

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

THOMAZ CABRAL RANGEL

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO BIOCIDA
GROTAN[®] OX MEDIANTE BIOENSAIOS DE
ECOTOXCIDADE AGUDA UTILIZANDO *ARTEMIA
SALINA* E *LACTUCA SATIVA* COMO
BIOINDICADORES**

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

THOMAZ CABRAL RANGEL

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO BIOCIDA
GROTAN[®] OX MEDIANTE BIOENSAIOS DE
ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO *ARTEMIA
SALINA* E *LACTUCA SATIVA* COMO
BIOINDICADORES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à
atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso
de Química Industrial, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Químico Industrial

Prof.^a Dr.^a Tânia Mara Pizzolato
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Fátima Menezes Bento
Co-orientadora

Porto Alegre, 2012

*Dedico este trabalho às duas pessoas mais maravilhosas que conheci na minha vida,
meus amados avós Mario e Laira.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Tânia Mara Pizzolato pela orientação, confiança e todo conhecimento que me forneceu nesta etapa da minha graduação.

Ao pessoal do laboratório D107, principalmente a Flávia e ao João Henrique por suas contribuições para a realização deste trabalho.

A Adriane pelo auxílio que me prestou, sempre de boa vontade.

Aos meus amigos de longa data Joana, Matheus, Roberto e Vinícius por compartilharem comigo tantas alegrias e bons momentos.

Aos colegas durante a graduação Guilherme, Rodrigo, Bárbara e Gabriela por me ajudarem sempre que precisei e por se tornarem os amigos que são.

Ao Bruno e a Sabrina pelo companheirismo e pelas risadas.

A toda minha família. Especialmente aos meus primos Mariana e Michel, com quem sei que posso sempre contar.

A minha irmã Bruna que consegue ser tão diferente e ao mesmo tempo tão parecida comigo.

Aos meus avós Mario e Laira, que são como pais para mim, por me ensinarem o valor da família e ajudarem a construir meu caráter.

A minha namorada Cristiana por completar minha vida como só ela pode, me fazendo feliz sempre que estamos juntos. *"Amar é descobrirmos a nossa riqueza fora de nós."*

E finalmente aos meus pais Ana e Sérgio por todo o carinho, amor, incentivo e sacrifícios que fizeram para que eu pudesse chegar onde cheguei.

RESUMO

Este estudo apresenta avaliações ecotoxicológicas de amostras aquosas do biocida Grotan[®]OX em diferentes concentrações e pHs e de amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com Grotan[®]OX. Estas avaliações foram feitas através de bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa*. Os parâmetros analisados foram: a taxa de mortalidade, no caso da *A. salina*, e o crescimento da raiz, peso dos brotos e germinação das sementes, no caso da *L. sativa*. Neste estudo também foi feita uma avaliação de custos dos bioensaios mencionados, assim como uma comparação destes com os custos do tradicional bioensaio com *Daphnia magna*. De forma geral, os resultados obtidos indicaram a toxicidade do biocida nas condições analisadas. Sua toxicidade foi considerada alta, matando mais de metade dos espécimes de *Artemia salina* em valores iguais ou superiores a 100 ppm e provocando uma queda de mais de 50% no crescimento das raízes de *Lactuca sativa* em valores iguais ou superiores a 200 ppm. Não ficou claro o efeito do pH sobre a quantidade de formaldeído liberado, nos experimentos com o microcrustáceo houve um aumento de sua toxicidade relativamente grande em valores de pH iguais a 5 e 3, sendo este aumento mais efetivo em pH 3, mas nos experimentos com a planta sua toxicidade se mostrou independente do pH. Ficaram constatadas grandes transferências de Grotan[®]OX ou do seu agente biocida para a água que entrou em contato com diesel contaminado com o biocida, mas o efeito do tempo sobre tais transferências não pode ser determinado. Os métodos se mostraram eficientes de forma geral, com exceção da germinação das sementes de *Lactuca sativa*, em todos os parâmetros analisados se observou a sensibilidade dos organismos ao Grotan[®]OX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da molécula de formaldéido.	12
Figura 2 - Estrutura molecular da 3,3'-Metilenobis[5-metiloxazolidina].	15
Figura 3 - <i>Nauplius</i> de <i>Artemia salina</i> .	16
Figura 4 - Espécime adulto de <i>Artemia salina</i> .	16
Figura 5 - Um espécime de <i>Lactuca sativa</i> .	18
Figura 6 - Espécime de <i>Daphnia magna</i> .	19
Figura 7 - Funil de separação com cistos de <i>Artemia salina</i> .	30
Figura 8 - Indicação da região que limita a raiz da <i>Lactuca sativa</i> .	32
Figura 9 - À esquerda, brotos que apresentaram crescimento de raiz nulo ou insignificante e à direita brotos que apresentaram crescimento normal da raiz.	32
Figura 10 – Amostras de água retiradas após 24 h de contato com diesel que continha diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Taxa de mortalidade média de <i>Artemia salina</i> em soluções com diferentes concentrações de dicromato de potássio.	33
Gráfico 2 – Taxa de mortalidade média de <i>Artemia salina</i> em soluções com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	34
Gráfico 3 – Taxa de mortalidade média de <i>Artemia salina</i> em soluções com diferentes concentrações Grotan [®] OX.	35
Gráfico 4 – Taxa de mortalidade média de <i>Artemia salina</i> em soluções com diferentes pHs.	35
Gráfico 5 – Taxa de mortalidade média de <i>Artemia salina</i> em soluções de 50 ppm de Grotan [®] OX com diferentes pHs.	36
Gráfico 6 – Taxa de mortalidade média de <i>Artemia salina</i> em soluções aquosas que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	37
Gráfico 7 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio.	39
Gráfico 8 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em soluções com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	40
Gráfico 9 – Peso médio dos brotos cultivados em soluções com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	40
Gráfico 10 – Porcentagem de sementes germinadas em soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio.	41
Gráfico 11 – Porcentagem de sementes germinadas em soluções com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	41
Gráfico 12 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em diferentes pHs de soluções com e sem Grotan [®] OX.	42
Gráfico 13 – Peso médio dos brotos cultivados em soluções de diferentes pHs com e sem Grotan [®] OX.	43
Gráfico 14 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	44
Gráfico 15 – Peso médio dos brotos cultivados em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	45
Gráfico 16 – Porcentagem de sementes germinadas em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan [®] OX.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características e propriedades físico-químicas do Grotan [®] OX.	13
Tabela 2 - Concentrações mínimas necessárias de Grotan [®] OX para a inibição dos micro-organismos.	14
Tabela 3 - Concentrações de nutrientes nas soluções estoque de alimento para algas verdes.	21
Tabela 4 - Custos dos bioensaios.	51

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 FORMALDEÍDO.....	12
2.1.1 Características Físicas e Químicas	12
2.1.2 Importância.....	12
2.1.3 Riscos à Saúde e ao Meio Ambiente	12
2.2 GROGAN [®] OX.....	13
2.2.1 Características Físicas e Químicas	13
2.2.2 Descrição.....	15
2.3 ENSAIOS COM <i>ARTEMIA SALINA</i>	15
2.3.1 Introdução.....	15
2.3.2 Características do Organismo.....	15
2.3.3 Eclosão dos Cistos.....	17
2.3.4 Método.....	17
2.4 ENSAIOS COM <i>LACTUCA SATIVA</i>	17
2.4.1 Introdução.....	17
2.4.2 Características do Organismo.....	18
2.4.3 Método.....	18
2.5 ENSAIOS COM <i>DAPHNIA MAGNA</i>	18
2.5.1 Introdução.....	18
2.5.2 Características do Organismo.....	19
2.5.3 Método.....	19
2.5.4 Cultura das <i>Daphnia magna</i>	19
2.5.5 Alimentação e Preparo do Alimento.....	20
3 SITUAÇÃO ATUAL.....	22
3.1 CRUSTÁCEOS.....	22
3.1.1 <i>Daphnia magna</i>	22
3.1.2 <i>Daphnia similis</i>	23
3.1.3 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	23
3.1.4 <i>Mysidopsis juniae</i>	23
3.1.5 <i>Hyalella azteca</i>	23
3.2 PEIXES.....	23
3.2.1 <i>Danio rerio</i>	23
3.3 BACTÉRIAS.....	24
3.3.1 <i>Vibrio fischeri</i>	24
3.4 ALGAS.....	24
3.4.1 <i>Selenastrum capricornutum</i>	24
3.4.2 <i>Skeletonema costatum</i>	24
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 OBJETIVO GERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5 PROPOSTA TECNOLÓGICA.....	26
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
6.1 MATERIAIS.....	27
6.2 MÉTODOS.....	27
6.2.1 Preparo das Amostras.....	27
6.2.2 Bioensaio Taxa de Mortalidade de <i>Artemia salina</i>	29

6.2.2.1	Eclusão dos Cistos de <i>Artemia salina</i>	29
6.2.2.2	Realização dos Experimentos.....	30
6.2.3	Bioensaios Taxa de Germinação e Crescimento de <i>Lactuca sativa</i>	31
6.2.3.1	Realização dos Experimentos.....	31
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
7.1	BIOENSAIOS COM <i>ARTEMIA SALINA</i>	33
7.1.1	Variação de Concentração.....	33
7.1.2	Variação de pH.....	35
7.1.3	Variação de Tempo de Contato Água-Diesel.....	36
7.2	BIOENSAIOS COM <i>LACTUCA SATIVA</i>	38
7.2.1	Variação de Concentração.....	39
7.2.1.1	Comprimento da Raiz.....	39
7.2.1.2	Peso dos Brotos.....	40
7.2.1.3	Germinação das Sementes.....	41
7.2.2	Variação de pH.....	42
7.2.2.1	Comprimento da Raiz.....	42
7.2.2.2	Peso dos Brotos.....	43
7.2.2.3	Germinação das Sementes.....	44
7.2.3	Variação de Tempo de Contato Água-Diesel.....	44
7.2.3.1	Comprimento da Raiz.....	44
7.2.3.2	Peso dos Brotos.....	45
7.2.3.3	Germinação das Sementes.....	45
7.3	ANÁLISE DE CUSTOS.....	46
7.3.1	Consumíveis.....	47
7.3.1.1	<i>Artemia salina</i>	47
7.3.1.1.1	Dicromato de potássio.....	47
7.3.1.1.2	Cistos de <i>Artemia salina</i>	47
7.3.1.1.3	Sal Marinho.....	47
7.3.1.2	<i>Lactuca sativa</i>	48
7.3.1.2.1	Cloreto de Sódio.....	48
7.3.1.2.2	Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	48
7.3.1.2.3	Papel Filtro.....	48
7.3.2	Não Consumíveis.....	49
7.3.2.1	<i>Artemia salina</i>	49
7.3.2.1.1	Recipientes de Análise.....	49
7.3.2.1.2	Lâmpada Incandescente.....	49
7.3.2.1.3	Bomba de Aeração.....	49
7.3.2.2	<i>Lactuca sativa</i>	50
7.3.2.2.1	Placas de Petri.....	50
7.3.3	Energia Elétrica.....	50
7.3.3.1	<i>Artemia salina</i>	50
7.3.3.2	<i>Lactuca sativa</i>	50
7.3.4	Serviço.....	50
7.3.4	Custos Totais.....	51
7.3.5	Comparação com o Mercado.....	51
8	CONCLUSÃO	53
9	REFERÊNCIAS	54
10	ANEXOS	58
10.1	ORÇAMENTO DE BIOENSAIO COM <i>DAPHNIA MAGNA</i>	58

1 APRESENTAÇÃO

Grande parte da demanda energética mundial atual é satisfeita por fontes fósseis não renováveis (petróleo, carvão e gás natural). No entanto, estas fontes vêm sendo consumidas rapidamente, tornando necessária a substituição dos combustíveis fósseis por combustíveis alternativos derivados de fontes renováveis. Os principais substitutos são o etanol e o diesel produzidos através de matéria orgânica de origem agrícola que por isso recebem o nome de bioetanol e biodiesel. Por esse motivo, a produção de biocombustíveis vem crescendo rápida e continuamente, segundo a *Statistical Review of World Energy* de junho de 2011 produzida pelo BP, atingindo em 2010 aproximadamente 59 milhões de toneladas anuais, das quais cerca de um terço dessa produção foi de biodiesel.

Além da vantagem relacionada à fonte, existem outras características que diferenciam o diesel de origem fóssil do biodiesel, entre elas está a biodegradabilidade do biodiesel, característica que é considerada uma desvantagem quando se trata de armazenamento e estocagem, momento em que o produto está sujeito à biodeteriorização. Por isso se tornou comum a adição de produtos com atividade antimicrobiana (biocidas) durante o processo de armazenamento do biodiesel e misturas diesel-biodiesel a fim de impedir a proliferação de bactérias, fungos e leveduras que ocorre quando o produto está em presença de água, mesmo que em pequenas quantidades.

Um dos produtos que tem sido utilizados com essa finalidade é o biocida Grotan[®] OX produzido pela Schülke & Mayr. Este biocida é pertencente à classe dos liberadores de formaldeído, ou seja, é uma substância que durante sua degradação produz moléculas de formaldeído em uma velocidade que varia dependendo das condições químicas e físicas em que se ela encontra e por isso, é potencialmente tóxico. Segundo o fabricante, o Grotan[®] OX pode ainda ser utilizado como conservante em fluidos de circulação, em emulsões técnicas e líquidos de limpeza e sua atividade biocida afeta bactérias, fungos e leveduras.

Considerando a atual e crescente preocupação com os impactos ambientais produzidos pela indústria de forma geral, este trabalho visa avaliar a ecotoxicidade aguda do biocida mencionado através de dois bioensaios: taxa de germinação de sementes e crescimento de brotos de *Lactuca sativa* (conhecida popularmente como alface) e taxa de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina*, sendo estes bioensaios complementares um ao outro por utilizarem organismos pertencentes a níveis tróficos diferentes. O trabalho tem também o intuito de avaliar e incentivar o uso destes bioensaios menos comuns e tidos como alternativos, já que são de alta simplicidade operacional e baixo investimento financeiro se

comparados com os bioensaios tradicionais como o da taxa de mortalidade do microcrustáceo *Daphnia magna*.

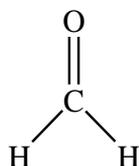
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FORMALDEÍDO

2.1.1 Características Físicas e Químicas

O formaldeído, também chamado de metanal (IUPAC), aldeído metílico, óxido de metileno, entre outros, é um composto orgânico de fórmula química CH_2O e seu número de registro CAS é 50-00-0. É o menor e mais simples aldeído que existe, possuindo o ponto de ebulição de $-19,3^\circ\text{C}$ e ponto de fusão de $-117,0^\circ\text{C}$. Na temperatura ambiente existe na forma de gás incolor com forte odor pungente irritante a vias aéreas e olhos. O formaldeído é altamente reativo, facilmente polimeriza, é inflamável e pode formar misturas explosivas no ar. Devido a sua estrutura molecular (Figura 1) é muito solúvel em solventes polares como água e álcool, o que agrava seu potencial poluente (BEAUCHAMP et al., 2002).

Figura 1 – Fórmula estrutural do formaldeído.



2.1.2 Importância

Ele é de grande importância na indústria química por ser um precursor na produção de diversos compostos orgânicos, principalmente na fabricação de resinas do tipo ureia-formaldeído, fenol-formaldeído e melamina-formaldeído. Estes consomem cerca de 60% da produção mundial de formaldeído (IHS CHEMICAL, 2012). Devido a sua característica biocida, ele também possui diversas utilizações na medicina, em conservação de partes anatômicas e embalsamento, como desinfetante e preservante. Além das aplicações já citadas, podemos também mencionar seu uso na revelação de filmes fotográficos, na indústria do couro e agricultura e como preservante em cosméticos.

2.1.3 Riscos à Saúde e ao Meio Ambiente

Em contrapartida aos benefícios produzidos na indústria e no ramo médico, o formaldeído é perigoso tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. Nos humanos seus efeitos imediatos na forma gasosa, mesmo em concentrações baixas (10 a 20 ppm), são de lacrimejamento abundante, severa sensação de queimação e tosse, podendo ser tolerado por poucos minutos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012). Além disso, diversas instituições conceituadas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER,

2006) apontam o formaldeído como uma substância carcinogênica, dentre elas está a U.S. Department of Health and Human Services (2011), que o listou como “Conhecido por ser um carcinogênico humano”.

No meio ambiente, a maior parte do formaldeído entra na atmosfera, onde ele é rapidamente degradado por fotólise e foto-oxidação por radicais hidroxilas. O formaldeído no solo e na água também é biodegradado em um tempo relativamente pequeno. Na água ele é biodegradado principalmente por hidratação, produzindo metileno glicol.

O formaldeído é tóxico a diversos organismos, mas é biodegradado rapidamente, possui baixa bioacumulação, e a capacidade dos organismos de metabolizá-lo indicam que o impacto do formaldeído no ambiente é bastante limitado quando em baixas quantidades.

(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991)

Em vegetais, o formaldeído exerce efeito sob a enzima EC 4.3.1.3. Essa enzima é responsável por catalisar a desaminação do aminoácido histidina, dessa forma impedindo a obtenção de nitrogênio pelos vegetais de uma das maiores fontes do mesmo. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989)

2.2 GROGAN[®]OX

2.2.1 Características Físicas e Químicas

A Tabela 1 apresenta características e propriedades físico-químicas do Grotan[®]OX. Os dados foram produzidos pelo fabricante.

Tabela 1 - Características e propriedades físico-químicas do Grotan[®]OX.

Aparência	Líquido amarelo claro
Odor	Semelhante a aminas
Densidade a 20°C	1,049 - 1,069 g/mL
Ponto de ebulição	204°C
Solubilidade em água	Totalmente solúvel

Adaptada de: Schülke & Mayr GmbH (2008)

2.2.2 Descrição

O Grotan[®]OX é um biocida de largo espectro produzido pela Schülke & Mayr. De acordo com o fabricante ele pode ser usado em soluções aquosas alcalinas, emulsões técnicas e em fluidos aquosos de sistemas de refrigeração. Ele é efetivo contra várias espécies de bactérias, fungos e leveduras. A Tabela 1 apresenta os micro-organismos para os quais o

Grotan[®]OX foi testado pela Schülke & Mayr e a concentração mínima necessária para a inibição dos mesmos.

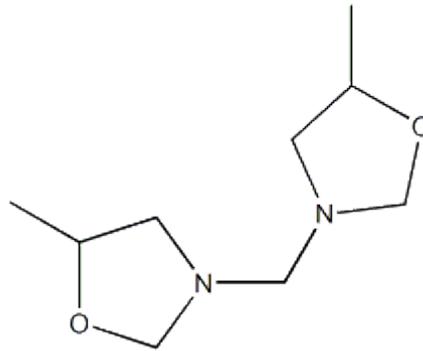
Tabela 2 - Concentrações mínimas necessárias de Grotan[®]OX para a inibição dos micro-organismos.

Bactérias	m/m (%)
<i>Alcaligenes Faecalis</i>	0,015
<i>Enterobacter Cloacae</i>	0,030
<i>Escherichia Coli</i>	0,030
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	0,040
<i>Legionella Pneumophila</i>	<0,1
<i>Proteus Mirabilis</i>	0,040
<i>Proteus Vulgaris</i>	0,030
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	0,030
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	0,015
<i>Pseudomonas Putida</i>	0,125
<i>Staphylococcus Aureus</i>	0,030
Bactérias Redutoras de Sulfatos	
<i>Desulfovibrio Desulfuricans</i>	0,050
Leveduras	
<i>Candida Albicans</i>	0,125
<i>Candida Lipolytica</i>	0,060
<i>Rhodotorula Mucilaginosa</i>	0,030
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	0,125
Fungos	
<i>Aspergillus Niger</i>	0,030
<i>Fusarium Oxysporum</i>	0,030
<i>Hormoconis Resinae</i>	0,150
<i>Penicillium Funiculosum</i>	0,015

Adaptada de: Schülke & Mayr GmbH (2008)

O Grotan[®]OX possui como substância ativa a 3,3'-Metilenobis[5-metiloxazolidina], número de registro CAS 66204-44-2. Esta é uma substância que em sua degradação natural libera moléculas de formaldeído, fazendo com que o Grotan[®]OX se enquadre na classe de biocidas liberadores de formaldeído.

Figura 2 - Estrutura molecular da 3,3'-Metilenobis[5-metiloxazolidina].



De acordo com o Het College Voor De Toelating Van Gewasbeschermingsmiddelen En Biociden (2012) as propriedades biocidas da substância ativa do Grotan[®]OX, devem-se exclusivamente ao formaldeído liberado por ela.

A quantidade de formaldeído liberada pelo Grotan[®]OX pode chegar a 41,3% (valor máximo quantificado) ou a 48,4% (valor máximo teórico) em massa segundo Henriks-Eckerman et al. (2008).

2.3 ENSAIOS COM *ARTEMIA SALINA*

2.3.1 Introdução

Os ensaios com *Artemia salina* apresentam como principal vantagem sua simplicidade operacional. Para esses ensaios toxicológicos não há necessidade de se manter uma cultura dos espécimes, os cistos de *Artemia salina* são facilmente encontrados em lojas de suprimentos para aquários e podem ser eclodidos sem dificuldades (PERSOONE, 1984).

Os preparativos para o início do teste começam de 24 a 48 horas antes do seu início. Também se deve considerar que este ensaio não envolve a alimentação das *Artemia salina*, isso só é possível devido a rapidez dos testes, que são concluídos em cerca de 3 dias após a eclosão dos cistos (LABORATORY OF ECOTOXICOLOGY AND LCA), esses são, portanto, ensaios de ecotoxicidade aguda.

2.3.2 Características do Organismo

Artemia salina é uma espécie de microcrustáceo da ordem *Anostraca*, que pode ser utilizada como bioindicador de toxicidade. Ela é um crustáceo filtrador que se alimenta basicamente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio (SANTOS, 2011).

Os cistos eclodem produzindo os *Nauplii*, que possuem aproximadamente 0,5mm de comprimento. Estes possuem um único olho simples que é utilizado para detectar a presença e a direção da luz. Os *Nauplii* nadam na direção à luz, diferentemente dos espécimes adultos, que nadam no sentido de se afastar dela. Nos estágios posteriores aos *Nauplii*, as *Artemia salina* desenvolvem outros dois olhos mais eficientes, mas mantém o olho inicial. (BRINE SHRIMP DIRECT, 2012)

A *Artemia salina* passa por vários estágios antes de se tornar adulta. No primeiro estágio, o *Nauplius*, Figura 3, possui uma coloração alaranjada, um olho e 3 pares de apêndices com funções sensoriais (primeiro par), de locomoção e filtração (segundo par) e mandibulares (terceiro par). Neste estágio o *Nauplius* ainda não se alimenta. Após cerca de oito horas o animal entra no segundo estágio, onde ele começa a se alimentar. Até se tornar adulto, Figura 4, o espécime passa por cerca de 15 transformações que, em condições favoráveis, demoram cerca de 8 dias. (STAPPEN, 1996)

Figura 3 - *Nauplius* de *Artemia salina*.



Fonte: Bardal, T. (2012)

Figura 4 - Espécime adulto de *Artemia salina*.



Fonte: Sykora, V. (2012)

Apesar de ser uma espécie de água salgada, a *Artemia salina* não se desenvolve no mar, apenas em lagos de água salgada.

Os cistos de *Artemia salina* são quase exclusivamente produzidos nos Estados Unidos da América, isso porque a maioria da produção é feita pela Ocean Star International. Estes cistos podem ser estocados por longos períodos. Se mantidos longe de umidade e em baixas temperaturas, eles podem ser eclodidos (com alta taxa de eclosão) até quatro anos após sua estocagem (LABORATORY OF ECOTOXICOLOGY AND LCA).

2.3.3 Eclosão dos Cistos

A eclosão dos cistos de *Artemia salina* deve ser feita em solução salina. A solução pode ser preparada em laboratório, ou pode-se também optar por utilizar misturas de sais comercializadas como “Instant Ocean®” e similares diluídos em água destilada.

A solução de sal marinho artificial deve ser aerada com a ajuda de uma bomba de aeração para garantir oxigenação suficiente para a sobrevivência dos neonatos de *Artemia salina* (chamados de *Nauplii*) e manter a água sob leve agitação.

Uma pequena quantidade de cistos deve ser colocado em uma pera de separação ou Becker de 500 mL com 250 mL da solução de sal marinho artificial. A pera deve ficar sob leve aquecimento (27-29°C) produzido por uma lâmpada incandescente por 18-48 horas. Após esse período de eclosão dos cistos, os *Nauplii* já podem ser utilizados nos ensaios toxicológicos.

2.3.4 Método

As soluções à serem analisadas devem ser preparadas com soluções de sal marinho artificial. Cinco mL das soluções contendo as diferentes concentrações do analito devem ser preparadas em duplicata ou triplicata. Em cada uma das soluções são adicionados dez *Nauplii*. Não é necessária aeração se a solução estiver bem dispersa devido a grande superfície de contato com o ar. As soluções são mantidas a cerca de 25°C. Após o tempo estipulado para o teste, deve-se contar os indivíduos vivos.

2.4 ENSAIOS COM *LACTUCA SATIVA*

2.4.1 Introdução

Sementes de plantas têm se mostrado excelentes organismos para bioensaios de toxicidade. Desde que as sementes sejam mantidas em ambiente seco, elas permanecem dormentes e podem ser estocadas por longos períodos sem perder a viabilidade. Uma vez hidratadas rompe-se seu estado de dormência e inicia-se a fase de germinação, na qual as sementes passam por mudanças fisiológicas rápidas, se tornando muito sensíveis a qualquer estresse ambiental (CUNHA, 2011).

O ensaio usando *Lactuca sativa* é considerado um meio simples, rápido e sensível de avaliar o risco potencial de substâncias químicas ao meio ambiente (GOPALAN, 1999).

O teste se baseia na análise fitotóxica de contaminantes na germinação e no crescimento da raiz de plantas nos primeiros dias de seu crescimento (BAUGUR-GONZÁLEZ, 2011).

2.4.2 Características do Organismo

A *Lactuca sativa*, comumente conhecida como alface, é uma planta de porte herbáceo, de ciclo anual, com um caule carnudo e de tom verde claro. Algumas variedades apresentam-se avermelhadas nas extremidades. As suas folhas dispõem-se em forma de roseta ou de repolho conforme a variedade. Normalmente possuem folhas grandes e lisas, mas por vezes frisadas, com a falta de água entram rapidamente em floração (NPLANTAS, 2012). A Figura 5 apresenta um espécime de *Lactuca sativa*.

Figura 5 - Um espécime de *Lactuca sativa*.



Fonte: Romaine Variety (2012).

2.4.3 Método

Soluções teste recentemente preparadas devem ser adicionadas a placas de Petri que contenham um material inerte para a retenção do líquido. As sementes devem ser colocadas nas placas de Petri de forma homogênea e que nada impeça o seu crescimento. As placas são vedadas para que não sequem e incubadas no escuro até que 65% das sementes controle tenham germinado e suas raízes tenham crescido pelo menos 20 mm. O número de sementes germinadas deve ser contado e os comprimentos das raízes medidos.

2.5 ENSAIOS COM *DAPHNIA MAGNA*

2.5.1 Introdução

Espécies do gênero *Daphnia* tem grande participação na comunidade zooplânctônica no mundo todo. Elas tem tido sua biologia amplamente estudada. Atualmente a espécie *Daphnia magna* é uma das espécies mais utilizadas em vários países em ensaios de toxicidade aguda de substâncias puras e descargas industriais complexas (BEATRICE, 2004).

2.5.2 Características do Organismo

Daphnia magna, Figura 6, é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 milímetros. Ele atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas (KERSTING, 1976)

Figura 6 - Espécime de *Daphnia magna*.



Fonte: The Evolution of phenotypic plasticity.

2.5.3 Método

O princípio do método consiste na exposição de indivíduos jovens de *Daphnia magna* por um período de 24 a 48 horas a várias diluições de uma amostra, após o qual é verificado seu efeito sobre a capacidade natatória dos organismos, ou seja, sobre sua mobilidade (KNIE e LOPES, 2004)

2.5.4 Cultura das *Daphnia magna*

A cultura dos organismos testes deve começar pelo menos três semanas antes do teste para garantir um número suficiente de neonatos. Um mínimo de 16 horas de luz por dia deve ser mantido para o desenvolvimento das *Daphnia magna*. O EPA aconselha que se mantenha pelo menos cinco recipientes de cultura (com idealmente 3 litros de solução) para evitar a perda da cultura caso ocorra a morte de todas as *Daphnia magna* em um recipiente. Em cada recipiente deve-se manter cerca de 30 espécimes adultos, assim cerca de 300 neonatos serão produzidos semanalmente. Os recipientes devem ser lavados com água destilada e esponja para a retirada de espécimes mortos e alimento acumulado. Mensalmente, os recipientes devem ser bem lavados com detergente durante a troca do meio de cultura.

O cuidado com o meio de cultura é essencial para evitar um *crash* populacional, onde todos os indivíduos morrem rapidamente. Ele deve ser trocado três vezes por semana. Durante

a troca deve-se transferir de 25 a 30 espécimes adultos para cerca de 300 mL do meio de cultura antigo em um recipiente temporário com a ajuda de uma pipeta. Lava-se o recipiente de cultura e se adiciona um novo meio de cultura. Os 300 mL do meio de cultura antigo são então transferidos para o recipiente de cultura permanente.

A população deve ser restringida sempre que atingir cerca de 200 indivíduos por recipiente a fim de evitar um *crash* populacional e a produção de machos e efípios.

2.5.5 Alimentação e Preparo do Alimento

Alimentar as *Daphnia magna* com o alimento correto e na quantidade certa é muito importante. O alimento ideal é uma mistura (YCT) de levedura, ração para truta (comida em flocos), e CEROPHYLL[®], junto com algas verdes (*Selenastrum Capricornutum*).

A preparação do YCT consiste basicamente na dissolução dos produtos em água ultra-pura, seguida de sua decantação e filtragem do sobrenadante. As soluções obtidas são misturadas em partes iguais.

O cultivo das algas verdes é um pouco mais complexo. Deve-se preparar o meio de cultura das algas com 1 mL das soluções descritas na Tabela 3, que é então diluído à 1 L com água ultra-pura e filtrado.

Tabela 3 - Concentrações de nutrientes nas soluções estoque de alimento para algas verdes.

Composto	Quantidade à ser dissolvida em 500 mL de água
Macronutrientes	
MgCl ₂ .6H ₂ O	6,08 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,20 g
NaNO ₃	12,75 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,35 g
K ₂ HPO ₄	0,522 g
NaHCO ₃	7,50 g
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	92.8 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	208,0 mg

ZnCl ₂	1,64 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	79,9 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,714 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3,63 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,006 mg
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	150,0 mg
Na ₂ SeO ₄	1,196 mg

Fonte: Weber, 1993.

Dois tipos de culturas de algas verdes devem ser mantidos: Culturas estoque e culturas alimento.

As culturas estoque devem ser preparadas com uma mistura de 1 mL de uma solução inicial de algas em 250 mL do meio de cultura. As culturas devem ser agitadas 2 vezes ao dia, a mão ou por agitação magnética. Para se fazer novas culturas estoque, deve-se transferir alguns mililitros para um novo meio de cultura, com aproximadamente 100 mL. As culturas devem ser examinadas ao microscópio semanalmente a procura de contaminação microbiana.

Culturas alimento são preparadas com uma semana de antecedência ao uso. Elas são produzidas a partir da mistura de 20 mL e 1 L de meio de cultura novo. Para a alimentação, deve-se preparar um concentrado por centrifugação dos meios de cultura alimento. Cerca de 3 L devem ser concentrados a 150 mL.

As *Daphnia magna* devem ser alimentadas com 4,5 mL de YCT e 2 mL de concentrado de algas verdes 3 vezes por semana. Nos outros dias, deve-se alimentá-las com apenas 2 mL de algas, também deve-se e agitar o meio de cultura das *Daphnia magna* para levar a suspensão novamente o material já depositado (WEBER, 1993).

3 SITUAÇÃO ATUAL

Os bioensaios de ecotoxicidade são experimentos muito usados atualmente na avaliação de amostras ambientais, de produtos químicos e de efluentes industriais e sanitários. Ensaios deste tipo podem ser agudos ou crônicos e se dividem pelo nível trófico e espécie dos organismos usados como indicadores.

Níveis tróficos são níveis alimentares que representam conjuntos bióticos com hábitos alimentares semelhantes. Os níveis se dividem basicamente em produtores, consumidores primários, secundários, terciários e decompositores (FONSECA, 2012; FARIA, 2012).

Atualmente a legislação brasileira determina, em alguns casos, a necessidade da utilização de bioensaios ecotoxicológicos. Alguns exemplos dos casos citados são a resolução 344/2004 do CONAMA que estabelece a realização de ensaios ecotoxicológicos em materiais dragados, com base na caracterização ecotoxicológica dos sedimentos, e a resolução 430/2011 também do CONAMA que define que os critérios de ecotoxicidade para corpos hídricos devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos realizados no efluente utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

Em geral, para os bioensaios de ecotoxicidade, são preferidos ensaios com organismos que possuem uma metodologia padronizada por órgãos reconhecidos nacional ou internacionalmente como a ABNT e o USEPA.

Os bioensaios utilizando *Artemia salina* e *Lactuca sativa* como bioindicadores de toxicidade ainda são pouco difundidos (principalmente em laboratórios prestadores de serviços) apesar de serem descritos na literatura há mais de 20 anos (PRESONNE, 1984; GREENE, 1989).

A seguir são citados e descritos alguns dos principais organismos utilizados atualmente em bioensaios ecotoxicológicos.

3.1 CRUSTÁCEOS

3.1.1 *Daphnia magna*

Um dos principais organismos usados como bioindicadores em todo mundo é a *Daphnia magna*. Ela é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 milímetros que atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas (KERSTING, 1976). Ela é usada em ensaios de ecotoxicidade aguda com amostras de efluentes industriais e sanitários, produtos químicos, amostras ambientais de água superficial,

água subterrânea, água intersticial e elutriatos de sedimentos (APLISYA, 2012; BIOENSAIOS, 2012; ECOTOX, 2012).

3.1.2 *Daphnia similis*

É um organismo muito semelhante e pertencente o mesmo gênero da *Daphnia magna* e é uma alternativa ao seu uso em ensaios agudos (APLISYA, 2012; BIOENSAIOS, 2012; ECOTOX, 2012).

3.1.3 *Ceriodaphnia dubia*

Este organismo pertence a mesma família das *Daphnias* e possui hábitos semelhantes a elas. A *Ceriodaphnia dubia* se diferencia por ser usada principalmente como organismo indicador em ensaios crônicos (APLISYA, 2012; BIOENSAIOS, 2012; ECOTOX, 2012).

3.1.4 *Mysidopsis juniae*

Misidáceo utilizado em ensaios de ecotoxicidade aguda com amostras de efluentes líquidos, produtos químicos, elutriatos de sedimento e fração hidrossolúvel de óleos. Essa espécie é amplamente distribuída em ambientes marinhos e estuarinos e tem sido bastante utilizada em avaliações ecotoxicológicas, devido à sensibilidade a vários agentes tóxicos, facilidade de manuseio e cultivo e curto ciclo de vida. (VITALI, 2011)

3.1.5 *Hyalella azteca*

A principal espécie usada em ensaios com amostras de sedimentos. Esses anfípodas escavadores marinhos são herbívoros e detritívoros, constituindo um importante elo na cadeia alimentar de corpos de água. São utilizados em ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica (VITALI, 2011; ECOTOX, 2012; BIOENSAIOS, 2012).

3.2 PEIXES

3.2.1 *Danio rerio*

Muito usado em testes de ecotoxicidade, é um peixe tropical de água doce capaz de adaptar-se facilmente a variadas condições ambientais naturais e artificiais. Esses peixes vivem em média três anos e atingem no máximo 5 centímetros de comprimento. Eles são onívoros, de comportamento pacífico e muito ativos. Na natureza vivem em cardumes, e por isso podem ser mantidos em número relativamente grande num mesmo aquário (ECOTOX, 2012; BIOENSAIOS, 2012; APYSIA, 2012).

3.3 BACTÉRIAS

3.3.1 *Vibrio fischeri*

É uma bactéria marinha luminescente usada em testes de ecotoxicidade aguda. Em condições ambientais favoráveis, essas bactérias emitem luz naturalmente, necessitando, para isto, oxigênio em concentrações acima de 0,5 mg/L. O sistema de teste é baseado na medição da luminescência emitida pela bactéria (BIOENSAIOS, 2012; ECOTOX, 2012; APLYSIA, 2012).

3.4 ALGAS

3.4.1 *Selenastrum capricornutum*

Esta é uma alga verde unicelular de água doce que pode ser facilmente cultivada em laboratório. A sua morfologia uniforme faz com que seja ideal para contagem via contador de partículas eletrônico. Seu crescimento é rápido o suficiente para que elas possam ser contadas após 72 horas. Essas algas são usadas normalmente em testes agudos (BIOENSAIOS, 2012; ECOTOX, 2012).

3.4.2 *Skeletonema costatum*

A *Skeletonema costatum* é uma alga unicelular de água salgada utilizada em ensaios de ecotoxicidade crônica em amostras de diversas origens (GOLDING, 1998; BIOENSAIOS, 2012; APLYSIA, 2012).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar a ecotoxicidade do biocida Grotan[®]OX em condições que representam situações de uso do biocida em tanques de armazenamento de biodiesel ou simulam condições ambientais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa* em amostras aquosas contendo 0,1; 1,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 1000,0 ppm de Grotan[®]OX.
2. Realizar bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa* em amostras aquosas contendo 50 ppm Grotan[®]OX com os pHs ajustados a 3, 5, 7 e 9.
3. Realizar bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa* em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com 0, 200 e 400 ppm de Grotan[®]OX por períodos de 12, 24 e 48 h.
4. Fazer uma análise dos custos dos bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa* e compará-los com o custo de um bioensaio com *Daphnia magna*.

5 PROPOSTA TECNOLÓGICA

Os bioensaios ecotoxicológicos são de grande importância por permitirem avaliar os possíveis impactos ambientais de produtos químicos e efluentes de diversas composições, dentre outros, que possam estar presentes no meio-ambiente com possibilidade de causar danos em diferentes níveis.

Além disso, os bioensaios de ecotoxicidade têm sido exigidos pela legislação brasileira, como é o caso das Resoluções nº 357/2005 e 430/2011 do CONAMA. A Resolução nº 357/2005 foi implementada para prevenir e controlar o uso abusivo dos recursos hídricos que resulta na escassez de água de boa qualidade. Segundo ela, ensaios de ecotoxicidade são “[...]ensaios realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos aquáticos[...]”. A Resolução 430/2011 define que os critérios de ecotoxicidade para corpos hídricos devem basear-se em resultados de ensaios ecotoxicológicos realizados no efluente utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

Considerando a importância dos bioensaios ecotoxicológicos, este trabalho tem como proposta tecnológica: a utilização de dois organismos, um aquático e um terrestre, de diferentes níveis tróficos como bioindicadores em bioensaios de ecotoxicidade aguda aplicados ao biocida Grotan[®] OX através da taxa de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* e da taxa de germinação de sementes, crescimento da raiz e pesagem dos brotos de *Lactuca sativa*.

Estes bioensaios apresentam vantagens operacionais e financeiras se comparados a bioensaios tradicionais como o da taxa de mortalidade de *Daphnia magna* e podem, inclusive, ser aplicados industrialmente para o monitoramento da ecotoxicidade de efluentes e águas residuais.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

A matriz do biocida analisado foi fornecida pela empresa que solicitou o estudo. Segundo a empresa, ela era constituída unicamente da sua substância ativa, o 3,3'-Metilenobis[5-metiloxazolidina], ou seja, era pura. O grau de pureza não foi especificado.

Foram utilizados cistos de *Artemia salina* da marca MARAMAR PET[®]. O produto é vendido sob o nome “Ovos de Alta Eclosão” e foi adquirido em loja de suprimentos para aquário.

Para a produção da solução de sal marinho artificial foi feita uma solubilização em água destilada do produto Meersalz da marca SERA[®]

Foram usadas sementes de *Lactuca sativa* da marca ISLA[®]. O produto é vendido sob o nome “Alface Itapuã 401”.

O cloreto de sódio (NaCl) usado era da marca QEEL[®] e seu grau de pureza P.A..

O dicromato de potássio usado possuía grau de pureza P.A. e foi fornecido pela Vetec[®].

Um pH-metro da marca Micronal[®] modelo B474 foi usado para ajuste do pH das soluções quando necessário.

A bomba de aeração usada era da marca ALEAS[®], modelo AP-1688.

A balança analítica que foi usada era da marca Denver Instrument[®] modelo APX-200

Foi usado diesel B10, uma mistura de diesel contendo 10% de biodiesel. O diesel foi um S50, com baixo teor de enxofre e o biodiesel, derivado de soja e sebo (75% soja e 25% sebo). Ele foi esterilizado por filtração a vácuo em membrana de éster de celulose de porosidade 0,22µm, da marca Millipore[®].

O ácido clorídrico (HCl) utilizado era da marca Merck[®] e seu grau de pureza era P.A.. Ele foi diluído em água até cerca de 1M antes de ser usado.

O hidróxido de sódio usado foi adquirido da Quimibrás[®] e possuía grau de pureza P.A..

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Preparo das Amostras

Os experimentos com Grotan[®]OX foram realizados considerando os seguintes fatores:

- Variação de concentração
- Variação de pH
- Variação de tempo de contato água-diesel

O preparo das amostras usadas nos bioensaios com *Lactuca sativa* e *Artemia salina* ocorreu conforme descrito abaixo, mas é importante acrescentar que uma etapa adicional foi feita ao final dos preparos nas porções utilizadas nos bioensaios com *Artemia salina*. A etapa se constituiu da adição de uma quantidade de sal marinho artificial suficiente para produzir uma concentração de 35g/L nas amostras. Essa medida foi tomada pelo fato de que a *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada e, portanto, encontra dificuldades de sobrevivência em águas com baixa ou nenhuma salinidade.

A) *Variação de Concentração*

Foram avaliadas concentrações de 0,1; 1,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 1000,0 ppm de Grotan[®]OX em água destilada. Esses valores foram escolhidos por abrangerem uma ampla faixa concentração e, além disso, os valores 200 e 400 ppm são usados industrialmente. Também foram avaliadas soluções branco contendo apenas água destilada e soluções controle. Para os bioensaios com *Artemia salina* usou-se um controle de dicromato de potássio nas concentrações 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ppm e para os bioensaios com *Lactuca sativa* um controle de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações 0,2; 0,1; 0,075; 0,050; 0,025 mol/L.

Para as *Artemia salina* foi feito um teste branco adicional contendo apenas água destilada no qual não se adicionou sal posteriormente. Este experimento teve o intuito de confirmar a necessidade da adição de sal nas outras amostras.

B) *Variação de pH*

Nestes testes foram usadas 4 soluções aquosas de 50 ppm de Grotan[®]OX que tiveram o pH ajustado por soluções diluídas de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Os valores de pH escolhidos foram 3, 5, 7 e 9. Neste caso também foram feitos testes em branco, ou seja, amostras de água destilada tiveram seus valores de pH ajustados à 3, 5, 7 e 9 e foram testadas da mesma forma. Para evitar um alteração no pH, o sal foi adicionado antes do ajuste do pH nos casos necessários.

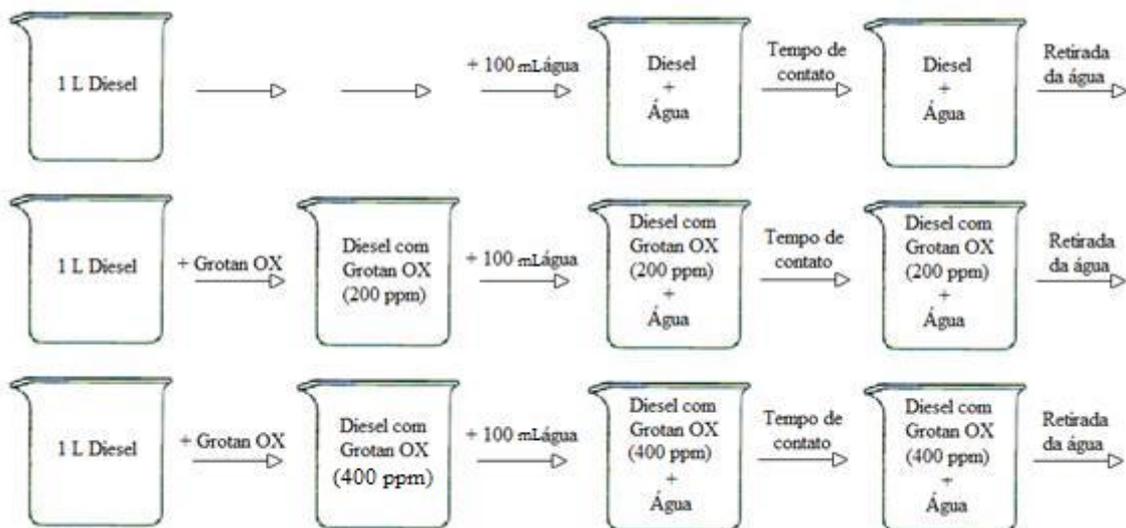
C) *Variação de Tempo de Contato Água-Diesel*

O objetivo destes testes foi a avaliação da quantidade de Grotan[®]OX ou agente biocida transferido para a água quando esta entra em contato, por um tempo determinado, com diesel

ao qual foi adicionado o Grotan[®]OX. Os tempos de contato analisados foram 12, 24 e 48 horas e os experimentos foram realizados com diesel contendo 200 e 400 ppm de Grotan[®]OX, além de um teste em branco onde diesel livre de Grotan[®]OX foi utilizado.

Para realização dos experimentos Grotan[®]OX foi adicionado a duas amostras de diesel de 1 L cada, a fim de se obter concentrações de 200 e 400 ppm do biocida. Após a homogeneização das amostras, 100 mL de água ultra pura foram adicionados a cada um dos volumes de diesel e outros 100 mL foram adicionados a uma amostra de 1 L de diesel livre de biocida, para produção de um teste branco. As soluções foram mantidas em repouso e à temperatura ambiente até que fosse atingido o tempo de contato água-diesel estabelecido. A água foi, então, retirada com auxílio pipetas volumétricas. Todo o processo foi feito 3 vezes, uma para cada tempo de contato água-diesel, produzindo um total de 9 amostras. O Esquema 1 ilustra o procedimento descrito para um tempo de contato.

Esquema 1 - Produção das amostras do experimento tempo de contato água-diesel.



6.2.2 Bioensaio Taxa de Mortalidade de *Artemia salina*

A metodologia usada para os ensaios foi adaptada de Meyer et al. (1982).

6.2.2.1 Eclosão dos Cistos de *Artemia salina*

Preparou-se uma solução salina a partir da dissolução de 35 gramas do sal marinho artificial em 1 litro de água ultra-pura. Após a dissolução, a solução foi aerada por aproximadamente 10 minutos com a bomba de aeração para garantir uma oxigenação da água suficiente para a eclosão e sobrevivência dos organismos teste. Feita a solução salina, pesou-

se cerca de 0,1 g des cistos de *Artemia salina* em balança analítica. Os cistos, juntamente com 250 mL da solução foram transferidos para um funil de separação de 500 mL que foi mantido sob leve aquecimento com auxílio de uma lâmpada incandescente de 150 Watts mantida a cerca de 25 cm de distância do funil, um exemplo é demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Funil de separação com cistos de *Artemia salina*.



Fonte: Cunha (2011)

Após 48 horas, os cistos estão eclodidos e os experimentos são iniciados. Este tempo foi observado para que se evitasse uma variação na idade dos *Nauplii* usados como bioindicadores em diferentes rodadas de testes, ou seja, os espécimes não utilizados naquele momento foram descartados e um novo procedimento de eclosão foi efetuado para rodadas de testes posteriores.

6.2.2.2 Realização dos Experimentos

Uma pequena quantidade, em torno de 10 mL, contendo um grande número de *Nauplii* foi retirada do funil de separação e transferida à um copo de Becker. Isso foi possível devido ao fototropismo apresentado pelos *Nauplii*. Utilizando uma pequena fonte de luz, se atraiu uma grande quantidade de espécimes para a parte mais estreita do funil onde eles foram coletados com uma pipeta.

Para cada amostra analisada (por exemplo, a solução de 1000,0 ppm de Grotan[®] OX) se procedeu da seguinte maneira: algumas gotas da solução com alta concentração de *Nauplii* foram pingadas em uma placa de Petri que já continham cerca de 5 mL da amostra analisada. As placas de Petri foram usadas neste caso para possibilitar a formação de filmes finos de líquido, o que, posteriormente, facilitou a difícil visualização e coleta dos *Nauplii* devido ao seu tamanho extremamente pequeno (aproximadamente 1 mm de comprimento). Os 5 mL da

solução analisada foram adicionados à placa para amenizar o efeito da diluição na etapa seguinte (quando se transfere uma pequena quantidade de líquido contendo os espécimes para o recipiente de análise). Com a ajuda de pipetas Pasteur se coletou 30 *Nauplii* da placa de Petri e os transferiu para 3 recipientes de análise, cada um contendo 5 mL da mesma amostra, produzindo 3 recipientes com 10 *Nauplii* cada. Desta maneira, os testes foram realizados em triplicata.

Os recipientes de análise usados foram copos cilíndricos de polipropileno com diâmetro aproximado de 3 cm. Eles foram tampados e mantidos sob aquecimento (semelhantemente ao processo de eclosão) por 48 horas, quando se dá o término do teste.

Após o tempo de exposição, os conteúdos dos recipientes foram transferidos a placas de Petri e seus espécimes contados, identificando vivos e os mortos pela observação de presença ou ausência de movimento em um intervalo mínimo de 10 segundos.

6.2.3 Bioensaios Taxa de Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa*

A metodologia usada nestes bioensaios foi adaptada de Keddy et al. (1995).

6.2.3.1 Realização dos Experimentos

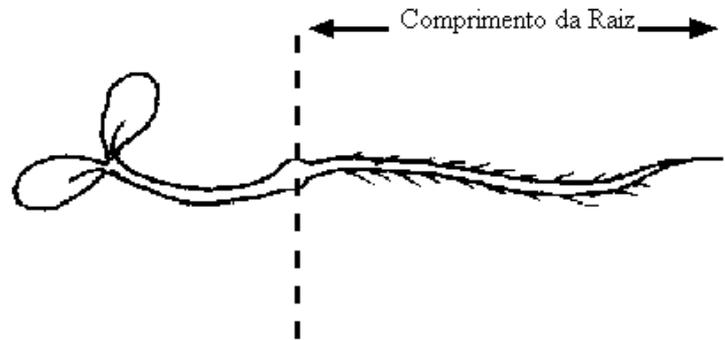
Placas de Petri foram forradas com papel filtro onde se espalhou 4 pequenos chumaços de algodão próximos a borda de cada placa. Os algodões e o papel filtro absorvem o líquido analisado, mas mantêm uma umidade adequada para o crescimento dos brotos. Foram, então, depositadas 10 sementes de *Lactuca sativa* afastadas entre si, dos algodões e das bordas para que nada impedisse seu crescimento.

Às placas se adicionou 10 mL da solução testada de maneira homogênea, encharcando o papel filtro e os algodões. Cada amostra foi adicionada à 3 placas de Petri para obtenção de triplicatas no experimento.

Após a adição da amostra, as placas foram cobertas e vedadas com filme plástico para que se mantivesse a umidade e protegesse os brotos de qualquer contaminação. Assim eles foram mantidos no escuro e a temperatura ambiente até o final do teste.

Depois de 5 dias, o teste foi encerrado e os resultados coletados. As sementes germinadas foram contadas, pesadas (em conjunto, por placa de Petri) em balança analítica e os comprimentos das raízes das sementes que brotaram foram medidos com uma régua. A Figura 8 demonstra a região medida.

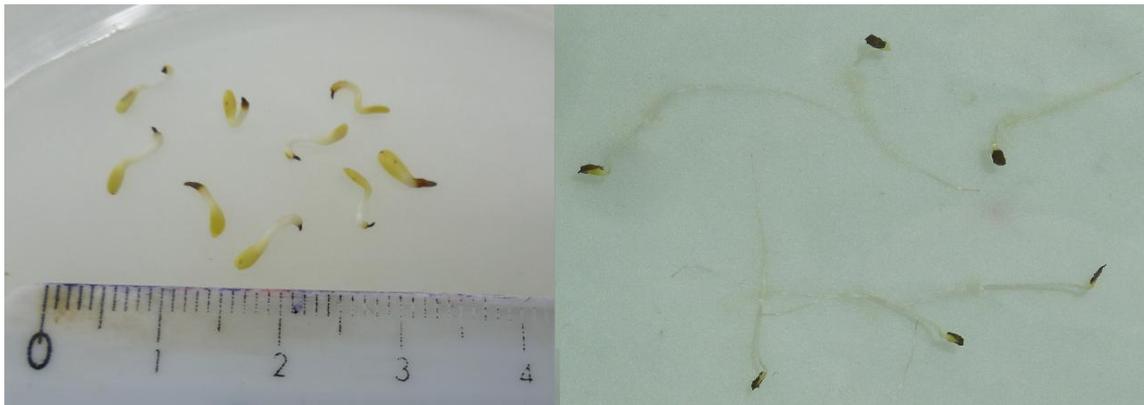
Figura 8 - Indicação da região que limita a raiz da *Lactuca sativa*.



Adaptado de Lardieri (2012)

Os brotos foram pesados devido ao crescimento mínimo (<1 mm) das raízes em alguns casos apesar de o broto ter apresentado um crescimento razoável. Foi então proposta essa alternativa à medida da raiz como parâmetro de desenvolvimento da planta. A Figura 9 exemplifica os casos descritos e os compara com raízes de crescimento normal.

Figura 9 - À esquerda, brotos que apresentaram crescimento de raiz nulo ou insignificante e à direita brotos que apresentaram crescimento normal da raiz.



As sementes consideradas não germinadas foram aquelas que aparentemente não sofreram modificações durante o período de exposição.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

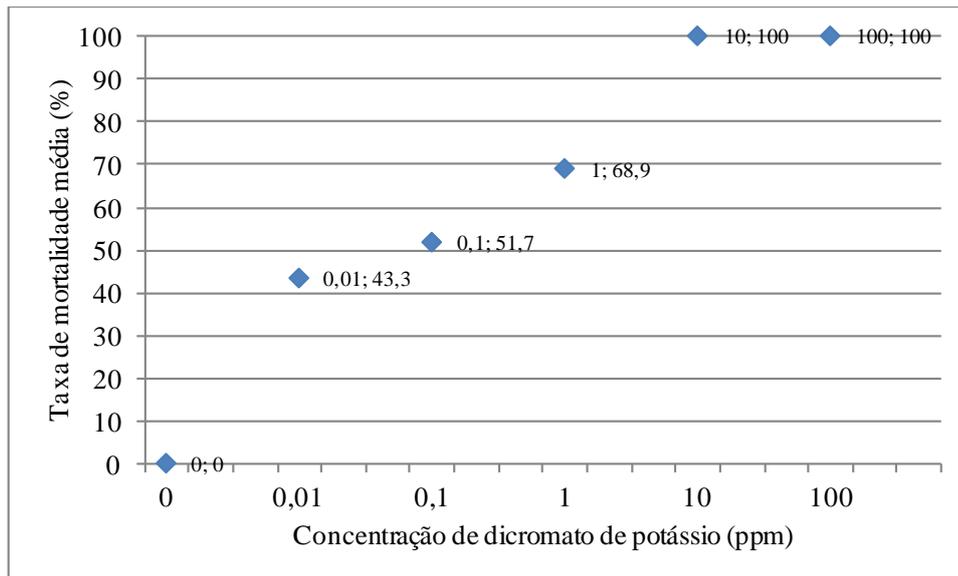
7.1 BIOENSAIOS COM *ARTEMIA SALINA*

Os testes feitos com *Artemia salina* produziram os dados apresentados a seguir. Esses dados, denominados “taxas de mortalidade média”, foram calculados da seguinte maneira: O número de espécimes mortos em uma triplicata foi dividido pelo número de espécimes encontrados na mesma (em alguns casos não se conseguiu recuperar todos os 10 *Nauplii* devido ao seu tamanho), fez-se, então, a média dos valores obtidos nas triplicatas e se multiplicou o resultado obtido por cem.

7.1.1 Variação de Concentração

O Gráfico 1, abaixo, demonstra os resultados obtidos para as diluições do controle de dicromato de potássio. Deve-se observar que a escala do eixo das abscissas do gráfico está fora de proporção para melhor visualização.

Gráfico 1 – Taxa de mortalidade média de *Artemia salina* em soluções com diferentes concentrações de dicromato de potássio.

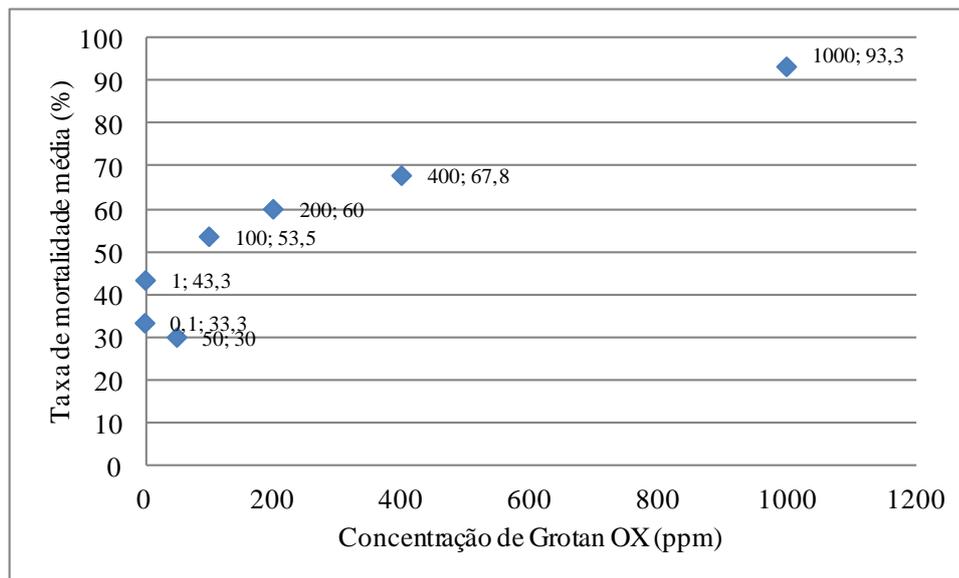


As diluições do controle tinham o objetivo de comprovar a sensibilidade do organismo teste a uma substância tóxica, o que foi comprovado. Pode-se observar também, que a relação entre a concentração de dicromato de potássio e a taxa de mortalidade não é de primeira ordem.

Na amostra de água pura, na qual nada foi adicionado, inclusive o sal marinho, a taxa de mortalidade foi de 100% em todas as triplicatas. Esse teste cumpriu seu propósito de justificar a adição de sal marinho nas outras amostras analisadas.

O Gráfico 2 apresenta os resultados de taxa de mortalidade para diferentes concentrações de Grotan[®] OX.

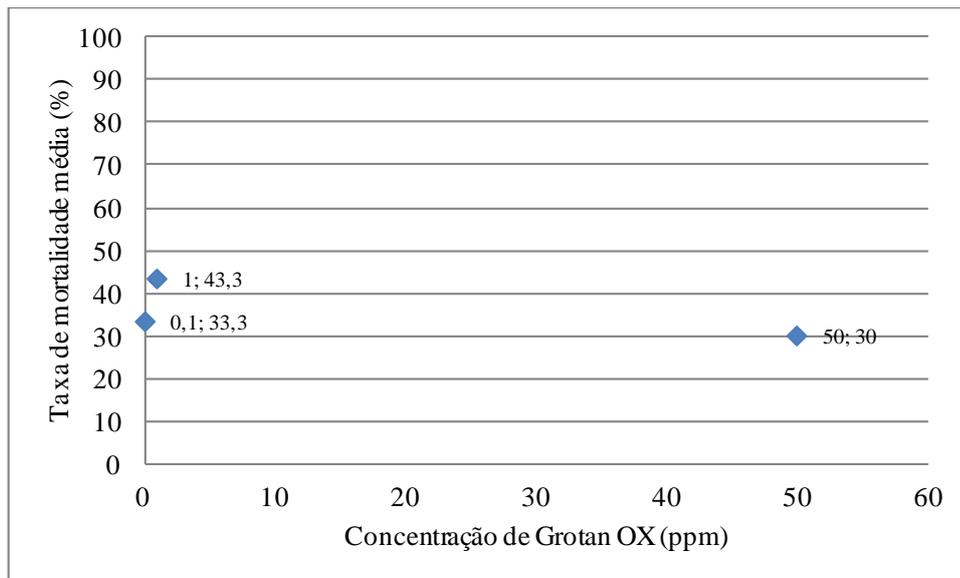
Gráfico 2 – Taxa de mortalidade média de *Artemia salina* em soluções com diferentes concentrações de Grotan[®] OX.



Neste gráfico podemos visualizar o efeito do Grotan[®] OX sob as *Artemia salina*. Observa-se uma forte tendência de aumento da taxa de mortalidade com o aumento da concentração do biocida, o que comprova a toxicidade do biocida a estes organismos. Na concentração de 50 ppm a resposta dos organismos indicadores não ocorreu como esperado, houve uma discrepância nos valores considerando-se que o aumento do biocida não provocou um aumento da taxa de mortalidade. A seção do gráfico contendo as concentrações mais baixas de Grotan[®] OX, 0,1; 1 e 50 ppm, é mostrada em maior escala no Gráfico 3.

Apesar da discrepância observada, a resposta do organismo indicador foi satisfatória. Se desconsiderarmos o ponto anômalo da curva, obtemos uma linha de tendência bastante homogênea, principalmente entre os valores 100 e 1000 ppm.

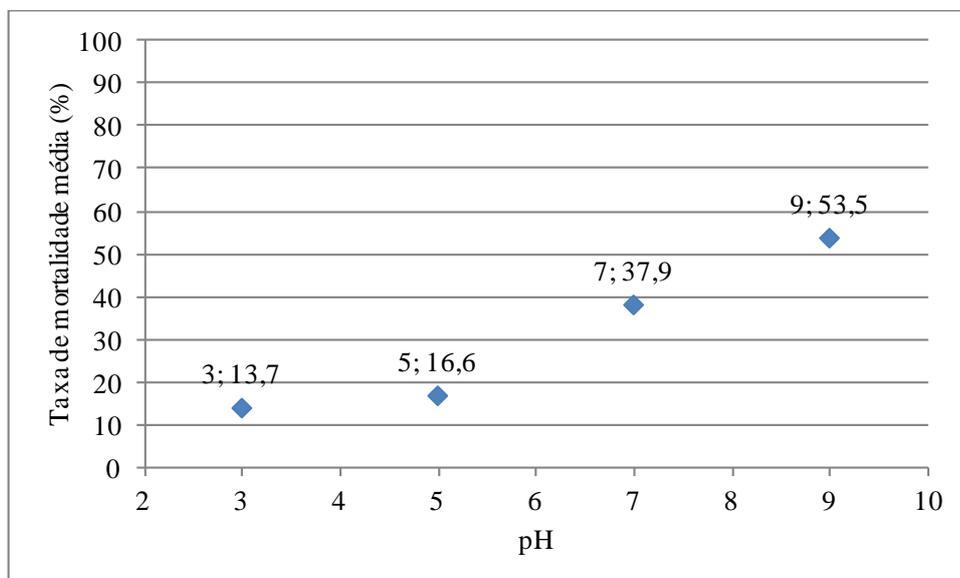
Gráfico 3 – Taxa de mortalidade média de *Artemia salina* em soluções com diferentes concentrações Grotan[®]OX.



7.1.2 Variação de pH

Suspeitava-se que a liberação de formaldeído pelas moléculas de 3,3'-Metilenobis[5-metiloxazolidina] poderia depender do pH da solução. O teste branco de variação de pH produziu os resultados apresentados no Gráfico 4.

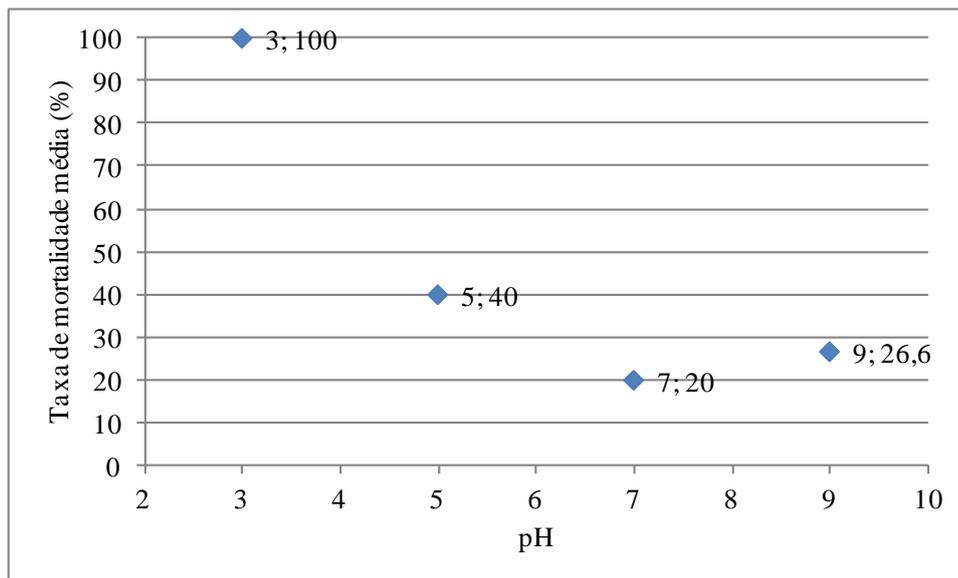
Gráfico 4 – Taxa de mortalidade média de *Artemia salina* em soluções com diferentes pHs.



Observando o gráfico vemos que em todos os casos, com o aumento do pH, ouve também um aumento da mortalidade dos espécimes. Isso indica que as *Artemia salina*, na faixa experimentada, encontram-se melhor adaptadas a ambientes ácidos.

Os resultados mostrados no Gráfico 5 foram obtidos no experimento de variação de pH de soluções contendo 50 ppm de Grotan® OX.

Gráfico 5 – Taxa de mortalidade média de *Artemia salina* em soluções de 50 ppm de Grotan® OX com diferentes pHs.



Neste caso ouve uma inversão na tendência de sobrevivência das *Artemia salina*. Essa inversão indica um aumento na propriedade biocida do Grotan® OX em ambientes ácidos. Esse efeito é observado entre os pHs 3, 5 e 7 mas não no pH 9. Neste caso, a alta mortalidade pode ser explicada pela natureza dos espécimes, como visto no teste branco. A partir destes dois experimentos podemos supor que há um aumento da liberação de formaldeído na faixa de pHs de 3 a 7, e dentro desta faixa o aumento é maior em pHs mais baixos.

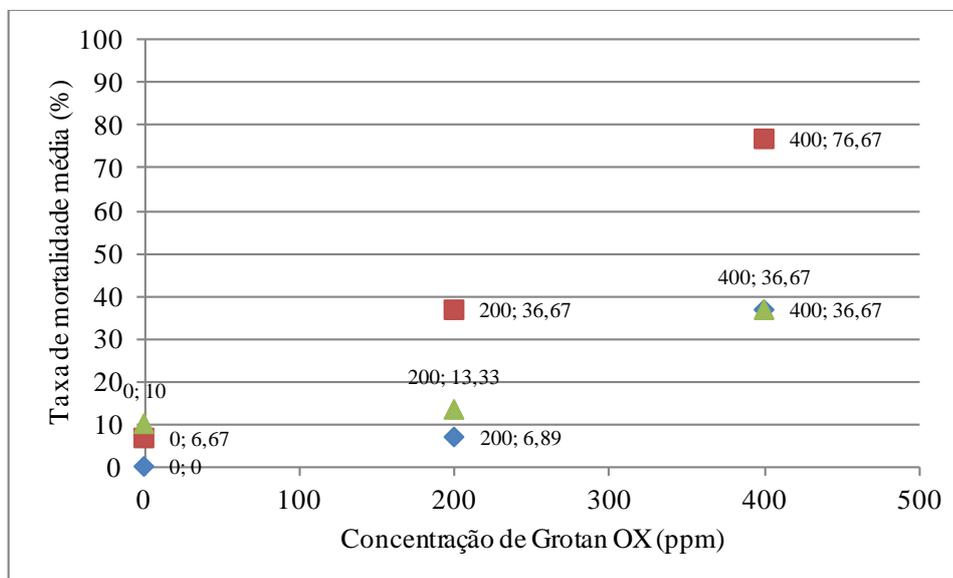
Além disso, também se observou um decréscimo incoerente da mortalidade nos pHs 7 e 9 nas amostras com Grotan® OX em relação ao branco, à isto se atribuiu uma baixa repetibilidade do método, já que não se encontrou explicação para tal efeito.

7.1.3 Variação de Tempo de Contato Água-Diesel

Os testes de variação de tempo de contato água-diesel tiveram o intuito de verificar a ocorrência de transferência de Grotan® OX de uma amostra de diesel contaminado para uma

amostra de água, assim como a quantidade e velocidade desta transferência caso ela fosse confirmada. Os resultados são apresentados no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Taxa de mortalidade média de *Artemia salina* em soluções aquosas que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan® OX.



Losangos azuis representam os resultados para 12 h de contato, os quadrados vermelhos para 24 h e os triângulos verdes para 48 h.

O que podemos ver neste gráfico, é a confirmação de que o Grotan® OX, ou seu agente biocida (formaldeído), é transferido para a água. Em todos os casos houve um aumento da taxa de mortalidade junto com o aumento da concentração do biocida adicionado ao diesel.

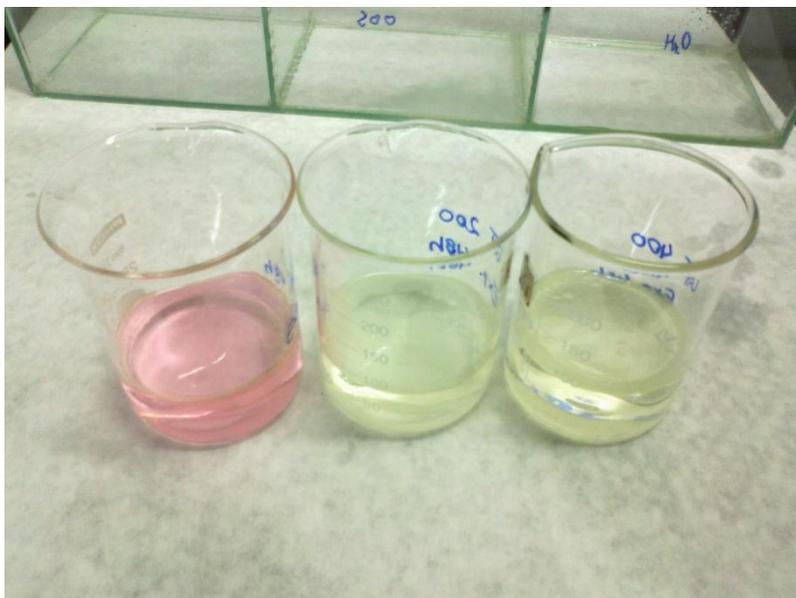
Nos testes contendo biocida, a taxa de mortalidade oscilou entre valores 6,89-36,67% para 200 ppm e 36,67-76,67% para 400 ppm. Levando em consideração as taxas de mortalidade nos testes de variação de concentração (seção 7.1.1.) para 200 e 400 ppm (60 e 67,8%, respectivamente), pode-se dizer que a quantidade de biocida, ou seu agente biocida, transferida foi alta.

Não ficou claro o efeito do tempo de contato sobre a quantidade transferida. As maiores taxas de mortalidade para testes contendo Grotan® OX foram registradas para o tempo 24 h, e os tempos 12 e 48 h produziram resultados bastante semelhantes, portanto, neste quesito o experimento foi considerado inconclusivo.

Uma interessante observação foi feita durante a realização dos testes: para os 3 diferentes tempos contato, se observou uma coloração rosácea na amostra de água do diesel

livre de Grotan[®] OX. Essa observação foi feita no momento da separação da água e diesel. A Figura 10 é uma foto das 3 amostras de água retiradas do diesel após 24 h de contato.

Figura 10 – Amostras de água retiradas após 24 h de contato com diesel que continha diferentes concentrações de Grotan[®] OX.



Da esquerda para a direita: Amostras retiradas do diesel com 0 ppm, com 200 ppm e 400 ppm de Grotan[®] OX.

O recipiente à esquerda da foto contém a amostra de água que entrou em contato com diesel livre de Grotan[®] OX. Não foi proposta explicação para este fenômeno, outros experimentos são necessários para que se possa determinar porque o Grotan[®] OX impede a formação desta coloração na água.

7.2 BIOENSAIOS COM *LACTUCA SATIVA*

Dos bioensaios realizados com *Lactuca sativa* foram retirados dados de comprimento da raiz dos brotos, peso dos brotos e porcentagem de sementes germinadas.

A partir das medições do comprimento da raiz dos brotos se fez o cálculo do tamanho médio das raízes das sementes que germinaram para cada diluição.

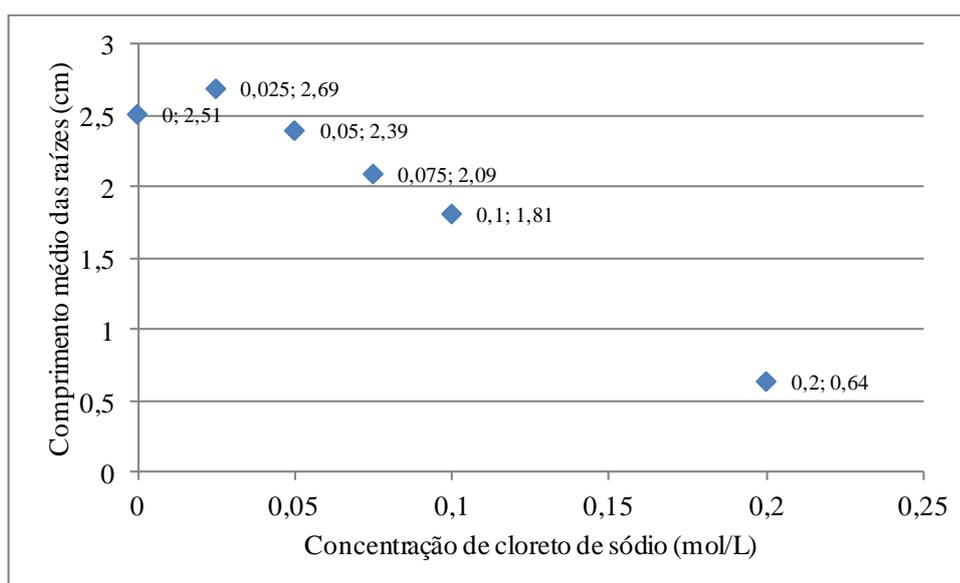
A pesagem foi feita em conjunto por triplicata, isto é, pesaram-se todos os brotos de uma triplicata em uma única pesagem. Os pesos das triplicatas de uma amostra foram somados e divididos pelo número de sementes germinadas naquela amostra, dessa maneira se calculou o peso médio dos brotos.

7.2.1 Variação de Concentração

7.2.1.1 Comprimento da Raiz

Como descrito anteriormente, fez-se um teste com diluições de cloreto de sódio assim como com dicromato de potássio nos experimentos com *Artemia salina*. Esse teste também tinha o objetivo de verificar a sensibilidade dos organismos bioindicadores às substâncias tóxicas. Os resultados do teste com o controle de cloreto de sódio são exibidos no Gráfico 7.

Gráfico 7 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio.



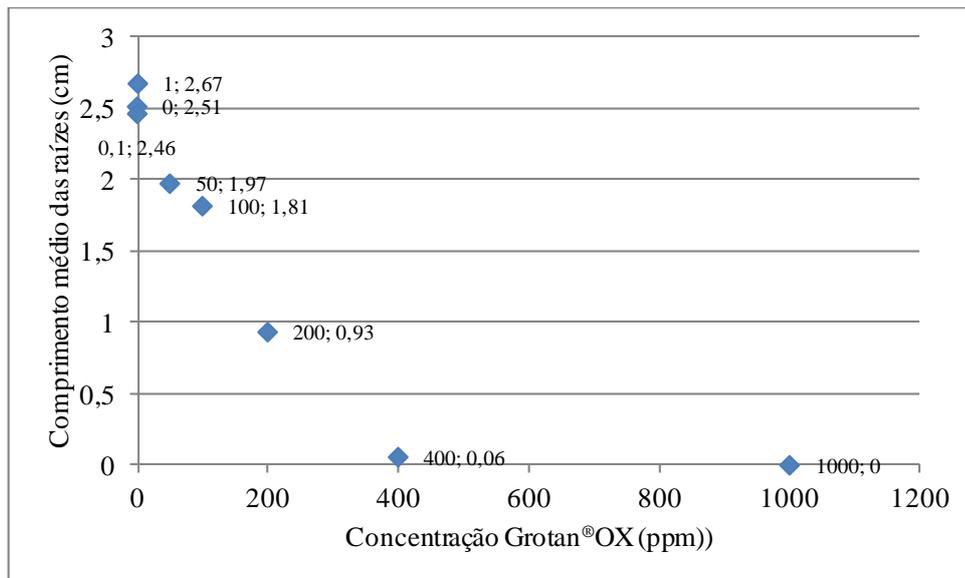
Neste gráfico é observado que o comprimento médio das raízes é inversamente proporcional a concentração de cloreto de sódio, inclusive, a variação é bastante linear no intervalo de 0,025 a 0,2 mol/L. Isso demonstra que o organismo teste possui boa sensibilidade ao agente tóxico.

Os resultados produzidos pelo teste com diferentes concentrações de Grotan[®]OX são apresentados no Gráfico 8.

A curva produzida, também demonstrou a boa sensibilidade do organismo, neste caso, ao Grotan[®]OX. Isto comprova a toxicidade do biocida à *Lactuca sativa*.

O crescimento médio das raízes de *Lactuca sativa* chegou próximo à zero na concentração de 400 ppm, mas deve-se lembrar que isso não significou uma falta total de crescimento dos brotos, apenas da raiz dos mesmos. Por esse motivo foram propostas as medições do peso dos brotos.

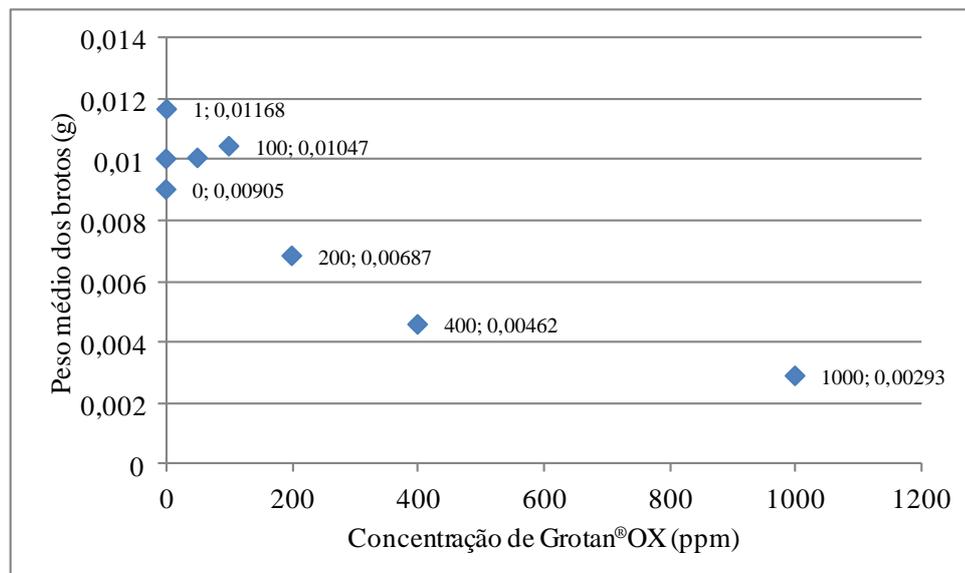
Gráfico 8 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em soluções com diferentes concentrações de Grotan[®]OX.



7.2.1.2 Peso dos Brotos

O Gráfico 9 expõe os resultados produzidos pela pesagem dos brotos.

Gráfico 9 – Peso médio dos brotos cultivados em soluções com diferentes concentrações de Grotan[®]OX.



Neste gráfico se pode melhor visualizar a diferença no crescimento das *Lactuca sativa* entre as concentrações 400 e 1000ppm. Em contrapartida, nas concentrações mais baixas (abaixo de 200 ppm) se obteve uma variação no peso dos brotos incoerente com as medidas

do comprimento da raiz, isso se deve provavelmente à umidade retida externamente nos brotos.

7.2.1.3 Germinação das Sementes

No Gráfico 10 e no Gráfico 11 são representadas as porcentagens de sementes germinadas versus a concentração das soluções em que foram cultivadas.

Gráfico 10 – Porcentagem de sementes germinadas em soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio.

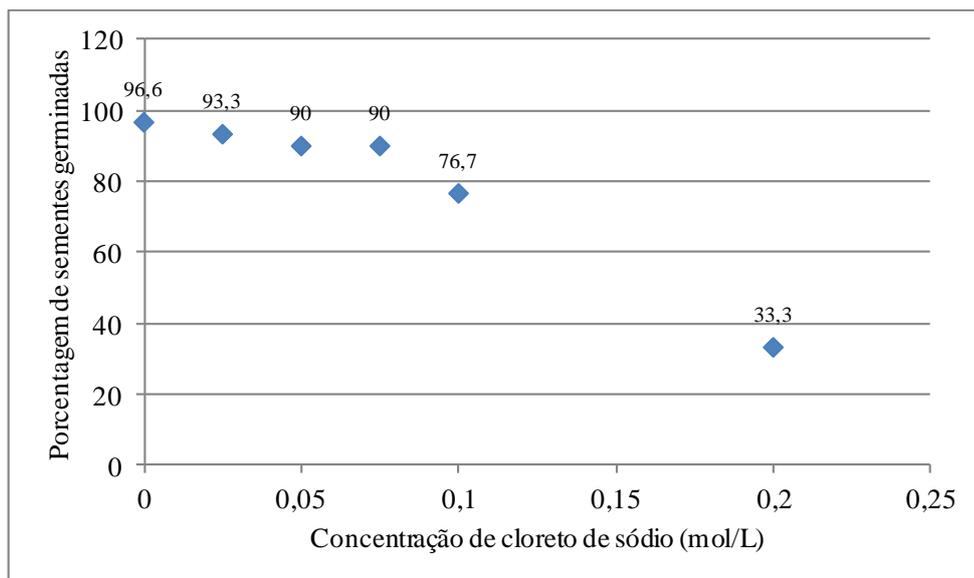
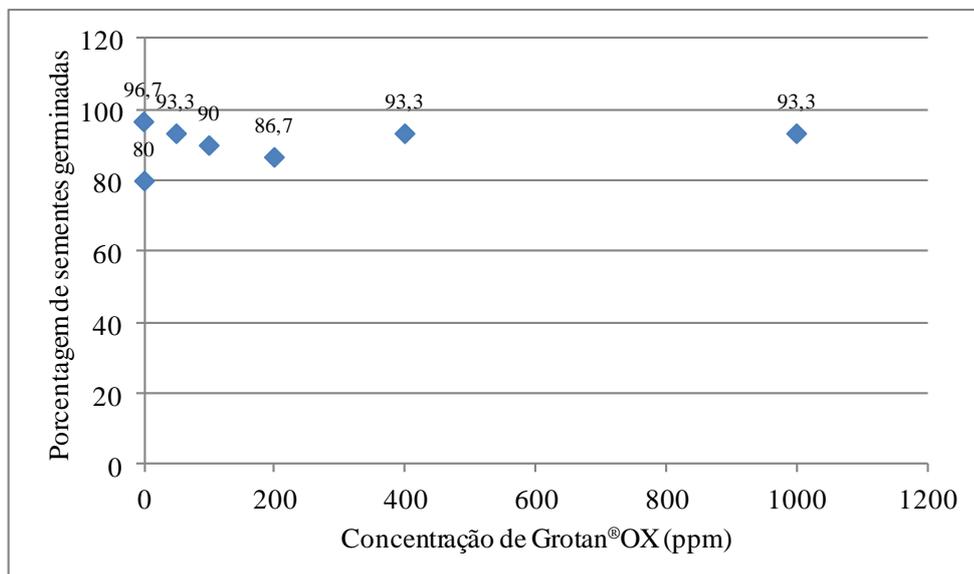


Gráfico 11 – Porcentagem de sementes germinadas em soluções com diferentes concentrações de Grotan® OX.



Observando o Gráfico 10, percebemos que no caso das soluções controle de cloreto de sódio, a resposta do organismo indicador é satisfatória, ele apresenta um decréscimo no número de sementes germinadas com o aumento da concentração do agente tóxico. A tendência é semelhante à apresentada pelo Gráfico 7.

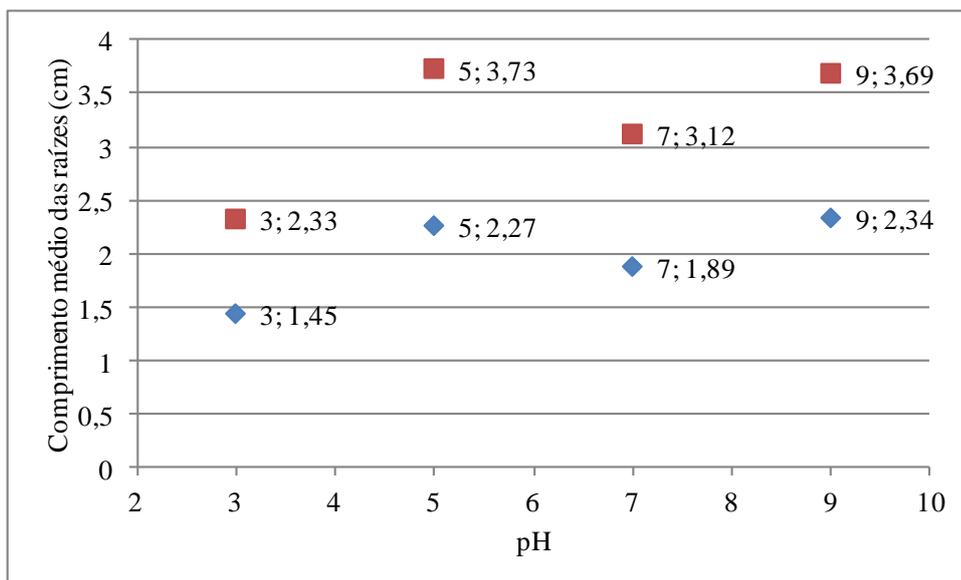
No caso do Gráfico 11, não se identificou uma semelhança na tendência demonstrada no Gráfico 8. Não se apresentam sinais de que o Grotan[®] OX afete a germinação das sementes de *Lactuca sativa*. Neste caso, o parâmetro “germinação das sementes” não se mostrou sensível ao Grotan[®] OX.

7.2.2 Variação de pH

7.2.2.1 Comprimento da Raiz

Os resultados obtidos para o teste branco e com 50 ppm de Grotan[®] OX são comparados no Gráfico 12.

Gráfico 12 – Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em diferentes pHs de soluções com e sem Grotan[®] OX.



Em quadrados vermelhos, os resultados para soluções sem Grotan[®] OX e em losangos azuis, os resultados para soluções com 50 ppm de Grotan[®] OX.

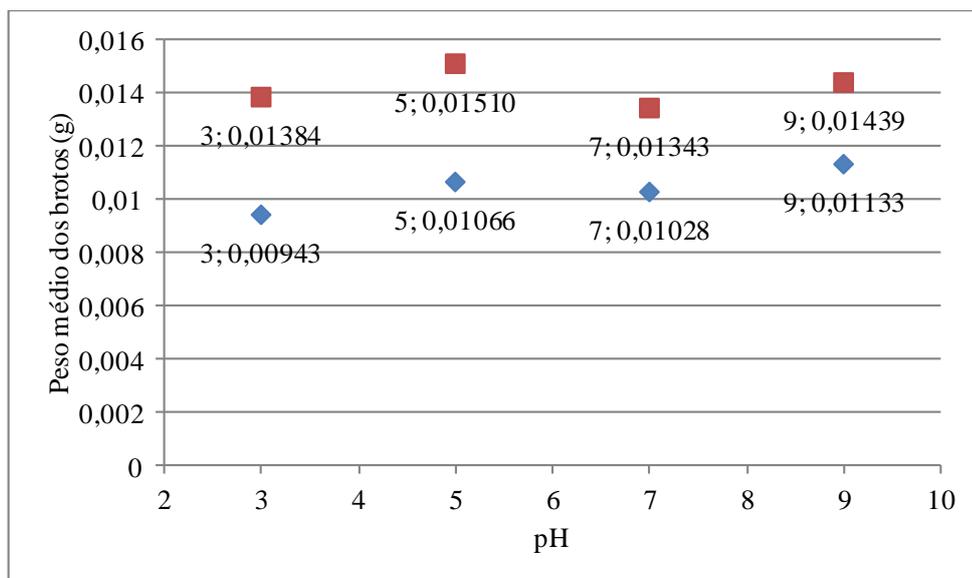
A partir dos resultados dos testes, vemos que o crescimento dos brotos não segue uma tendência linear com a variação do pH. Tanto na amostra livre de Grotan[®] OX quanto na que continha 50 ppm do mesmo, os brotos tiveram maior crescimento nos pHs 5 e 9.

Novamente, os resultados confirmam a toxicidade do biocida, mas por outro lado, vão de encontro à suposição feita (a partir dos testes de pH com *Artemia salina*) de que o Grotan[®]OX é mais tóxico em ambientes mais ácidos. O decréscimo no crescimento das raízes se mostrou aproximadamente constante com a variação de pH.

7.2.2.2 Peso dos Brotos

O mesmo gráfico de comparação entre os testes de pH da seção anterior é apresentado no Gráfico 13, neste caso em função do peso dos brotos.

Gráfico 13 – Peso médio dos brotos cultivados em soluções de diferentes pHs com e sem Grotan[®]OX.



Em quadrados vermelhos, os resultados para soluções sem Grotan[®]OX e em losangos azuis, os resultados para soluções com 50 ppm de Grotan[®]OX.

O gráfico é concordante com o que já foi dito quanto a este experimento. As variações nos pesos foram menos intensas que as variações nos comprimentos das raízes, mas ainda sim, demonstram bem a constância na toxicidade do biocida em diferentes pHs.

O fato de que a toxicidade produziu efeitos semelhantes no comprimento da raiz e no peso dos brotos indica que a toxicidade afeta de maneira profunda o desenvolvimento da *Lactuca sativa*, e não apenas em um dos parâmetros.

7.2.2.3 Germinação das Sementes

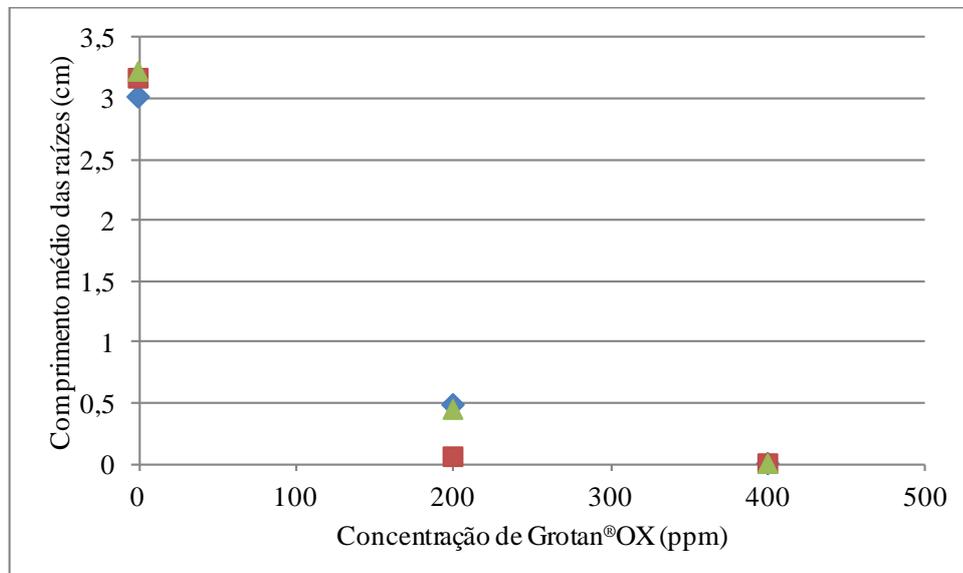
A germinação das sementes mostrou novamente uma falta de sensibilidade tanto na variação de pH nos testes, quanto na adição de Grotan[®] OX. Os experimentos só não tiveram 100% de germinação em 3 casos: No teste em branco 2 sementes não germinaram no pH 5 e no teste com adição de biocida 2 sementes não germinaram, uma no pH 5 e uma no pH 7.

7.2.3 Variação de Tempo de Contato Água-Diesel

7.2.3.1 Comprimento da Raiz

A comparação dos resultados deste experimento é mostrada no Gráfico 14.

Gráfico 14– Comprimento médio das raízes dos brotos cultivados em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan[®] OX.



Em losangos azuis os resultados para tempo de contato de 12 h, em quadrados vermelhos para 24 h, e em triângulos verdes para 48 h.

Os resultados confirmam a transferência de Grotan[®] OX ou agente biocida para a água. Uma grande diminuição no comprimento das raízes é observada nas amostras que entraram em contato com o biocida.

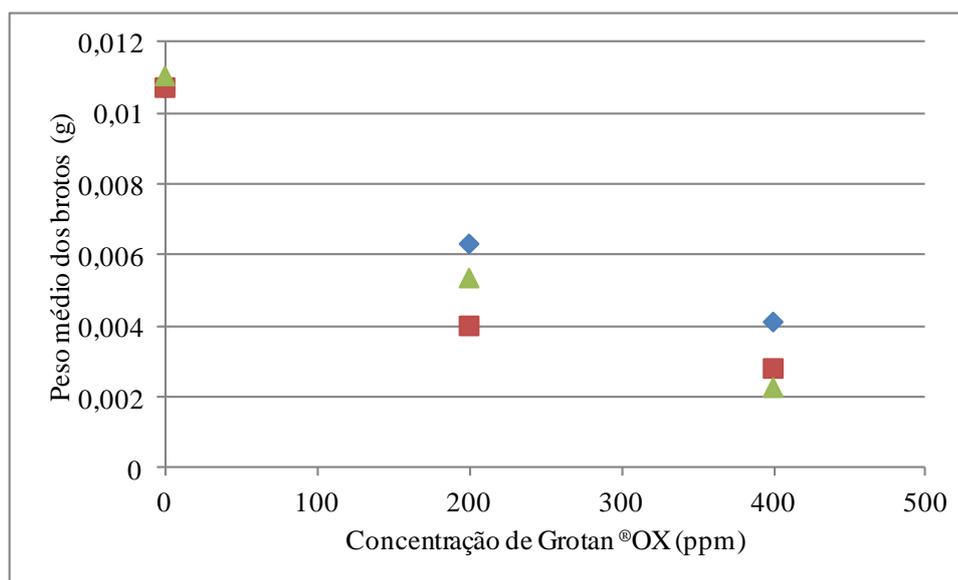
O crescimento da raiz demonstrou as mesmas tendências que a mortalidade das *Artemia salina* para essas amostras. Além disso, em 200 ppm o menor crescimento dos brotos foi na amostra com tempo de contato de 24h, ou seja, a incoerência observada no experimento com *Artemia salina* se repetiu. Isso indica que essa incoerência se deve a uma variação no

preparo das amostras ou a um comportamento real da toxicidade, e não um erro provocado pelo método em si.

7.2.3.2 Peso dos Brotos

Os resultados são comparados no Gráfico 15.

Gráfico 15 – Peso médio dos brotos cultivados em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan[®] OX.



Em losangos azuis os resultados para tempo de contato de 12 h, em quadrados vermelhos para 24 h, e em triângulos verdes para 48 h.

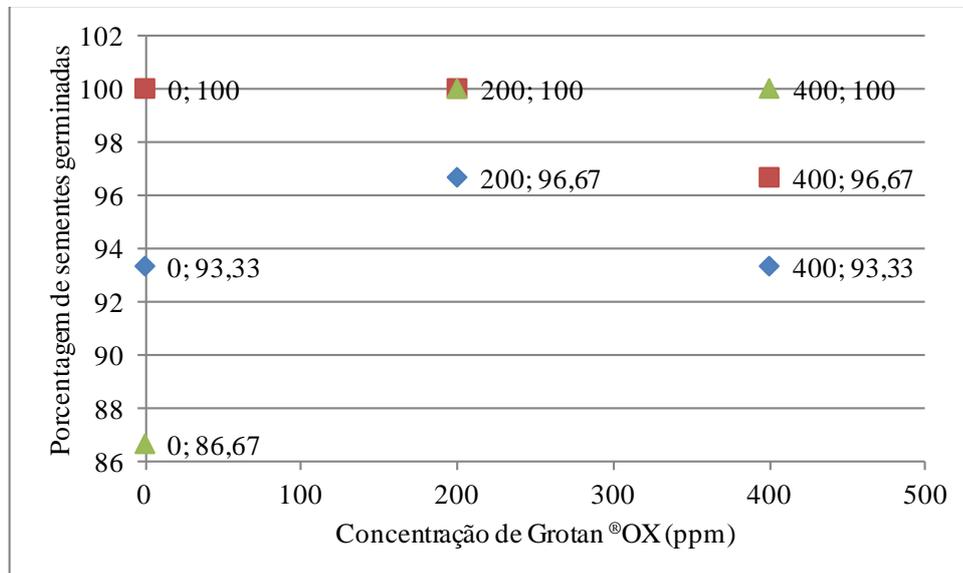
Este teste se mostrou útil novamente devido à falta de crescimento da raiz nos testes com concentrações de 400 ppm (Gráfico 14). No gráfico podemos ver uma discordância com os resultados dos testes para o mesmo experimento com *Artemia salina* nas concentrações de 400 ppm de biocida. Não foi identificada uma grande diferença de peso nos brotos da amostra de água que ficou 24 h em contato com o Grotan[®] OX. A explicação para esse fenômeno pode ser feita pelo fato de que o peso dos brotos, neste caso, é tão baixo, que se aproxima do peso das próprias sementes, tornando a medida vulnerável às variações de peso naturais das sementes.

7.2.3.3 Germinação das Sementes

O Gráfico 16 expõe os resultados referentes à germinação das sementes para este teste.

Mais uma vez a porcentagem de germinação se mostrou um parâmetro não sensível, tanto as diferentes concentrações de biocida, quanto aos diferentes tempos de contato água-diesel. Nenhuma tendência foi observada.

Gráfico 16 – Porcentagem de sementes germinadas em amostras de água que entraram em contato com diesel contaminado com diferentes concentrações de Grotan®OX.



Em losangos azuis os resultados para tempo de contato de 12 h, em quadrados vermelhos para 24 h, e em triângulos verdes para 48 h.

7.3 ANÁLISE DE CUSTOS

Neste tópico é apresentada uma estimativa dos custos necessários para a realização dos bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa*. Para tal, foi decidido avaliar financeiramente apenas os testes de variação de concentração de Grotan®OX, essa decisão foi tomada devido à aplicabilidade de sua metodologia a diversos tipos de amostras. Os ensaios de variação de pH e variação de tempo de contato água-diesel foram ensaios adaptados especificamente ao Grotan®OX e suas condições de uso e, portanto, não representam experimentos exigidos pela indústria e academia de forma geral.

Para avaliação dos custos dos bioensaios foram cotados preços de materiais, equipamentos, reagentes, energia e serviços. Os custos são apresentados separadamente para o bioensaio com *Artemia salina* e *Lactuca sativa*.

Para o cálculo de quantidades consumidas nos experimentos, considerou-se um bioensaio padrão envolvendo sete diluições de uma amostra e cinco diluições do controle (dicromato de potássio ou cloreto de sódio), todos em triplicata.

Pipetas Pasteur, pipetas volumétricas, copos Becker, balões volumétricos, espátulas, pinças, bastão de vidro, algodão e água destilada não foram adicionados aos custos por serem considerados itens básicos de laboratório e por isso, não precisariam ser adquiridos caso se desejasse implementar o método em um laboratório. As placas de Petri e os recipientes de teste para as *Artemia salina* foram incluídos apesar de também serem considerados itens básicos de laboratório por serem utilizadas em grande quantidade.

Os produtos tiveram seu custo dividido por um valor. Esse valor foi o número mínimo esperado de bioensaios em que eles poderiam ser usados antes que fossem totalmente consumidos ou permanentemente danificados.

7.3.1 Consumíveis

7.3.1.1 Artemia salina

7.3.1.1.1 Dicromato de potássio

Marca: Sigma-Aldrich®

Descrição: Reagente ACS, $\geq 99.0\%$

Quantidade: 500g

Preço (R\$): 340,00

Considerando-se a produção de 25 mL com concentração 0,1g/L (as diluições são feitas à partir desta), é necessário apenas 0,0025g de dicromato de potássio para um bioensaio. Por motivos de desperdícios e facilidades de pesagem, consideremos 0,050g. Com essa quantidade de dicromato de potássio necessária, temos que 500 g do reagente são suficientes para 10 mil bioensaios. O preço do produto dividido pelo número de bioensaios em que pode ser usado fica R\$0,034.

7.3.1.1.2 Cistos de Artemia salina

Marca: MARAMAR PET®

Descrição: Ovos de Alta Eclosão

Quantidade: 5g

Preço (R\$): 6,96

No processo de eclosão é utilizado 0,1g de cistos. Dividindo o preço do produto pelo número de bioensaios em que pode ser usado temos R\$ 0,139.

7.3.1.1.3 Sal Marinho

Marca: Red Sea®

Descrição: Produz 60 L de solução

Quantidade: 2 kg

Preço (R\$): 35,02

No processo de eclosão dos cistos se utiliza 250 mL de solução salina, portanto é possível utilizar o produto em 240 bioensaios. O preço por bioensaio fica R\$ 0,146.

7.3.1.2 *Lactuca sativa*

7.3.1.2.1 *Cloreto de Sódio*

Marca: Sigma-Aldrich®

Descrição: BioXtra, $\geq 99.5\%$

Quantidade: 1 Kg

Preço (R\$): 239,00

Para produção de 100 mL com uma concentração 0,2 mol/L usa-se 0,02 mol de NaCl, ou seja 1,1689 g. Considerando 2 g por motivos de desperdícios e facilidades de pesagem, se calcula que podem ser feitos 500 bioensaios com o 1 Kg do produto, logo o preço por bioensaio é R\$ 0,478.

7.3.1.2.2 *Sementes de Lactuca sativa*

Marca: ISLA®

Descrição: Diversas Variedades

Quantidade: 10 x 10g

Preço (R\$): 21,70

Sabendo-se que o peso médio de uma semente de *Lactuca sativa* é pouco abaixo de 0,04g calcula-se que o número de sementes contidas no produto é cerca de 2500. No bioensaio são usadas 10 sementes por triplicata de 13 amostras, dando um total de 390 sementes. Chega-se então ao preço por bioensaio, R\$ 3,385.

7.3.1.2.3 *Papel Filtro*

Marca: Petrodidática®

Descrição: 60x60 cm

Quantidade: 100 folhas

Preço (R\$): 87,65

As folhas de papel filtro são cortadas para adaptarem-se as placas de petri. Caso as placas de Petri tenham o diâmetro próximo a 11 cm, podem ser cortados 25 círculos de papel

filtro por folha, somando 2500 círculos. Utiliza-se 3 placas para cada uma das 13 diluições de amostras do bioensaio, logo, são necessários 39 círculos de papel para forrá-las. Isso leva a um custo em papel filtro por bioensaio de R\$ 1,367.

7.3.2 Não Consumíveis

7.3.2.1 Artemia salina

7.3.2.1.1 Recipientes de Análise

Marca: Não especificada

Descrição: Tubo Falcon, 50 mL, tampa de rosca.

Quantidade: 50

Preço (R\$): 20,00

O produto descrito contém 50 tubos, são necessários 39 para os testes, portanto o preço por 39 tubos é de R\$ 15,60. Partindo do princípio que os tubos podem ser reutilizados em pelo menos 50 vezes, o custo dos tubos por bioensaio é de R\$ 0,312.

7.3.2.1.2 Lâmpada Incandescente

Marca: OSRAM®

Descrição: 150W

Quantidade: 1

Preço (R\$): 3,60

A vida-média da lâmpada é de 750 horas, um bioensaio usa a lâmpada por 2x48 horas (eclosão + teste), logo, uma lâmpada como esta dura em média 7,81 bioensaios. O seu preço por bioensaio é R\$ 0,461.

7.3.2.1.3 Bomba de Aeração

Marca: BOYU®

Descrição: Modelo U-3600, 4 L/min, 2,5W

Quantidade: 1

Preço (R\$): 17,14

A vida útil da bomba não é especificada, mas possui garantia de 90 dias. Como a bomba é utilizada por períodos muito curtos (10 min), estima-se que dure pelo menos 100 bioensaios. Isso leva a um preço de R\$ 0,171.

7.3.2.2 *Lactuca sativa*

7.3.2.2.1 *Placas de Petri*

Marca: Precision®

Descrição: 10,0 x 1,5 cm

Quantidade: 1

Preço (R\$): 3,64

Como já foi mencionado, são usadas 39 placas por ensaio. Isto multiplica o custo à R\$ 141,96. Supondo-se que elas possam ser reutilizadas cerca de 50 vezes antes de serem danificadas, tem-se o custo por bioensaio de R\$ 2,839.

7.3.3 Energia Elétrica

7.3.3.1 *Artemia salina*

A energia elétrica é usada para o aquecimento, através da lâmpada incandescente, e para a aeração da solução de sal marinho artificial. Esses equipamentos ficam ligados por 96 h a uma potência de 150 W (lâmpada) e 10 min a 2,5 W (bomba). Multiplicando suas potências pelo tempo usado temos 14,4 kWh e 0,42 kWh. Assumindo o preço da energia elétrica distribuída pela CEEE (2011) de R\$0,34021 por kWh, temos um gasto total em energia elétrica de R\$5,042.

7.3.3.2 *Lactuca sativa*

Não é necessário consumo de energia elétrica.

7.3.4 Serviço

O tempo de médio aproximado que foi gasto pelo analista que realizou os testes, considerando todas as etapas laboratoriais necessárias, inclusive preparação de amostras e lavagem de vidraria, é descrito a seguir:

Artemia salina

Eclosão dos cistos: 1h

Preparação dos testes: 6h

Coleta de resultados: 4h

TOTAL: 11h

Lactuca sativa

Preparação dos testes: 3 h

Coleta de resultados 6 h

TOTAL: 9h

A partir do piso salarial de um técnico em química, 3 salários mínimos, e o salário mínimo estadual da faixa, R\$732,36, temos que o salário de um técnico em química seria próximo a R\$2197,08. Dividindo esse valor por 20 dias trabalhados por mês e 6 horas por dia temos o preço da hora trabalhada R\$ 18,31. Multiplicando esse valor pelo número de horas necessárias em cada bioensaio temos o preço do serviço de realização dos mesmos. No caso da *Artemia salina* R\$ 201,40 e no caso da *Lactuca sativa* R\$ 164,78.

7.3.4 Custos Totais

Os custos totais para realização de um bioensaio são apresentados na Tabela 4, abaixo, separadamente para um bioensaio com *Artemia salina* e um com *Lactuca sativa*. Eles foram calculados pelo somatório dos preços dos materiais, equipamentos, reagentes, energia elétrica e serviços calculados nos tópicos anteriores.

Tabela 4 - Custos dos bioensaios.

<i>Artemia salina</i>		<i>Lactuca sativa</i>	
Descrição	Preço por bioensaio (R\$)	Descrição	Preço por bioensaio (R\$)
Dicromato de potássio	0,034	Cloreto de sódio	0,478
Cistos de <i>A. salina</i>	0,139	Sementes	3,385
Sal marinho	0,146	Papel filtro	1,367
Recipientes de análise	0,312	Placas de Petri	2,839
Lâmpada	0,461	Serviço	164,78
Bomba de aeração	0,171		
Energia elétrica	5,042		
Serviço	201,40		
TOTAL	207,70	TOTAL	172,85

É interessante ressaltar que o custo dos bioensaios se baseia majoritariamente no salário pago ao analista. No bioensaio com *Artemia salina* ele representa 96,96% do custo total, e no caso do bioensaio com *Lactuca sativa* ele representa 95,33%.

7.3.5 Comparação com o Mercado

Decidiu-se comparar os custos calculados com o custo de um bioensaio utilizando *Daphnia magna* por ser considerado um dos bioensaios mais utilizados atualmente. Para que a

comparação fosse válida, fez-se um orçamento de tal bioensaio para 13 diluições de uma amostra, representando as 13 diluições usadas nos bioensaios com *Artemia salina* e *Lactuca sativa*. O laboratório Ecotox[®] declarou, através de uma proposta comercial que é apresentada em anexo, cobrar R\$1200,00 para a realização do ensaio descrito.

Tomando este valor por referência, podemos dizer que os ensaios apresentados neste estudo são ensaios de baixo custo, mesmo considerando custos adicionais repassados ao cliente e o lucro da prestadora de serviços.

Um dos principais fatores que produz essa diferença de valores é a necessidade de se manter uma criação dos organismos bioindicadores permanentemente. Tais criações são delicadas e exigem atenção constantemente, o que resulta em elevados gastos com empregados, energia e material. Isto não se aplica apenas aos bioensaios com *Daphnia magna*, a maioria dos bioindicadores usados requer cultivo ou criação permanente (KEDDY, 1995).

8 CONCLUSÃO

O biocida estudado se mostrou tóxico aos dois organismos utilizados como bioindicadores. Sua toxicidade foi considerada alta, matando mais de metade dos espécimes de *Artemia salina* em valores iguais ou superiores a 100 ppm e provocando uma queda de mais de 50% no crescimento das raízes de *Lactuca sativa* em valores iguais ou superiores a 200 ppm. Não ficou claro o efeito do pH sobre a quantidade de formaldeído liberado, nos experimentos com o microcrustáceo houve um aumento de sua toxicidade relativamente grande em valores de pH iguais a 5 e 3, sendo este aumento mais efetivo em pH 3, mas nos experimentos com a planta sua toxicidade se mostrou independente do pH. Ficaram constatadas grandes transferências de Grotan[®]OX ou do seu agente biocida para a água que entrou em contato com diesel contaminado com o biocida, mas o efeito do tempo sobre tais transferências não pode ser determinado.

Os métodos se mostraram eficientes de forma geral. Com exceção da germinação das sementes de *Lactuca sativa*, em todos os parâmetros analisados se observou a sensibilidade dos organismos ao Grotan[®]OX. Os resultados obtidos apresentaram tendências confiáveis quanto à toxicidade do biocida. Concluiu-se também que estes são métodos de baixo custo se comparados com o método de análise de ecotoxicidade que utiliza *Daphnia magna* como bioindicador, e que isso se deve a falta de necessidade de um cultivo/cultura permanente.

9 REFERÊNCIAS

APLYSIA. Disponível em: <<http://www.aplysia.com.br/site/pt/teste-de-toxicidade.php>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

AQUARICAMP. **Red Salt Sea 02 quilos (60 litros) Pacote**. Disponível em: <<http://www.aquaricamp.com.br/detalhesProduto.php?id=729>>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

AQUASN. **Boyu Compressor de Ar U-3600 4 Litros por Minuto**. Disponível em: <http://www.aquasn.com.br/loja/product.asp?store=paulokai&template_id=1250&dept_id=700&pf_id=01001&nome=Boyu+Compressor+de+Ar+U-3600+4+litros+por+minuto>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

BARDAL, T. **Marine Aquaculture**. Disponível em: <<http://www.sintef.no/home/Fisheries-and-Aquacul/Marine-Resources-Technology/Marine-aquaculture/>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

BAUGUR-GONZÁLEZ, M. et al. Toxicity Assessment Using *Lactuca Sativa* L. Bioassay of the Metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in Soluble-in-Water Saturated Soil Extracts from an Abandoned Mining. **Journal of Soils and Sediments**. v. 11, n. 2, p. 281-289, 2011.

BEATRICE, A. **Avaliação da Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) Submetidas a Diferentes Tipos de Dietas e Meios de Cultivo**. 2004. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). UFRGS, Porto Alegre, 2004.

BEAUCHAMP, R. et al **Concise International Chemical Assessment Document 40: Formaldehyde**. World Health Organization. Geneva, 2002

BIOENSAIOS. Disponível em: <http://www.bioensaios.com.br/serv_06_01.php>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

BP. **Statistical Review of World Energy**: Junho de 2011. Disponível em <bp.com/statisticalreview>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

Brine Shrimp Direct. **Brine Shrimp in the Classroom**. Disponível em <<http://www.brineshrimpdirect.com/teachers-classroomshrimp-c176.html>>. Acessado em: 19 de junho de 2012.

CEEE. **Tabela de Tarifas – Convencional**. Disponível em: <<http://www.ceee.com.br/pportal/ceee/archives/Upload/Tabela%20Convencional%202011%20cdr.pdf>>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

CUNHA, B. **Avaliação Ecotoxicológica de Distintos Tipos de Efluentes Mediante Ensaio de Toxicidade Aguda Utilizando *Artemia Salina* e *Lactuca Sativa***. 2011. 79. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado). UFRGS, Porto Alegre, 2011.

ECOTOX. Disponível em: <<http://www.ecotox.com.br/servico-detalhe&id=5>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

ELETRICAWF. **Lampada Incandescente 150w 220v Osram** Disponível em: <http://www.eletricawf.com.br/produto-805-lampada_incandescente_150w_220v_osram>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

FARIA, C. **Níveis Tróficos**. Disponível em: < <http://www.infoescola.com/biologia/niveis-troficos/>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

FONSECA, K. **Níveis Tróficos**. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/biologia/niveis-troficos.htm>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

GOLDING, L.A. et al. **Freshwater Algae (*Selenastrum capricornutum*): Chronic Toxicity Test Protocol**. NIWA Ecotoxicology Laboratory, Wellington, New Zealand, 1998.

GOPALAN, H. Ecosystem Health and Human Wellbeing: The Mission of the International Programme Plant Bioassays. **International Journal on Mutagenesis, chromosome breakage and Related Subjects**. v. 426, n. 2, p. 99–102, 1999.

GREENE, J. et al. **Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites**. USEPA, Chicago, 1989.

HENRIKS-ECKERMAN, M.L. et al. **Analysis of Allergens in Metalworking Fluids**. Contact Dermatitis, Singapura, v. 59, p. 261–267, 2008.

HERBERT, P. D.N. The Population Biology of Daphnia (Crustacea, Daphnidae). **Biological Reviews**. Windsor, Canada. v. 53, n. 3, p. 387-426, 1978.

HET COLLEGE VOOR DE TOELATING VAN GEWASBESCHERMINGSMIDDELEN EN BIOCIDEN. Toelatingsnummer 13606 N: Contram MBO. Wageningen, Holanda .2012.

IHS CHEMICAL. **Formaldehyde**. Maio de 2012. Disponível em <<http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/formaldehyde.aspx>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Formol ou Formaldeído. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795>. Acesso em: 19 de junho de 2012

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs Volume 88: Formaldehyde**. Monografia. Lyon, França 2006.

ISLA. **Alface Crespa Grand Rapids**. Disponível em: < <http://www.isla.com.br/cgi-bin/detalhe.cgi?id=37>>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

KEDDY, C. J. et al. Review of Whole-Organism Bioassays - Soil, Fresh-Water, and Fresh Water Assessment in Canada. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, p. 221-251, 1995.

KEDDY, C. J.; Greene, J. C.; Bannell, M. A. Review of whole-organism bioassays - soil, fresh-water, and fresh water assessment in Canada. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, p. 221-251, 1995.

KERSTING, K.; Leeuw, W.; The use of the Coulter Counter for measuring the feeding rates of daphnia magna. **Hydrobiologia**. v. 49, n. 3, p. 233-237, 1976.

KNIE, J. L .W.; Lopes, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

LABORATORY OF ECOTOXICOLOGY AND LCA. **Acute toxicity test on brine shrimp (*Artemia salina*)**. Praga, República Tcheca.

LARDIERI, T. **The Effect of Lysol Cleaner on Germination and Radicle Length in Buttercrunch Lettuce Seeds**. Disponível em: <<http://www.ecotox.com.br/servico-detalle&id=5>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

LEI DO ESTADO DE RIO GRANDE DO SUL Nº 13.960 de 27.03.2012. **DOE-RS**, 28 de março de 2012.

LOJALAB. **Tubo Falcon de 50 mL (pct com 50 pçs)**. Disponível em: <http://www.lojalab.com.br/produtos_descricao.asp?codigo_produto=220>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982

NGBETTAS. **Ovos de Artemia Alta Eclosão Pote c/ 5gr MARAMAR**. Disponível em: <http://www.ngbettas.com.br/loja/product.asp?store=108058&template_id=6&dept_id=113&pf_id=MR0111&nome=Ovos+de+Artemia+Alta+Eclos% E3o+pote+c% 2F+5gr+MARAMAR>. Acesso em 20: de junho de 2012.

NPLANTAS. Alface, Descrição Botânica. Disponível em: <<http://nplantas.com/alface-descricao-botanica/>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

PERSOONE, G. et al. **The ARC-Test: A standardized Short-term Routine Toxicity Test with Artemia Nauplii**. Ecotoxicological Testing for Marine Environment. Bredene, Bélgica. v. 2, p. 588, 1984.

PETRODIDÁTICA. **Papel Filtro Qualitativo 80g 60x60 cm 100un**. Disponível em: <http://www.didaticasp.com.br/produto_detalle.php?codpro=5109>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

Brasil. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 344 DE 25 DE MARÇO DE 2004**. Diário Oficial da União, n. 87, seção 1, p. 56-57, 7 de maio de 2004.

Brasil. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357 DE 17 DE MARÇO DE 2005**. Diário Oficial da União, n. 53, p. 58-63, 18 de março de 2005.

Brasil. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 430 DE 13 DE MAIO DE 2011**. Diário Oficial da União, n. 92, p. 89, 16 de maio de 2011

Romaine Variety. Disponível em: <<http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/591/#b>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

SANTOS, E. F. **Ensaio de Toxicidade com Artemia salina do Hidroclorato de Laranja**. In. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 63. 2011. Goiânia. Fortaleza, CE. 10 de junho de 2011. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/arquivos/jovem/42ensaiotox.pdf>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

SCHÜLKE & MAYR GMBH. **Grotan® OX**: Conservante para Indústria Química. 2008. Disponível em:

<http://www.schuelke.com/download/pdf/GROTAN_OX_ZTM_P_MK_PT.PDF>. Acessado em: 19 de junho de 2012.

SIGMA-ALDRICH. **Potassium Dichromate**: ACS Reagent, $\geq 99.0\%$. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/207802?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

SIGMA-ALDRICH. **Sodium Chloride**: BioXtra, $\geq 99.5\%$. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/s7653?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

SINDICATO DOS QUÍMICOS DO RS. **Salário Mínimo Profissional**. Disponível em: <http://www.sinquirs.org.br/salariominimoprofissional.html>>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

STAPPEN, G. Introduction, biology and ecology of Artemia. In: Lavens, P. et al. **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**. Roma. Ed. FAO Fisheries Technical Paper, 1996. Cap. 4.1, p. 79-106.

SYKORA, V. **Artemia salina (brine shrimp) in a drop of water (10X)**. Disponível em: <http://www.nikonsmallworld.com/detail/year/2010/106>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

SYNTH.COM. **Placa de Petri em Vidro / Precision**. Disponível em: http://www.lojasynth.com/loja/produto-243435-3266-placa_de_petri_em_vidro__precision>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

The Evolution of phenotypic plasticity. Disponível em: <http://pcwww.liv.ac.uk/~stewp123/Research.htm>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Report on Carcinogens**. 12ed. 2011. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/roc12.pdf>>. Acessado em: 19 de junho de 2012.

VITALI, M. **Ensaio Ecotoxicológico com Mysidopsis juniae e Hyalella azteca**. 2011. Disponível em: <http://aplysia.com.br/blog/25-01-2011/ensaios-ecotoxicologicos-com-mysidopsis-juniae-e-hyalella-azteca>>. Acesso em: 19 de junho de 2012.

WEBER, C. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. USEPA, Cincinnati, Ohio. 4ed.; v. 2, p. 131-148, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 89**. Geneva, Suíça. 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Formaldehyde: Health and Safety Guide**. Geneva, Suíça. 1991.

10 ANEXOS**10.1 ORÇAMENTO DE BIOENSAIO COM *DAPHNIA MAGNA*
(PÁGINAS SEGUINTEs)**

Porto Alegre, 12 de junho de 2012

À
Thomaz Cabral Rangel
thomaz_rangel@hotmail.com
(51) 9646.8248

Prezado Thomaz,

Conforme solicitado, estamos apresentando nossa proposta para a realização de ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* considerando as 13 concentrações a serem fornecidas.

Nosso laboratório tem se destacado pelo rigor científico com que executa suas análises e a importância que agrega as necessidades de seus clientes em relação a prazos e qualidade analítica. Desta forma, os mais de 15 anos de experiência de nossa equipe técnica, a utilização exclusiva de organismos-teste cultivados no próprio laboratório, e o reconhecimento de competência ISO/IEC 17025 para 100% das análises realizadas asseguram credibilidade e confiabilidade nos resultados apresentados.

Ficamos totalmente a disposição para maiores esclarecimentos. Em caso de dúvida, por favor, entre em contato.

Atenciosamente,

Biol. Nade Janara Coimbra
ECOTOX Análise e Consultoria Ambiental
Diretora

Especificação dos Serviços:

1. Ensaios de Toxicidade Aguda – Efluente	Valor por amostra**
Ensaio de Toxicidade: um nível trófico* -Ensaio com <i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo) realizado com 13 diluições a serem informadas pelo cliente. Resultados expressos em taxa de mortalidade por concentração ensaiada e CE50;48h caso essa ocorra nas concentrações avaliadas.	R\$ 1200,00
* Ensaios realizados com diluição da amostra ** Custos de amostragem não incluídos Volume necessário: 1 litro (um litro) Preservação: amostra deve ser mantida sob refrigeração pelo prazo máximo de 48 h.	

Coleta das Amostras: Caso o serviço de coleta não seja solicitado, a coleta, preservação e transporte das amostras até o ECOTOX serão de responsabilidade do cliente.

As amostras de efluentes e águas serão descartadas em prazo não superior a 05 (cinco) dias e as demais amostras (sedimentos) em prazo não superior a 15 (quinze) dias, contados do envio dos resultados das análises, salvo quando **expressamente solicitada** estocagem pela contratante.

Entrega de Amostras: quando coletadas pelo cliente, as amostras devem ser entregues refrigeradas até 24h após a coleta. Caso este prazo seja ultrapassado o volume enviado deve ser congelado em alíquotas de 1 litro.

Emissão dos Resultados: Os resultados das análises ecotoxicológicas serão emitidos no prazo máximo de 30 dias úteis, contados da entrada das amostras em nossos laboratórios sob a forma de Relatório de Ensaio.

Os prazos ofertados deverão ser confirmados na data da contratação dos serviços.

Metodologias Analíticas: As análises especificadas serão realizadas de acordo com metodologias aprovadas pela FEPAM de acordo nos normas Nacionais e Internacionais (USEPA, ABNT), salvo quando indicado.

Pagamento: Será emitida a fatura pela Ecotox Analise e Consultoria Ambiental na entrega dos resultados, vencível 15 (quinze) dias contados da data de emissão.

Validade da Proposta: 30 dias (Trinta dias)

Informações Extras: Todas as informações referentes aos estudos, bem como resultados e documentos afins são de propriedade exclusiva da empresa solicitante, e as mesmas somente poderão ser divulgadas a terceiros perante a aprovação prévia por escrito do contratante.

Atenciosamente,

Biol. Nade Janara Coimbra
 ECOTOX Analise e Consultoria Ambiental
 Diretora