.3.3 Total de óleos e graxas (TOG)

Os óleos e graxas são substâncias orgânicas de origem mineral, vegetal ou animal. Estas substâncias geralmente são hidrocarbonetos, gorduras, ésteres, entre outros. São encontrados em maiores proporções em águas oriundas de despejos e resíduos industriais, esgotos domésticos, efluentes de oficinas mecânicas, postos de gasolina, estradas e vias públicas. Os despejos de origem industrial são os que mais

contribuem para o aumento de matérias graxas nos corpos d'água, dentre eles, destacam-se os de refinarias, frigoríficos, plataformas petrolíferas e indústrias de sabão (CETESB, 2009)

A pequena solubilidade dos óleos e graxas constitui um fator negativo no que se refere a sua degradação em unidades de tratamento de despejos por processos biológicos e, quando presentes em mananciais utilizados para abastecimento público, causam problemas no tratamento de água.

A presença de óleos e graxas diminui a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico impedindo, dessa forma, a transferência do oxigênio da atmosfera para a água. Em processo de decomposição a presença dessas substâncias reduz o oxigênio dissolvido elevando a DBO e a DQO, causando alteração no ecossistema aquático (IGAM, 2009). Outro problema relativo é a mortalidade do organismo devido ao contato físico com os organismos impedindo sua natação.

Os compostos tóxicos do petróleo são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) e os BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos). Embora os BTEX e HPAs leves permaneçam menos tempo no ambiente (por serem altamente voláteis) do que HPAs de maior massa molecular, eles ainda representam potencial tóxico aos organismos aquáticos (AKAISHI et al., 2004). HPAs leves são mais hidrofílicos e mais voláteis que HPAs mais pesados e podem ser detectados em água contaminada com óleo cru, constituindo a FSA (fração solúvel do petróleo na água) (AL-YAKOOB et al., 1996; AKAISHI, 2003). Alguns autores reportaram que a FSA pode afetar a sobrevivência, crescimento, reprodução e metabolismo de organismos marinhos. Além disso, a FSA pode também induzir lesões histopatológicas como necroses hepáticas, aneurismas, hiperplasia e desorganização nas brânquias de peixes e outros órgãos internos de peixes expostos (AKAISHI, 2003).

A análise de teor de óleos e graxas (TOG) é amplamente utilizada como parâmetro de qualidade da água (JUCÁ, 2007). O controle dos descartes de óleos e graxas na água produzida originada na produção de óleo é de grande importância na indústria de petróleo, pois se trata de um parâmetro requerido pela legislação, e é um componente importante no controle do processo (JUCÁ, op.cit.).

3.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

No Brasil a toxicologia aquática é uma área ainda pouco explorada e nossas leis ambientais, com relação a análises ecotoxicológicas na avaliação de poluição, estão em estágio de aperfeiçoamento. A Resolução CONAMA nº 357/2005 além de estabelecer a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, também regulamenta as condições e padrões de lançamento de efluentes, proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida.

O limite máximo permitido do teor de óleos e graxas na água de produção das plataformas marítimas estava fixado em 20mg/l, pela Resolução 020/86, e esse limite foi mantido pela Resolução CONAMA 357/2005, que a substituiu. O CONAMA 357/2005 também determinou que no prazo de um ano, a contar de sua publicação, deveria ser publicar nova Resolução, específica para estabelecer normas e critérios para água de produção que, além de óleos e graxas, contém compostos orgânicos e inorgânicos extremamente perigosos para o meio ambiente e saúde humana.

Entretanto, quase dois anos e meio depois da publicação do CONAMA 357/2005, a CONAMA 393/2007, propôs apenas o aumento do teor de óleos e graxas de 20mg/l para 29mg/l mensal, com valor máximo diário máximo de 42 mg/L; e que o monitoramento semestral da água produzida deve ser feito através de métodos ecotoxicológicos padronizados com organismos marinhos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO *Metamysidopsis munda*

Os organismos foram coletados na desembocadura do rio Piraquê-açu em Aracruz-ES (Figura 3), através de uma rede cônico-cilíndrica com malha de 200 micrômetros e abertura de boca de 60 cm e levados ao laboratório para triagem.

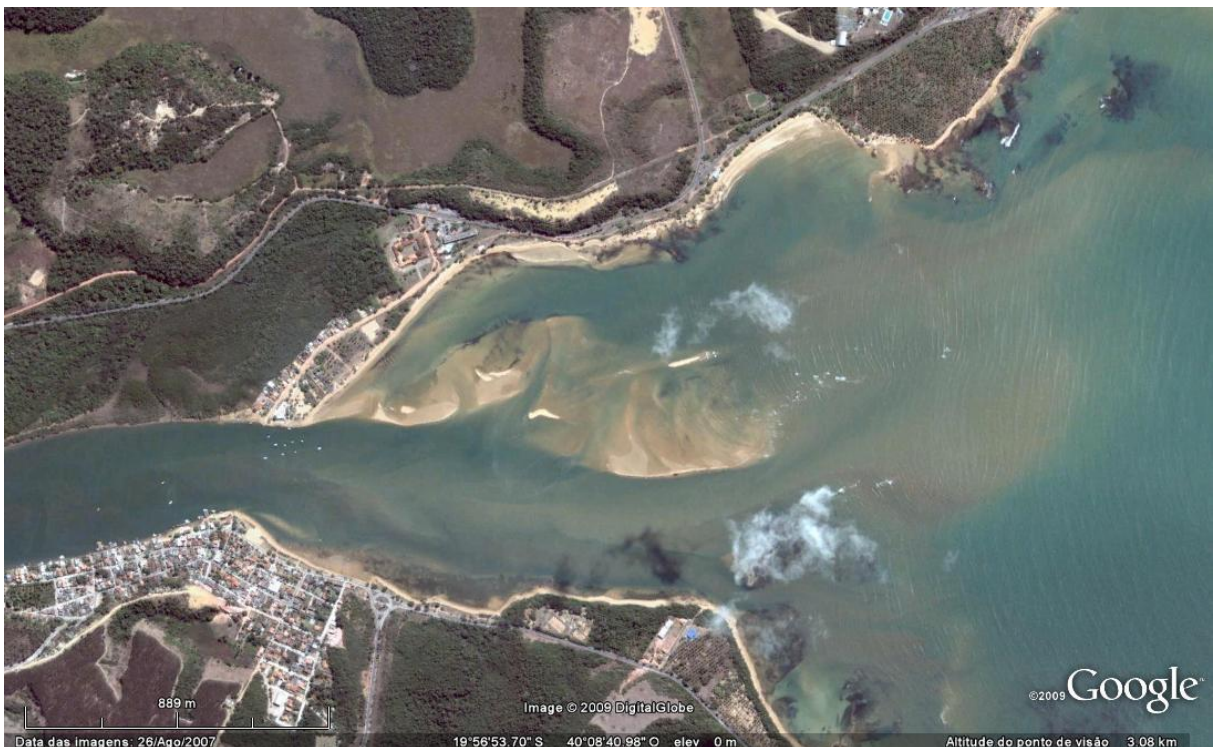


Figura 3 – Desembocadura do rio Piraquê-açu em Aracruz-ES.

Em laboratório, os misídeos foram colocados em uma mesa de luz onde a espécie-alvo (*Metamysidopsis munda*) foi separada com auxílio de uma pipeta plástica, distinguindo juvenis, adultos e fêmeas ovadas, e colocados em recipientes separados com água do mar filtrada, salinidade de 30 ± 2 e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para o cultivo de juvenis a densidade dos organismos foi mantida em 30 juvenis por litro de água, com aeração constante e suave. Como alimento, foram fornecidos de 40 a 60 náuplios de *Artemia franciscana* recém-eclodidos, por jovem, diariamente. Para os indivíduos adultos, a densidade foi de 20 indivíduos por litro de água e, a

taxa alimentar, de 70 a 100 náuplios de *Artemia franciscana* recém-eclodidos, por adulto, diariamente. O fotoperíodo utilizado foi de 12:12h (claro:escuro) com intensidade luminosa de aproximadamente 300 LUX. A Tabela 2 abaixo resume a metodologia de cultivo.

A eclosão de *Artemia franciscana* foi feita em cone de Imhoff com um litro de água do mar filtrada e aeração constante.

Tabela 2 – Sumário das condições de cultivo de *Metamysidopsis munda* em laboratório.

Condições do cultivo	Juvenis	Adulto
Sistema	Semi-estático	Semi-estático
Renovação de água	Uma troca total de água na segunda e uma parcial (2/3) na quinta.	Uma troca total de água na segunda e uma parcial (2/3) na quinta.
Densidade	30 juvenis/l	20 adultos/l
Salinidade	30 ± 2	30 ± 2
Temperatura	25 ± 1°C	25 ± 1°C
Fotoperíodo	12:12h (Luz/escuro)	12:12h (Luz/escuro)
Iluminação	300 LUX	300 LUX
Aeração	Suave e constante	Suave e constante
Alimentação	40 a 60 náuplios/juv./dia	70 a 100 náuplios/adu./dia

4.2 TESTES DE TOXICIDADE COM O PETRÓLEO

Os testes agudos com o petróleo cru seguiram a metodologia formulada pela ABNT (NBR 15308:2005) que consiste na exposição dos juvenis, com idade de 1 a 8 dias, por 96 horas, optou-se por juvenis de 5 dias para que houvesse uma aclimatização dos mesmos, antes do início dos testes. As concentrações utilizadas da FAA do petróleo foram 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%, colocados em béqueres de vidro com capacidade de 400 ml. Cada tratamento teve volume final de 300 ml com três réplicas e com 10 organismos em cada frasco.

Os recipientes foram mantidos em temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, salinidade de 30 ± 2 e 12:12 h (claro:escuro), fornecendo, diariamente, 300 náuplios de *Artemia franciscana* por recipiente-teste. A cada 24 horas, os frascos foram observados e os organismos mortos retirados e registrados. As *Artemia* mortas foram retiradas do recipiente para evitar o aumento do nível de amônia, tendo-se o cuidado de retirar o mínimo de solução. A mortalidade se verificou nos organismos que estavam imóveis e não respondiam a um estímulo feito através de um toque com a ponta de uma pipeta. Por meio do Multiparâmetro Instrutemp foi mensurada a temperatura, pH e oxigênio dissolvido e com o Multiparâmetro YSI (modelo EC300) verificou-se a salinidade.

Tabela 3 - Sumário das condições de teste.

Condições do teste	Juvenis
Sistema	Estático
Densidade	10 organismos
Salinidade	30 ± 2
Temperatura	$25 \pm 1^\circ \text{C}$
Fotoperíodo	12:12h (Claro/escuro)
Iluminação	300 LUX
Aeração	sem
Alimentação	30 náuplios/juv./dia

Através de testes preliminares foram definidas as concentrações utilizadas para os ensaios definitivos, para estabelecer a faixa de sensibilidade do organismo-teste.

O teste só foi validado quando a mortalidade foi menor que 20% no controle, os parâmetros físico-químicos estiverem dentro dos níveis considerados ótimos e a sensibilidade do organismo a substância de referência esteve dentro da faixa aceitável.

4.3 PREPARO DA FRAÇÃO ACOMODADA EM AGUA

A metodologia empregada para a obtenção da fração acomodada em água (FAA) baseou-se em AURAND, D.; COELHO G (2005), que desenvolveu um protocolo para o preparo do óleo. O termo FAA, é oposto a FSA (fração solúvel em água), é considerado tecnicamente mais correto porque as soluções não passam por todos os passos, tais como filtração e centrifugação, para se ter certeza que todas as possíveis partículas do óleo foram removidas (GIRLING, 1989; BENNETT et al., 1990; GIRLING et al., 1992 APUD SINGER et al., 2000).

Para se obter a FAA utilizou-se um frasco Mariotte com capacidade de 1 L, onde foi inserido petróleo e água marinha filtrada na proporção de 1:10, a agitação da mistura foi feita por 24 h, por meio de um agitador magnético, sem vórtex, tomando-se o cuidado de manter o frasco tampado e protegido da luz (envolvendo-o em papel alumínio) . Após o período de agitação, a solução foi mantida em descanso por 1h para posterior retirada da FAA (Figura 4).



Figura 4 – Retirada da fração acomodada do frasco mariotte.
Fonte: Arquivo Pessoal

A fração acomodada em água foi diluída nas proporções de 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%, em cada tratamento.

O petróleo bruto leve foi cedido pelo LabPetro-UFES. Após a FAA ter sido preparada, foi encaminhada para o LabPetro para se avaliar o total de óleos e graxas (TOG). A técnica utilizada foi a de gravimetria que compreende a extração por solventes da fase orgânica da fase aquosa utilizando n-hexano.

4.4 TESTE COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Para aceitação dos testes de toxicidade, foi necessária a padronização do nível de sensibilidade dos organismos com a utilização de uma substância padrão de referência. Esse teste, designado controle positivo, determinou maior segurança de respostas, em vista da possibilidade de se fazer comparações.

Segundo o ENVIRONMENT CANADA (1990) “a habilidade de uma substância de referência realmente detectar lotes de organismos debilitados, ou geneticamente diferentes, ainda é pouco comprovada experimentalmente”. Assim, segundo essa instituição, o objetivo dos ensaios ecotoxicológicos com substâncias de referência é avaliar a repetibilidade do método analítico em um determinado laboratório ao longo do tempo e, também, permitir comparações interlaboratoriais”.

A substância de referencia utilizada para este trabalho foi o dodecil sulfato de sódio (DSS), que é bastante utilizado em testes ecotoxicologicos com microcrustáceos.

4.5 LAVAGEM DE VIDRARIA

A metodologia de lavagem do material seguiu o descrito na ABNT (NBR 15308:2005) e EPA (2002) com algumas adaptações. O material novo utilizado no cultivo ou no ensaio com os organismos foi lavado com solução de ácido clorídrico 10%, água de torneira e água destilada.

A vidraria utilizada nos cultivos foi lavada apenas com água da toneira. A vidraria que entrou em contato com as amostras foi lavada usando a seguinte sequência de procedimentos: molho em água de torneira por 15min, lavagem com detergente neutro, lavagem dupla com água de torneira, molho em solução de ácido clorídrico 10% por 24h, duplo enxágue com água de torneira e triplo enxágue com água destilada.

Os equipamentos e câmaras de teste foram lavados com água destilada após a execução de cada teste.

4.6 TIPO DE ÓLEO USADO NO EXPERIMENTO

O tipo de óleo utilizado foi o leve com as seguintes características apresentados na tabela abaixo.

Tabela 4 – Características do petróleo utilizado no teste.

<i>Petróleo</i>	<i>°API a 60F</i>	<i>Densidade a 20/4°</i>	<i>Nº de acidez total</i>	<i>BSW total</i>
<i>leve</i>	31,8	0,8628 g/cm ³	0,1992 % v/v	0,5 % v/v

Fonte: LabPetro – UFES.

4.7 ANÁLISE DE DADOS

A análise dos dados seguiu o recomendado pela EPA (2002), para avaliação de toxicidade aguda para multi-concentrações. Os percentuais de letalidade nos diferentes tratamentos e testes de cada solução-teste submetidos à estatística de acordo com a Figura 5.

O método usado para estimar a CL_{50} dos testes de toxicidade agudos da multi-concentração depende da forma da distribuição da tolerância, e quão bem as concentrações escolhidas caracterizam a distribuição cumulativa para a distribuição da tolerância (isto é, o número de mortalidades parciais).

Quatro métodos para estimar a CL_{50} são apresentados: o método gráfico, o método do Spearman-karber, o método Trimmed Spearman-karber, e o método do Probit. O esquema da análise é mostrado na figura 5. O método do Probit se mostrou mais adequado.

Os programas utilizados para os testes estatísticos foram o “TOXSTAT 3.4” e o “probit”.

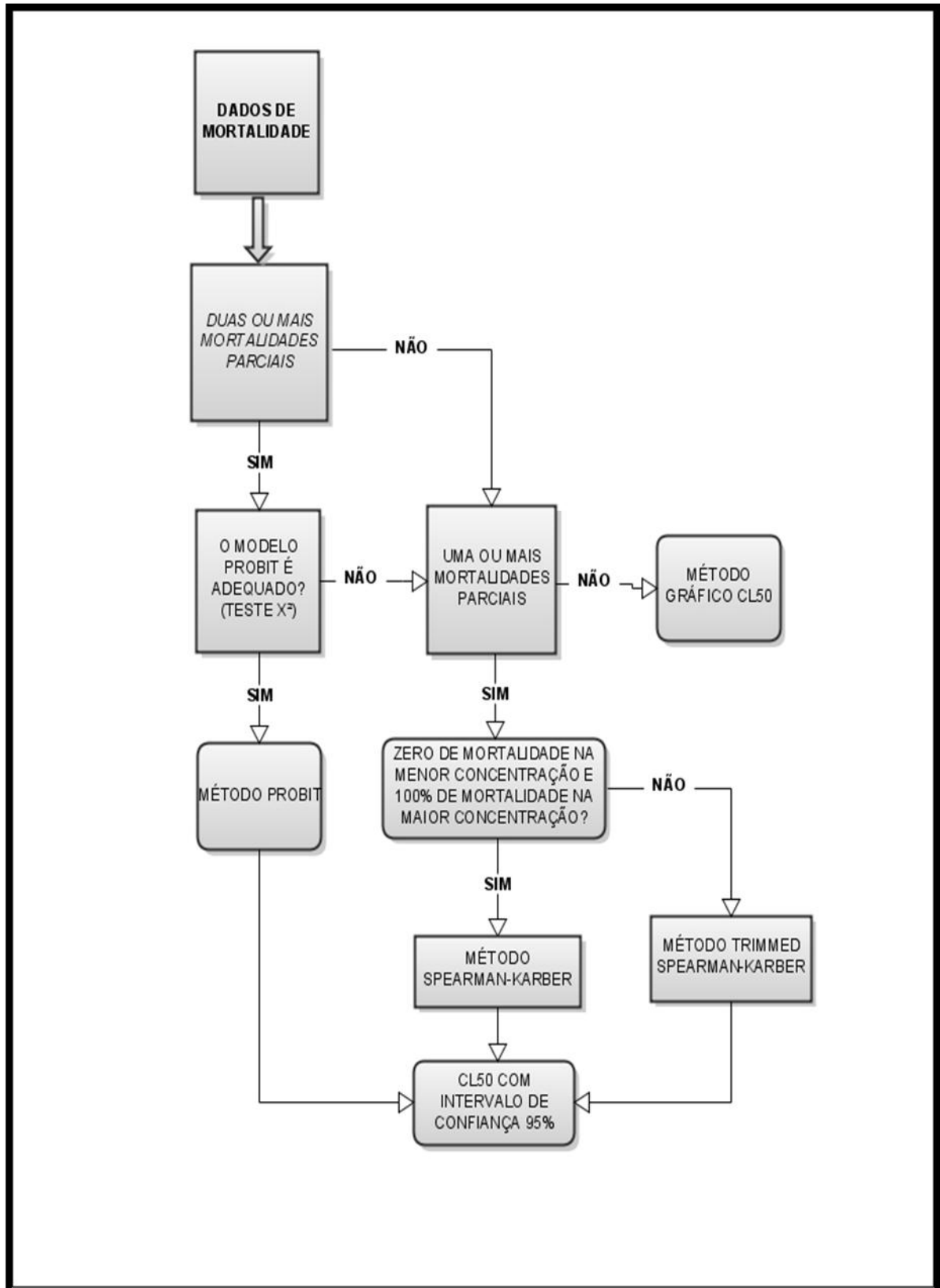


Figura 5 – Fluxograma para determinação da CL₅₀ para teste de toxicidade aguda.

Fonte: EPA modificado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo do *Metamysidopsis munda* se mostrou bastante adequado até a geração F3, quando a população caiu drasticamente. Como não havia dificuldade nas coletas do organismo todos os juvenis eram deixados para repor a população seguinte. Mas como restavam poucos indivíduos na geração F3 passou-se a coletar os organismos e utilizar as gerações F2 para a realização dos testes.

Uma das razões para o insucesso do cultivo pode ter sido a alimentação, a ABNT (NBR 15308:2005) recomenda que as *Artemia sp.* utilizadas na alimentação sejam enriquecidas com óleo de peixe e/ou óleo de fígado de bacalhau, pois os mesmos tornariam a dieta mais rica em ácidos graxos. No entanto, CASTRO (2004) pesquisou dois tipos de alimentação, com *Artemia sp.* enriquecidas e não enriquecidas, na dieta do *Metamysidopsis munda*, e constatou que não existe diferença significativa entre as duas dietas. Segundo estudos de BADARÓ-PEDROSO (1999), quando o misídeo *Mysidopsis juniae* tinha a alimentação constituída de *Artemia sp.* e de microalga *Isochrysis galbana*, havia a redução no ciclo de vida de 26 para 16 dias, evidenciando uma melhora na qualidade da dieta. Assim, faz-se necessário um estudo da dieta mais adequada para o organismo antes de tentar um cultivo mais duradouro.

Os resultados dos fatores físico-químicos do teste (Tabela 5), obtiveram variações que se encontram dentro dos limites estabelecidos pela ABNT, que são de 7,5 a 8,5 para o pH da água, maior que 4 mg/l para o oxigênio dissolvido, salinidade entre 28 e 32 e temperatura de 22 a 26°C, demonstrando que estes fatores não influenciaram os resultados dos testes com a substâncias de referência e com o petróleo.

Tabela 5 – Parâmetros físicos-químicos dos testes.

Parâmetros de qualidade	24h	48h	72h	96h
pH	8,00	8,04	8,07	8,12
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,08	5,78	5,56	5,57
Temperatura (°C)	24,5	24,9	25,3	24,9
Salinidade	29,9	29,9	29,9	30

Paralelamente ao teste com petróleo, foi avaliada a sensibilidade dos organismos através de teste com a substância de referência DSS. O resultado obtido para a $CL_{50}/96h$ em *M. munda* foi de 3,37mg/l. O resultado do teste com *M. munda* é aceitável, uma vez que não existem estudos prévios com a espécie. Comparando os resultados com os citados por BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. (2002), para o misídeo *Mysidium gracile* em teste com o DSS, que obteve intervalo entre 1,83 a 3,23, o valor obtido no presente estudo esteve próximo do máximo encontrado para esta outra espécie.

Embora o resultado do teste de sensibilidade tenha sido satisfatório, o aprimoramento desses testes é imprescindível para a obtenção de resultados mais fidedignos que propiciem maior segurança ao meio ambiente e confiabilidade aos resultados dos testes de toxicidade.

No teste definitivo com o petróleo leve, a $CL_{50}/96horas$ obtida para o organismo foi de 22,91 mg/L de óleos e graxas (Gráfico 1), sendo que a situação controle proporcionou 90% de sobrevivência de *M. munda* tornando, assim, o teste aceitável.

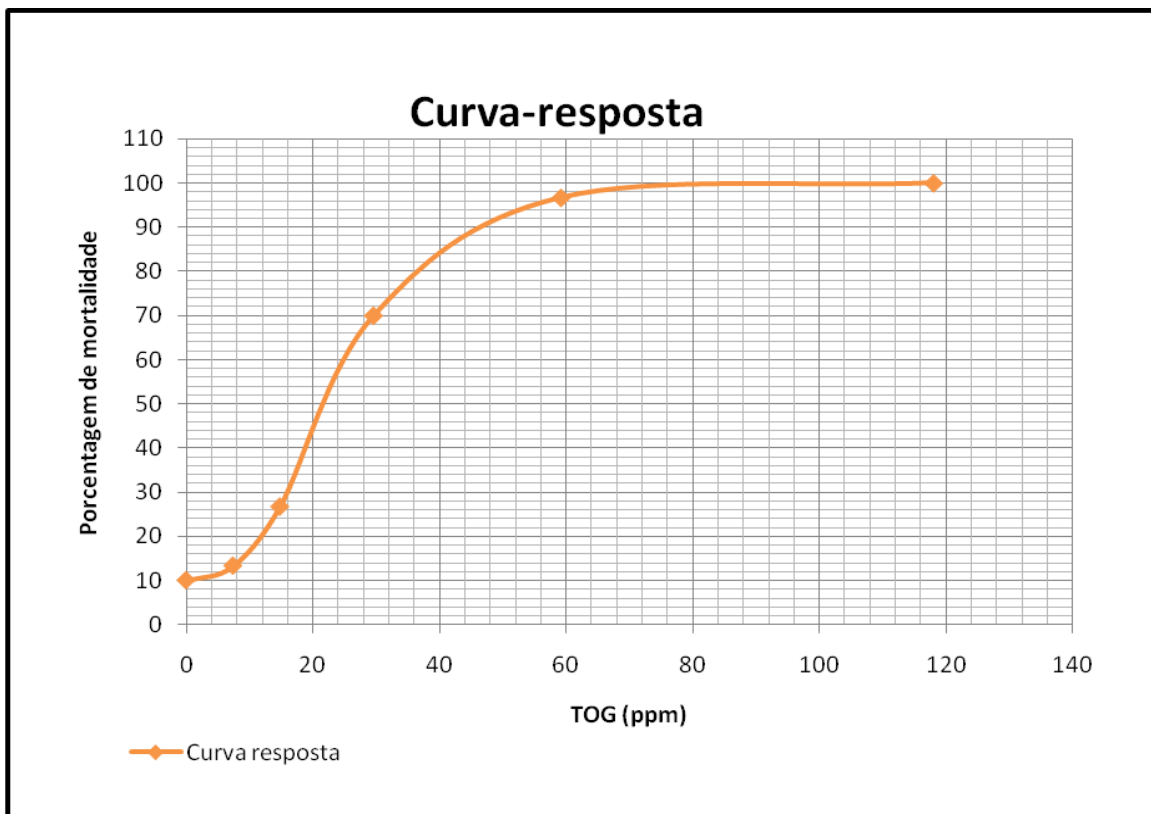


Gráfico 1 – Curva resposta para o teste com o petróleo utilizando *M. munda*.

Segundo KENNISH (1997), o petróleo pode causar diversos impactos sobre organismos marinhos, seja por ação física, ambiental (altera o pH, diminui o oxigênio dissolvido, diminuição do alimento disponível) e tóxica. Sendo assim a mortalidade dos organismos pode ter sido ocasionada por diversos motivos, como impossibilidade de troca do oxigênio devido ao filme de óleo formado na superfície. Porém não houve diferença significativa nas análises de oxigênio, o que não permite afirmar que o OD tenha sido uma provável causa. Outro motivo plausível pode ser a ação das frações voláteis (que são mais solúveis na água) já que, segundo DA SILVA (2004), o petróleo leve é o que possui maior quantidade dessas frações. A ação física do óleo também pode ter ocasionado a mortalidade de alguns indivíduos cobrindo o corpo do organismo pelo óleo, impedindo que os mesmos não consigam nadar e conseqüentemente alimentar-se, uma vez que, a natação está diretamente ligada à alimentação do misídeo.

Existem muitos estudos que utilizaram outras espécies de misídeos em teste ecotoxicológicos, com a mesma técnica de obtenção da FAA da CROSERF. No entanto, esses testes tiveram a análise do petróleo com foco na quantidade de hidrocarbonetos totais, HPA's e BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos) que, segundo a literatura, seria as frações mais tóxicas do petróleo. A análise do petróleo neste trabalho utilizou o total de óleos e graxas, pois a legislação brasileira baseia-se nela, principalmente para monitoramento de plataformas de petróleo e no padrão de lançamento de esgoto. Outras análises como o benzeno e tolueno são exigidos são elaborados relatórios contendo suas análises, no entanto não há limite para seu lançamento.

No teste realizado com o petróleo a CL_{50} mostrou-se abaixo do valor estipulado no Conama e, apresenta-se muito menor que os valor de pico permitido no Conama que é de 49 mg/L. Isto significa que não há um intervalo de segurança para a espécie em questão. E que valores mínimos de lançamento já estaria causando a mortalidade de mais de 50% da população mostrando-se preocupante em termos ambientais. Em uma situação hipotética a concentração máxima permitida de 49 mg/L já estaria matando mais de 90% da população, como pode ser visto no Gráfico 2, causando danos ao ecossistema, tendo em vista que este organismo compõe a dieta de alguns peixes.

A concentração letal para 50% de indivíduos é um padrão internacional para estes tipos de ensaio. O gráfico abaixo mostra diferentes concentrações letais com valores máximos e mínimos do petróleo com intervalos de 95% de confiança.

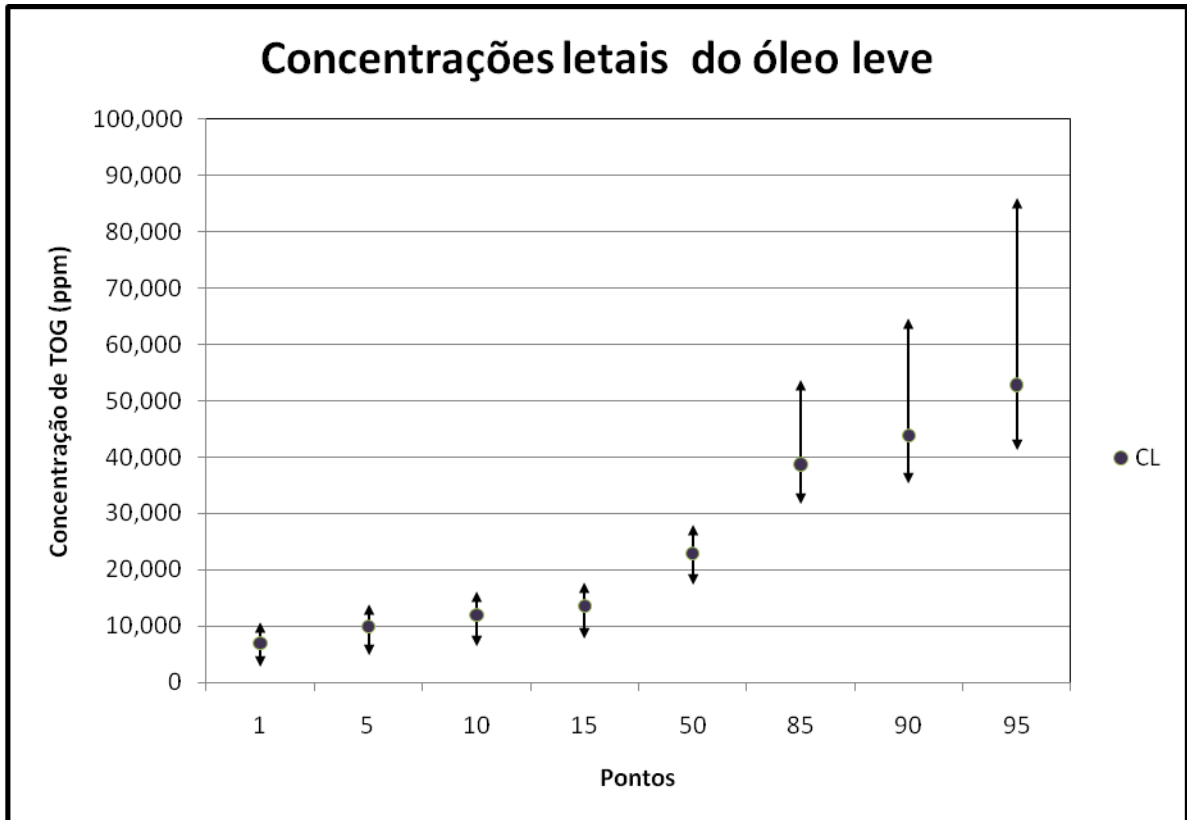


Gráfico 2 – Concentrações letais do óleo leve com intervalos de confiança de 95%.

Através do Gráfico 3 observou-se que, na concentração de 118 mg/L, ocorreu alta mortalidade no primeiro dia, sendo esta concentração extremamente tóxica para os indivíduos. Segundo VIEIRA (2004) os efeitos dos compostos BTEX são mais visíveis nos primeiros dois dias devido à natureza volátil destes tóxicos e por não haver impedimento do processo de evaporação da água para o meio aéreo. Através do teste de Anova seguido pelo teste de tukey ($p=0,05$) verificou-se que o controle não teve diferença significativa para as concentrações de 7,4 mg/L e 14,8 mg/L. As concentrações de 29,6 mg/L e 59,2 mg/L tiveram sua toxicidade mais evidente em 72 h e 96 h. Isso pode ter ocorrido por ação física do óleo impedindo a natação, pois quando as concentrações foram observadas nos dois últimos dias de testes havia organismos letárgicos no fundo do recipiente e, verificou-se ainda, grande número de *Artemia* nadando no recipiente teste, o que não foi constatado no controle.

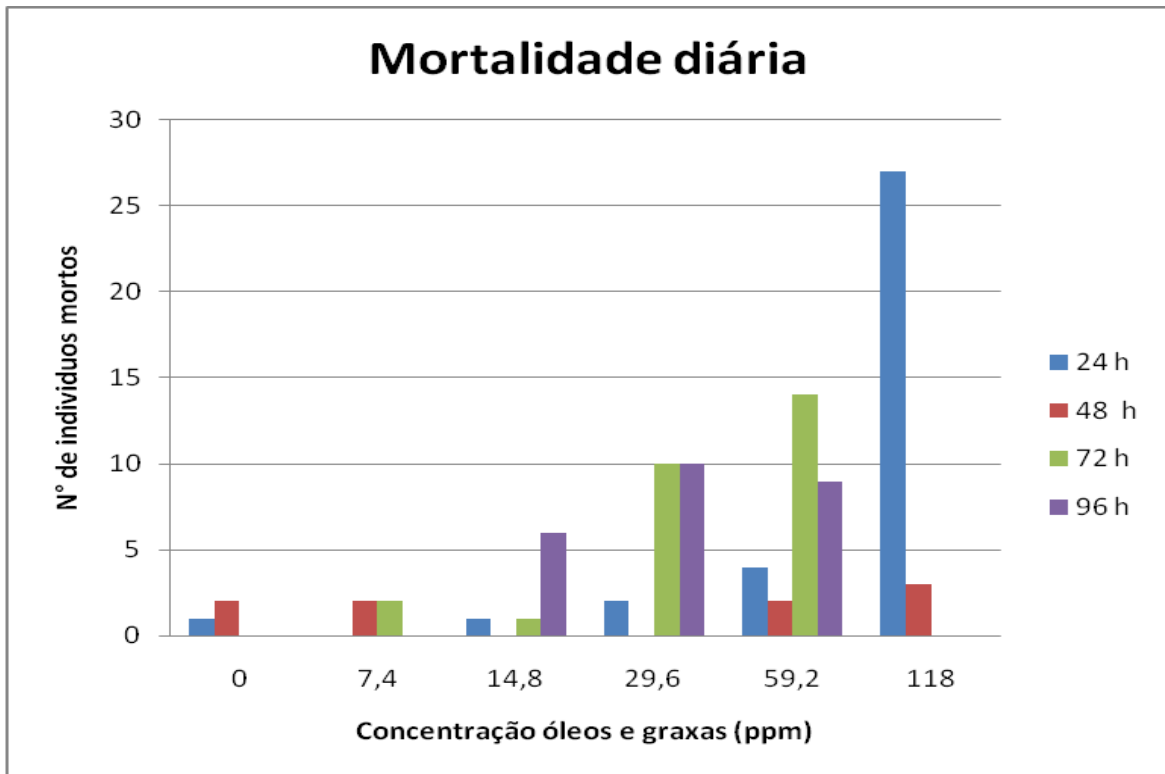


Gráfico 3 – Mortalidade diárias do *M. munda* no teste do petróleo.

6 CONCLUSÕES

Metamysidopsis munda se apresentou como um organismo-teste viável para a análise da toxicidade do óleo cru.

A toxicidade aguda para os juvenis de *M. munda* apresentada pelo petróleo se manteve menor que os padrões exigidos pelas legislações ambientais vigentes no Brasil, Resolução 393/2007. A princípio, há um intervalo de segurança para a espécie referente ao petróleo, exceto em casos que o lançamento que alcance o pico máximo permitido.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Metamysidopsis munda é uma espécie que ocorre ao longo do ano, concentrando-se na zona de arrebentação como um cardume monoespecífico de misídeos no litoral. Porém, seu cultivo não foi implantado com sucesso, e para que isso aconteça, necessita ser feito um acompanhamento mais minucioso das variáveis envolvidas, principalmente alimentação.

A sensibilidade ao DSS se mostrou aceitável embora o teste tenha que ter maior repetibilidade para se ter confiabilidade dos resultados.

O tipo de teste de sistema estático escolhido para se verificar os efeitos reais da FAA aos organismos e comparar estes com legislação vigente, cria perspectivas para um novo campo de estudos, que visa avaliar os efeitos tóxicos destes compostos em uma situação mais próxima da realidade.

8 REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Norma Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea)**. NBR15308:2005.

AKAISHI, F. M. **Aplicação de Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Estudos de Laboratório e Monitoramento em Campo**. Curitiba, 2003. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

AKAISHI, F. M., SILVA DE ASSIS, H. C., JAKOBI, S. C. G., EIRAS-STOFELLA, D. R., ST-JEAN, S., COURTENY, S. C., LIMA, E. F., WAGENER, A. L., SCOFIELD, A. L., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. **Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp) after Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. v. 46, n. 2, p. 244-253. 2004.

AL-YAKOUB, S. M.; GUNDERSEN, D.; CURTIS, L. **Effects of the water-soluble fraction of partially combusted crude oil from Kuwait's oil fires (from Desert Storm) on survival and growth of the marine fish *Menidia beryllina***. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 35, p. 142-149. 1996.

AURAND, D.; COELHO G. **Cooperative Aquatic Toxicity Testing of Dispersed Oil and the "Chemical Response to Oil Spills: Ecological Effects Research Forum (CROSERF)"**, American Petroleum Institute Environment, Health and Safety Department, Washington, DC. 2005.

ALMEIDA PRADO, M. S. de. 1974. **Mysidacea (Crustacea) na região lagunar de Cananéia**. Instituto de Biociências de Universidade de São Paulo, 86p.

API - American Petroleum Institute. **Fate of spilled oil in marine waters: Where does it go? What does it do? How do dispersants affect it?** API Publication Number 4691, USA. 1999.

ARAÚJO M. M. S.; NASCIMENTO I. A. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, Salvador, n. 1, p. 41-47, 1999.

BADARO-PEDROSO, C. **Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos. 1999.

BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. Testes de toxicidade aguda com misidáceos - ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea). In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (Eds.). **Métodos em ecotoxicologia marinha**. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Industrial Ltda., 2002. p 123-140.

BRENDOLAN, Rodrigo Alves. **UTILIZAÇÃO DO MICROCRUSTÁCEO *Kalliapseudes schubartii* EM TESTES DE ECOTOXICOLOGIA** . 2004. 107 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2004.

CASTRO, Mauricio Jose de Almeida. **Desenvolvimento pós-embrionário de *Metamysidopsis munda* (CRUSTACEA: MYSIDACEA) em laboratório utilizando diferentes dietas alimentares**. Monografia. Vitória. 2004.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2004. Disponível em: < www.cetesb.sp.gov.br >. Acesso em: 24 Jun. 2009.

CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente). Resolução nº 393, de 08 de agosto de 2007. **“Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências”**. Publicada no D.O.U. em 09 de agosto de 2007.

CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **“Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.”**. Publicada no D.O.U. em 18 de março de 2005.

DA SILVA, Priscila Reis. **Transporte Marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais**. 2004. Tese - Programa de Pós-Graduação de engenharia. Rio de Janeiro. 2004.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12. 85 p, 1990.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) USEPA. EPA-821-R-02-012: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 ed. Washington. USA. 2002.

EVANS, P.J.; MANG, D.T.; KIM, K.S.; YOUNG, L.. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. **Applied Environmental Microbiology** v. 57, p. 1139-1145, 1991.

GESAMP. **Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment**. Report and Studies GESAMP, n. 50, p. 192, 1993.

IGAM - INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. **Parâmetros químicos**. Disponível em: <http://aguas.igam.mg.gov.br/aguas/htmls/aminas_nwindow/param_quimicos.htm>. Acesso em: 21 ago. 2009.

ITOPF (The International Tanker Owners Pollution Federation) 2002. *Effects of marine oil spills: fate and effects*. Disponível em:

<<http://www.itopf.com/marine-spills/fate/weathering-process/>>. Acesso em: 24 Abr. 2009.

JUCÁ, T. D. A. Comparação de Metodologias para Análises de Teor de Óleos e Graxas (TOG) em águas de produção. 2007. 55f. Monografia -DEQ/ UFRN, Natal, 2007.

KENNISH, MJ. **Pollution impacts on marine biotic communities**. Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 310 p. 1997.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.

MAKINGS, P. **A guide to the British coastal Mysidacea**. Field Studies 4: 575-595. 1977.

MARTINELLI FILHO, D. **Sazonalidade e diversidade de misidáceos na zona de arrebentação da praia da Sereia, (Vila Velha- ES)**. 2001. Monografia de Graduação (Curso de Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Espírito Santo. p. 36, 2001.

MAUCLINE, J. The biology of Mysids and euphausids. In: BLAXTER, J.; F. RUSSEL; M. YONG (Eds). **Advances in Marine Biology**. London, England, Academic Press, v 18, p 681, 1980.

MICHEL, J. 1992. Oil Behavior and Toxicity. In: HAYES, MO; HOFF, R; MICHEL, J; SCHOLZ, D & SHIGENAKA, G. 1992. **An introduction to coastal habitats and biological resources for oil spill response Hazardous Materials Response and Assesment Division** – National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). . Disponível em: <<http://www.noaa.gov/index.html>>. Acesso em: 16 junho 2009.

MURANO, M. 1999. Mysidacea. In: Boltovskoy, D. (ed.) **South Atlantic Zooplankton**. Backhuys, Leiden. p 1099-1140.

PALADINO, EE. 2000. **Modelagem matemática e simulação de trajetórias de derrames de petróleo no mar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil. 110p.

RITZ, D.A. Social aggregation in pelagic invertebrates. **Advances in Marine Biology**., v.30, p.156-206. 1994.

SINGER M.M., AURAND D., BRAGINS G.E., CLARK J.R., COELHO G.M., SOWBY M.L., TJEERDEMA R.S. **Standardization of preparation and quantification of water accommodated fractions of petroleum for toxicity testing**. *Mar Pollut Bull* 40:1007-1016. 2000.

SOUZA, E.C.P.M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M; NIPPER, M.(Eds.). **Métodos em ecotoxicologia marinha**. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Industrial Ltda., 2002. p. 9-14.

STOCKER, H.S.S. & SEAGER, S.L.S. 1981. Química ambiental – **Contaminación del aire y del agua**. 1 ed. Barcelona, Editorial Blume.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. **Química Nova**, São Paulo v. 27 n. 3, p. 441– 446, 2004.

STOCKER, H.S.S. & SEAGER, S.L.S. Química ambiental. **Contaminación del aire y del agua**. 1 ed. Barcelona, Editorial Blume. 1981.

VIEIRA, Francyne Caroline dos Santos. **Toxicidade do Hidrocarboneto monoaromático do petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlântica* (Crustácea: Mysidacea)**. 2004. 72 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2004.

VINHOZA, Mônica Maria Jorge, **Estudo do comportamento dos metais Chumbo e Mercúrio na Presença do 1-Dodecanotiol e do Ácido Hexanóico em Matriz de Hidrocarbonetos**. 2005. 131 f. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio. Rio de Janeiro. 2005.

ZAGATTO P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.) **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMA, 2006. p.1-12.