

Cíntia Badaró-Pedroso

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS E IDENTIFICAÇÃO
DA TOXICIDADE DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE
PETRÓLEO SOBRE ALGUMAS ESPÉCIES
MARINHAS**



**Orientador: Profa. Dra. Maria do
Carmo Fernandes Santos**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Ciências da Engenharia
Ambiental.

**São Carlos
1999**

Class.	TESE
Cutt.	0508
Tombo	260/99

311 00140 523

S/5 1060360

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B132a

Badaró-Pedroso, Cíntia

Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da
água de produção de petróleo sobre algumas espécies
marinhas / Cíntia Badaró-Pedroso. --
São Carlos, 1999.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos – Universidade de São Paulo, 1999.

Área: Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof^º. Dr^º. Maria do Carmo Fernandes
Santos.

1. água de produção.
2. Identificação da toxicidade.
3. *Mysidopsis juniae*.
4. Microtox.
5. *Lytechinus variegatus*.
6. *Arbacia punctulata*.
7. Marinho.

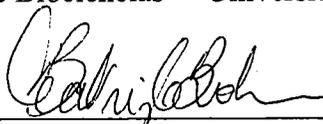
FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Licenciada **CÍNTIA BADARÓ PEDROSO**

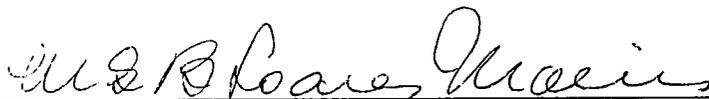
Tese defendida e aprovada em 08-09-1999
pela Comissão Julgadora:



Prof. Doutora **MARIA DO CARMO FERNANDES SANTOS (Orientadora)**
(Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)



Prof. Doutora **MARIA BEATRIZ CAMINO BOHRER**
(IPEN)



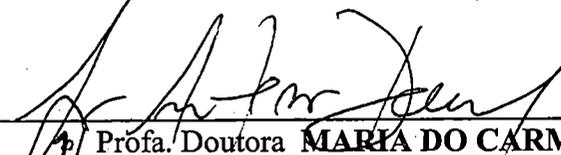
Prof. Titular **MARIA DA GLÓRIA BLUMER SOARES MOREIRA**
(Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)



Prof. Doutora **EDUINETY CECI PEREIRA MOREIRA DE SOUSA**
(Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo)



Prof. Titular **ARISTIDES ALMEIDA ROCHA**
(Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)



Prof. Doutora **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora da Área de Ciências da Engenharia Ambiental



JOSE CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Ao querido Fernando, e aos meus queridos pais,
Santinho e Anézia, por tudo de bom que
representam para mim

AGRADECIMENTOS

Ao Fernando, em especial, pelo amor, companheirismo, apoio, paciência e compreensão durante todos os anos de realização desse trabalho. Quem mais enfrentaria um costão, para coletar algas de madrugada, no frio e sem lanterna?

Aos meus pais, grandes incentivadores, provedores e minha mais fiel torcida organizada.

À querida Profa. Dra. Maria do Carmo Fernandes Santos pela orientação, apoio, e que durante a fase final do trabalho me encorajou e com carinho e calma mostrou que tudo daria certo. Muito obrigada pela sua compreensão e por ter dado a idéia de pedir a bolsa sanduíche.

Ao querido Prof. Dr. Robert Scott Carr pelo carinho e pela orientação durante a realização da parte experimental nos Estados Unidos. Também não posso deixar de agradecer os presentinhos que auxiliaram na realização dos experimentos no Brasil: colunas de C18, filtros millipore, etc.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP e ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar), nas pessoas dos seus diretores e chefes de departamento, Profs. Drs. Ana Maria de Lauro Castrucci e José Eduardo W. Pereira Bicudo, e Profs. Drs. Maria da Glória B. S. Moreira e José Carlos de Freitas, que colocaram à disposição, espaço, infra-estrutura e sobretudo, pela acolhida calorosa, tornando possível a realização desse trabalho.

Aos funcionários e alunos do Depto de Fisiologia, Mazinho, Telma Pazzini, Cecília, Giseli, Marcão, Dna Isildinha, Manoel, Maria Alice, Andréia Garrido, Arlete, Silvia Otile e Beth pela amizade, ajuda e atendimento aos meus pedidos, sempre muito diversificados!

A todos professores do Departamento de Fisiologia e em especial ao Prof. Salomão e a Profa. Marilda pelo carinho e apoio durante minha permanência no Departamento.

Ao Cláudio, aluno do Depto de Fisiologia, pela sua ajuda com o computador.

Aos funcionários do CEBIMar, Álvaro, Valéria, Cláudio, Joseilton, Moisés, Adriano, Elso, Cuca, Elias, Ivanete, Wagnei, Fátima, Aurea, Dina, Ana Maria, Berenice e Angelina, pela amizade, carinho e ajuda nas mais variadas atividades.

Um agradecimento especial ao Jair, Sr. Vandromel e toda equipe da manutenção do Instituto de Biociências da USP pela eficiência, prontidão, e sobretudo carinho demonstrados durante a realização desse trabalho.

Aos queridos amigos do laboratório de ecotoxicologia em Corpus Christi, Russell Hooten e Jim Biedenbach, pela ajuda e dicas durante a realização dos experimentos. Obrigada pela amizade demonstrada e pelos divertidos momentos proporcionados.

À querida Linda May por ter me acolhido com carinho e pela ajuda na minha adaptação. Obrigada por ter colocado à disposição um cantinho tão especial da sua casa.

À Terry, Brian, Heidi Lovett, as duas "Susans" pela receptividade e amizade demonstradas.

Ao Dr. Tunnell, diretor do Centro de Estudos Costeiros da Texas A&M University que colocou à disposição espaço e infra-estrutura necessários.

À CAPES, pela concessão das bolsas de estudo.

À PETROBRÁS, por ter permitido o uso do seu efluente e pela bolsa de estudos concedida.

À Neuza Vital, da PETROBRÁS, pela supervisão do trabalho e apoio durante as etapas para obtenção da bolsa recebida.

Ao Paulo Negrais Seabra, da PETROBRÁS, pelo apoio durante as etapas para a obtenção da bolsa de estudos.

Um agradecimento especial a todos da PETROBRÁS que diretamente se envolveram em alguma parte do trabalho e deram suporte fundamental para sua execução. Meu profundo reconhecimento para: Rosemberg Pinto Pestana, Jayme Setta Filho, Carlos Torres, Agostini, Carlos Magno, a gracinha do Sr. Valdeli, o professor, que durante as coletas do efluente carregava os baldes com 30 litros de amostra!! Muito obrigada a todos!

Aos funcionários da PETROBRÁS, João Eugênio Lopes Avelar, José Jorge Ferreira Peixoto, Nilce Hiromi Shioya, Wilson Herminio Tavares, Leila Ventura Abreu e José Francisco Tebaldi de castro que passaram importantes informações sobre água de produção.

Ao Oliveira (Comandante Mauro) pela eficiência no envio das amostras de água de produção para o Texas.

Ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), nas pessoas do seu ex-diretor Prof. Dr. José Galísia Tundisi e atual diretora, Profa. Dra. Maria do Carmo Callijuri pelo apoio durante a realização desse trabalho. Um especial agradecimento à Profa. M. C. Callijuri por ter dado seu apoio em alguns pedidos realizados.

Aos queridos funcionários do CRHEA, Claudete Poianas, Ivan Bueno, Mara, e da secretaria de pós-graduação da EESC-USP, Nazaré e Reynaldo (in memoriam) pelo apoio, compreensão e amizade durante a realização dos pedidos mais variados.

Aos bibliotecários Wagner (CEBIMar), Domingos e Raimunda (Instituto Oceanográfico), Mara (CRHEA) e Flávia Cassin (EESC) pelo apoio e carinho dispensados.

Ao biólogo Paulo Rodrigues e à Profa. Dra. Maria Inez Zanolli Sato pela realização dos testes Microtox.

Ao IPEN, nas pessoas da Profa Dra. Ivone Mulako Sato pela realização de algumas análises químicas e, da bióloga Suely Ivone Borrelly pela realização de alguns testes Microtox e que se mostrou uma querida nova amiga.

Ao Prof. Dr. Aristides de Almeida Rocha da Faculdade de Saúde Pública da USP, que tornou possível a realização de algumas análises químicas.

Ao Prof. Dr. Phan Van Ngan do Instituto Oceanográfico da USP que se dispôs a co-orientar na realização dos experimentos de respirometria com misidáceos, os quais, infelizmente não foram feitos devido ao meu pouco tempo disponível e, pelo empréstimo do material para filtração das amostras de água de produção.

Ao amigo Ricardo (técnico do laboratório do IO) pelo seu auxílio em alguns pedidos realizados.

À Profa. Dra. Takako Matsumara Tundisi pelo empréstimo da câmara de S-Rafter.

Ao Dr. Paul Krause da empresa Mec Analytical Systems e toda sua equipe por ter colocado à disposição a infra-estrutura para a realização do experimento com *S. purpuratus*.

À Dra. Debra Denton da EPA por ter enviado importantes referências para o trabalho.

À Forma 3 Fotolito e Fotocomposição, nas pessoas de Fernando Pedroso, João Luis, Noemi, Alessandro, Silvia Helena, Daniela, Jaqueline, Adriano, Sandra e Rubão por terem colocado à disposição toda a infra-estrutura para a realização de posters para congressos, serviço de fax, etc.

Ao oceanógrafo Bauer Rachid pelo auxílio, as vezes madrugada afora, e carinho durante a realização de alguns experimentos.

As minhas queridas amigas Sônia, Marta, Liseti, e amigo Biro, pelo fato de serem amigos tão queridos e especiais.

À minha querida amiga Marta (Titinha) por estar absolutamente sempre presente em todos os momentos importantes, dando seu apoio, carinho e com sábias palavras e dicas fundamentais para a vida.

À minha querida amiga Sônia Melo (Sô) pelo auxílio, as vezes madrugada afora, disposição e carinho durante a realização de alguns experimentos. Sou profundamente grata pela sua amizade, companheirismo, discussão de assuntos sobre a tese e deliciosas conversas durante a madrugada. Muito obrigada por compartilhar momentos tão importantes. Espero que nossos sonhos, entre eles, o do tão almejado emprego, se realizem! Aos amigos Armênio e Sônia pelos contatos realizados para resolver os problemas sobre o cálculo estequiométrico.

Aos queridos amigos Eneida, Ana Célia, Fernandinha Palanch, Márcia Reynier, Maria Cristina Maurat, Maria Lúcia Barciotti, Bruna, Pedro, Silvio, Cintia Miyaji, Giseli Kawauchi, Crisiani, Ana Cris, Ana Lúcia Diório, Juliana Berninger da Costa, Ana Cristina Marroquim e Sidney por terem tornado a realização desse trabalho mais alegre e por terem contribuído, cada um, da forma mais variada possível.

À querida Profa. Dra. Marion Nipper pelo carinho, amizade e por ter incentivado a idéia do pedido de uma bolsa sanduiche.

Ao querido Carlos Eduardo (Dadado) pela sua enorme disposição, prontidão e eficiência em resolver problemas com o computador.

Ao amigo Eduardo Bertoletti por ter esclarecido minhas dúvidas relativas à idéia de trabalhar com identificação da toxicidade e pelo estímulo que isso representou na época.

Aos queridos Carlos (Indião) e Vera pela amizade sincera, por servirem de pílulas durante a madrugada e pelas suas fofuras, o Rodrigo e o Guilherme que tornaram mais alegres algumas noites ao computador.

Aos queridos Padre Joaquim e Élina pela força invisível que suas orações representaram!

Aos queridos Fábio Brant, Pablo e Solange que indiretamente ajudaram e estiveram presentes em alguns momentos importantes.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
3. CAPÍTULO I	14
CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA E QUÍMICA DA ÁGUA DE PRODUÇÃO	
3.1 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1.1 Sistema de tratamento de efluentes da PETROBRÁS	15
3.1.2 Caracterização da água de produção	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.2.1 Efluente	38
3.2.2 Testes de toxicidade	46
3.2.3 Controle de qualidade dos testes	59
3.2.4 Análises químicas	60
3.2.5 Análise estatística	63
3.3 RESULTADOS	66
3.3.1 Características gerais das amostras	66
3.3.2 Efeito do tempo de estocagem	67
3.3.3 Efeito da decantação e centrifugação	67
3.3.4 Eficiência da oxidação com peróxido	68
3.3.5 Toxicidade das amostras de água de produção	69
3.3.6 Determinação da CENO e CI25	70
3.3.7 Efeito do tratamento sobre a toxicidade	72
3.3.8 Testes com substâncias de referência	73
3.3.9 Critérios de aceitabilidade dos testes	74
3.3.10 Análises químicas	76
3.4 DISCUSSÃO	78

4.0 CAPÍTULO II	105
IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DO USO DE FRACIONAMENTOS FÍSICOS E QUÍMICOS	
4.1 REVISÃO DA LITERATURA	106
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	111
4.2.1 Utilização de <i>Ulva</i> sp para redução de amônia	111
4.2.2 Testes com <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	115
4.2.3 Testes com H ₂ O ₂ , EDTA e tiosulfato de sódio	116
4.2.4 Identificação da toxicidade da água de produção	116
4.2.5 Análise estatística	123
4.3 RESULTADOS	124
4.3.1 Utilização de <i>Ulva</i> sp para redução de amônia	124
4.3.2 Testes com <i>S. purpuratus</i>	126
4.3.3 Testes com H ₂ O ₂ , EDTA e tiosulfato de sódio	126
4.3.4 Identificação da toxicidade	127
4.4 DISCUSSÃO	131
5. CONCLUSÕES	148
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
7. TABELAS	173
8. FIGURAS	208
9. ANEXOS	237
APÊNDICE	

RESUMO

Badaró- Pedroso, C. Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas. São Carlos, SP. 1999. 237p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A toxicidade de amostras brutas e tratadas de água de produção foi determinada através do uso de testes agudos com o misidáceo *Mysidopsis juniae* e a bactéria *Vibrio fisheri* (Microtox) e testes crônicos de curta duração, fecundação e embrio-larval, com os ouriços *Lytechinus variegatus* e *Arbacia punctulata*. Os testes com *M. juniae*, *V. fisheri* e embrio-larval com *L. variegatus* são recomendados para o monitoramento da água de produção. A água de produção bruta apresentou salinidade elevada, altos teores de amônia, óleos e graxas, sulfetos e bário, pH variável e baixos teores de oxigênio dissolvido. Análises de metais mostraram alterações de íons cálcio, estrôncio, magnésio e potássio. Os tratamentos foram oxidação química de sulfetos e fenóis com peróxido de hidrogênio e flotação, para redução de óleos. A ação do peróxido resultou na redução de sulfetos e fenóis, mas não diminuiu a toxicidade. O tratamento completo, flotação seguida de oxidação química, reduziu a toxicidade. A identificação da toxicidade de amostras fracionadas por: aeração, filtração, adições de EDTA e tiosulfato de sódio, *Ulva* sp e coluna de C18 indicou C18, *Ulva* sp, filtração e EDTA como os procedimentos mais eficientes na redução da toxicidade. Esses resultados sugerem a presença de quatro classes de contaminantes associados à toxicidade final: orgânicos não polares, amônia, material particulado e metais.

Palavras-chave: água de produção, identificação da toxicidade, organismos marinhos, óleos e graxas, amônia, peróxido de hidrogênio, flotação, testes de toxicidade, ouriços, misidáceo, Microtox®.

ABSTRACT

Badaró-Pedroso, C. Effects evaluation and toxicity identification from oil produced water with some marine species. São Carlos, SP. 1999. 237p. PhD Thesis (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The toxicity determination of treated and untreated produced water samples was carried out using acute tests with the mysid *Mysidopsis juniae* and the bacterium *Vibrio fisheri* (Microtox) and short-term chronic tests, fertilization and embryo-larval, with the seurchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctulata*. It is recommended that *M. juniae*, *V. fisheri* and *L. variegatus* embryo-larval tests be used together for produced water monitoring. The produced water samples showed high values of salinity, ammonia, oil and greases, sulfides, barium, variable pH, low dissolved oxygen and an excess or deficiency of calcium, strontium, magnesium and potassium ions. The treatments consisted of chemical oxidation of sulfides and phenols by hydrogen peroxide and air flotation to reduce oils. The chemical oxidation was efficient at reducing sulfides and phenols but toxicity did not decrease. The complete treatment, flotation plus chemical oxidation, reduced the toxicity. Toxicity identification evaluations procedures which consisted of aeration, filtration, EDTA and sodium tiosulfate additions, *Ulva* spp. and C18 column, were performed. The greatest toxicity reduction occurred with the C18 column, *Ulva* spp., filtration and EDTA addition. These results suggested four contaminants classes associated with the final toxicity: non-polar organic, ammonia, particulate matter and metals.

Key words: produced water, toxicity identification evaluation (TIE), marine organisms, oil and greases, ammonia, hydrogen peroxide, flotation, toxicity tests, sea urchin, mysid, Microtox®

1. INTRODUÇÃO

A degradação dos ambientes marinho e estuarino decorrente da presença de efluentes domésticos e industriais, de petróleo e seus derivados, além de drenagens de áreas urbanas, agrícolas e industriais, precipitação atmosférica e de resíduos sólidos torna necessária a tomada de medidas preventivas e corretivas, que venham a salvaguardar esses ecossistemas.

Entre os diversos tipos de efluentes líquidos e resíduos sólidos que são descartados no ambiente marinho, aqueles derivados das atividades de desenvolvimento e produção de petróleo e gás tem despertado interesse devido ao aumento nos últimos anos da exploração desses combustíveis (NIHOL & DUCROTOY, 1994).

A água de produção, considerada o principal tipo de despejo gerado durante as atividades petrolíferas, tem sido alvo de crescente pesquisa devido aos riscos ambientais apresentados pelo descarte excessivo desse efluente em ambientes aquáticos.

Vários estudos indicam que em ambientes de baixa energia os efeitos adversos sobre a comunidade aquática são elevados e em regiões de mar aberto são minimizados pela diluição, mas não são irrelevantes (GESAMP, 1993).

Até o momento inicial da extração de petróleo e gás por um poço, três etapas são percorridas durante as quais são geradas grandes quantidades de resíduos líquidos e sólidos. A primeira etapa envolve a exploração do reservatório, através da perfuração de um número reduzido de poços com o objetivo de determinar a natureza e extensão do potencial de hidrocarbonetos presentes. A segunda etapa, de desenvolvimento, envolve a perfuração de um grande número de poços. Durante essas duas etapas são produzidos dois tipos de despejo, cascalho e fluido de perfuração. Na terceira etapa, o poço passa a produzir petróleo associado à água de produção que será separada do óleo e posteriormente, descartada (SEABRA & SANTIAGO, 1984).

Os métodos usuais de tratamento e disposição desse efluente incluem o tratamento através de separadores água/óleo realizado nas plataformas, seguido de descarte no mar ou, disposição através de emissários submarinos na zona costeira. A injeção em poços desativados ou mesmo para a manutenção da pressão de poços produtivos também é uma alternativa muito utilizada (GESAMP, 1993).

A água de produção é uma mistura de água de formação e água injetada, e é o principal despejo produzido pelas plataformas de petróleo e gás. A água de formação ocorre naturalmente no reservatório. A água injetada é composta de água do mar filtrada, tratada com baixas concentrações de inibidores de corrosão e biocidas para evitar o crescimento microbiano (SOMERVILLE et al., 1987).

Os produtos adicionados rotineiramente na água de injeção são biocidas, geralmente à base de glutaraldeído, associados a um produto quaternário de amônio, como o bissulfito de amônio que é um inibidor de corrosão. O bissulfito de amônio vem sendo substituído pelo bissulfito de sódio que não apresenta incompatibilidade com os biocidas à base de glutaraldeído e não constitui uma fonte adicional de nitrogênio (SHIOYA & PEIXOTO, com. pes. 1999)¹.

Atualmente a PETROBRÁS está testando o uso de biocidas biodegradáveis e menos tóxicos, para a substituição dos biocidas à base de glutaraldeído. Outros produtos são injetados durante o processamento do petróleo e podem estar presentes na água de produção. Os produtos injetados são: desemulsificantes (compostos à base de óxido de etileno e de propileno), antiespumante (óleo de silicone), inibidor de incrustação (poliacrilatos) e os polieletrólitos (SHIOYA & PEIXOTO, com. pes. 1999)¹.

Em geral, a água de produção caracteriza-se por conter valores elevados de sólidos em suspensão, salinidade variando entre 12 a 180‰, metais traço, hidrocarbonetos dissolvidos e coloidais, compostos orgânicos dissolvidos, aditivos químicos como surfactantes, inibidores de corrosão e biocidas, compostos de enxofre, fenol, nitrogênio amoniacal e pequenas quantidades de radionuclídeos, particularmente rádio 226 e 228.

¹ SHIOYA, N. H. & PEIXOTO, J. J. F. (1999). (Centro de Pesquisas- CENPES, PETROBRÁS, RJ).

No entanto, podem ocorrer variações nessa composição dependendo do tipo de formação geológica explorada, dos tipos de aditivos químicos adicionados durante o processo de produção e da eficiência dos separadores óleo-água nas plataformas (SOMERVILLE et al., 1987; TIBBETTS et al., 1992; GESAMP, 1993).

Em relação ao volume produzido de água de produção nas plataformas, ele é dependente da idade do poço, isto é, quanto mais antigo maior a relação entre água produzida/ óleo. Uma estimativa feita para o ano de 1990 baseada nos valores obtidos entre 1979 e 1986 da quantidade de água produzida gerada nos campos de produção do Mar do Norte indicaram um volume de 110×10^6 ton./ano descartado no oceano (SOMERVILLE et al., 1987). Segundo TIBBETTS et al. (1992), somente em 1990, o setor do Reino Unido no Mar do Norte descartou 159×10^6 toneladas de água de produção. Dados mais recentes para a região do Mar do Norte, indicam que o volume total de água de produção descartado foi de 187 milhões m^3 em 1993 e estimava-se para 1997 um volume total de 340 milhões de m^3 , segundo RØE et al. (1996).

Nos Estados Unidos, em 1985, as atividades petrolíferas produziram cerca de 21 bilhões de barris (1 barril = 159L) de água de produção (ARSCOTT, 1987). Dados mais recentes, somente para a região do Golfo do México, indicam que em 1990 foram gerados 850 milhões de barris (KRAUSE, 1995).

Estimativas de 1990 relativas à quantidade global da entrada de hidrocarbonetos nos oceanos, oriundos de descargas de água de produção, contabilizam um valor de 47.000 toneladas/ano (GESAMP, 1993).

No Brasil, os campos petrolíferos estão divididos em campos terrestres e marítimos distribuídos no continente e em algumas áreas ao longo da costa. Nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe e Espírito Santo são encontrados tanto campos terrestres como marítimos. Nos Estados do Amazonas e Bahia, somente são encontrados campos terrestres, e nos Estados do Rio de Janeiro (Bacia de Campos), São Paulo e Santa Catarina somente campos marítimos (ABREU, com. pes. 1999)².

² ABREU, L. V. (1999). (Centro de Pesquisas- CENPES, PETROBRÁS, RJ). *Comunicação pessoal*.

Do total de 261 milhões de barris de petróleo produzidos em 1995, cerca de 27% foram oriundos de poços em terra e 73% de poços de plataformas marítimas. Três Estados produziram quase 87% do total, o Rio de Janeiro (Bacia de Campos) com 66,3% seguido do Rio Grande do Norte com 11,8% e Bahia com 8,5% (AGÊNCIA ESTADO, 1996).

No Brasil, o maior campo de petróleo está localizado na Bacia de Campos no Rio de Janeiro e ocupa uma área de 5.600 quilômetros quadrados. Nessa área estão distribuídas 15 plataformas fixas, 15 semi-submersíveis e 24 sondas de perfuração (MORENO, 1995).

Segundo SHIOYA & PEIXOTO (com. pes. 1999)¹, o volume total de água de produção gerado na Bacia de Campos é de 47.000 m³/dia.

Em 1995, na Bacia de Campos foi obtido um recorde diário de 500 mil barris de óleo e 10,4 milhões de metros cúbicos de gás natural. No entanto, em decorrência da descoberta de novos poços e devido ao avanço na tecnologia de prospeção em grandes profundidades, a PETROBRÁS espera atingir a produção de 1,5 milhão de barris de óleo por dia no ano 2000 (MORENO, 1995).

Devido às estimativas relativas ao aumento da produção de petróleo nos próximos anos, também é previsto um aumento na quantidade de água de produção gerada, o que implica na necessidade do seu descarte adequado e sem prejuízos ao ambiente aquático.

No Brasil, a água de produção gerada em campos terrestres é tratada através de separadores água-óleo e é injetada em poços. Em campos marítimos, a água é descartada das plataformas após tratamento em separadores água-óleo ou é transportada até o continente, onde é tratada por meio de processos físicos e químicos para posterior descarte através de emissário submarino, ou também pode ser injetada nos poços. (SHIOYA & PEIXOTO, com. pes. 1999)¹.

As estações de tratamento de efluentes de Cabiúnas, RJ e de São Sebastião, SP possuem o mesmo sistema de tratamento, constituído de um flotor para remoção de óleos através da flotação induzida por ar e tratamento químico para remoção de sulfetos e fenóis, através da oxidação química por peróxido de hidrogênio. Após o tratamento, o efluente é descartado através de emissário submarino.

Até a data da entrada em funcionamento do sistema de tratamento de efluentes, em 22/02/1999, a água de produção armazenada nos Dutos e Terminais do Centro-Oeste e São Paulo – DTCS (ex-Terminal Marítimo Almirante Barroso-TEBAR) em São Sebastião, SP era utilizada como lastro de navios petroleiros para que pudesse ser descartada em alto mar. O despejo do efluente pelos navios era feito de acordo com as exigências da Convenção Internacional “MARPOL” que estabelece as condições para o descarte de resíduos químicos em alto mar (VIEIRA, com. pes. 1996)³.

Despejos provenientes de outras fontes, como dos separadores água-óleo, eram descartados nos córregos Outeiro e Guaiamú, localizados nas praias de São Sebastião e do Porto Grande, respectivamente (BADARÓ-PEDROSO, 1993).

Após obtenção da licença de funcionamento fornecida pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, o efluente tem sido lançado no Canal de São Sebastião através do emissário submarino localizado a 25 metros de profundidade e a mais de um quilômetro da costa.

Estudos envolvendo a avaliação e o monitoramento da qualidade da água e sedimento do Canal de São Sebastião foram desenvolvidos por BÍCEGO (1988), MOREIRA et al. (1989), WEBER & BÍCEGO (1991), FUNDESPA (1992), BADARÓ-PEDROSO (1993), MELO (1993), ZAMBONI (1993) e BÍCEGO et al. (1996) antes da entrada em funcionamento da ETE e do emissário submarino.

Em BÍCEGO (1988) são apresentados os resultados das análises de hidrocarbonetos realizadas em amostras superficiais de água e sedimentos do canal de São Sebastião coletadas entre 1985 e 1986. Para amostras de água não poluídas foram estabelecidos como valores normais, limites inferiores a $1\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ hidrocarbonetos. Algumas das amostras do canal apresentaram concentrações de hidrocarbonetos acima desse limite, indicando a presença de fontes antrópicas de hidrocarbonetos no local. Para sedimentos, valores abaixo de $5\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ são considerados como de sedimentos não poluídos e na maioria das amostras do

³ VIEIRA, N. (1996). (Dutos e Terminais do Centro Oeste e São Paulo - DTCS, PETROBRÁS, São Sebastião, SP). *Comunicação pessoal*

canal os valores obtidos foram inferiores a esse limite. No entanto, a obtenção desses valores não significa que o canal não esteja recebendo contribuição de hidrocarbonetos de petróleo. Nas amostras coletadas nas proximidades do terminal da PETROBRÁS, bem como naquelas onde foi constatado o percurso preferencial de óleo por ocasião de derramentos, os cromatogramas evidenciaram a contaminação devida à presença de hidrocarbonetos de petróleo.

Segundo MOREIRA et al. (1989) que realizaram duas campanhas de coleta de água em vários pontos do canal em janeiro e novembro de 1988, os resultados das análises químicas realizadas indicaram que em geral, a qualidade da água do canal é aceitável para a classe 5 e poucas vezes alguns parâmetros excederam os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA (BRASIL, 1986). A Resolução CONAMA classifica as águas do Território Nacional em nove classes de acordo com seus usos preponderantes. Na classe 5 referente às águas salinas, as águas são destinadas à recreação de contato primário, à proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana. Para o enquadramento nessa classe são estabelecidos limites máximos para alguns parâmetros físicos e químicos (Apêndice I).

O trabalho da FUNDESPA (1992) envolveu coleta e análise de organismos bentônicos, nectônicos, fitoplâncton, zooplâncton e análises de sedimentos e parâmetros físico-químicos da água do canal.

Os trabalhos desenvolvidos por BADARÓ-PEDROSO (1993), MELO (1993) e ZAMBONI (1993) envolveram a realização de testes de toxicidade aguda (anfípodo *Tiburonella viscana*) e crônica de curta duração (misidáceo *Mysidopsis juniae*, gametas e embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*) com amostras da coluna d'água, sedimento e água intersticial do canal.

Na maioria dos testes com *M. juniae* realizados com amostras de água não foi possível detectar a presença de toxicidade através dos parâmetros biológicos analisados (sobrevivência e crescimento). Em uma das estações localizada na ponte do pier da PETROBRÁS, na coleta de janeiro de 1991, foi observado efeito sobre o crescimento dos organismos. O teste com *T. viscana* indicou toxicidade dos sedimentos coletados no porto da cidade de São Sebastião, próximo ao atracadouro da balsa. Os testes com *L. variegatus* realizados com água intersticial indicaram predominância da toxicidade nas amostras de

sedimento coletadas nas proximidades do terminal petrolífero. Esses resultados foram corroborados pelas análises de hidrocarbonetos alifáticos totais que detectaram contaminação por petróleo nos sedimentos próximos ao Terminal Petrolífero, incluindo o do porto da cidade de São Sebastião.

Pode-se concluir através dos estudos desenvolvidos no Canal de São Sebastião até o ano de 1991 que a área já estava sendo levemente impactada, de maneira um pouco mais acentuada somente em alguns pontos específicos, em decorrência da contaminação oriunda principalmente de hidrocarbonetos de petróleo, mas no geral a qualidade das suas águas foi considerada satisfatória.

Um importante fator a ser considerado na qualidade das águas e sedimentos do Canal é relacionado aos derrames de petróleo causados por navios petroleiros que funcionam como pulsos instantâneos de entrada de hidrocarbonetos no canal. Além desse fator, o lançamento contínuo dos efluentes gerados no DTCS constituídos preponderantemente de água de produção, mesmo considerando-se a grande capacidade de diluição do canal, poderão vir a modificar a qualidade das águas e sedimentos.

No Brasil, estudos sobre os efeitos da exposição de organismos marinhos à água de produção foram pouco desenvolvidos e são restritos aos trabalhos de SEABRA et al. (1992), FUNDESPA (1992), REYNIER et al. (1993), PHAN et al. (1994), SOUSA & TOMMASI (1997).

SEABRA et al. (1992) realizaram testes de toxicidade aguda com *Artemia* sp utilizando amostras de água de produção não tratadas e tratadas através da oxidação química com peróxido de hidrogênio, com o objetivo de determinar a eficiência desse tratamento na redução da toxicidade. Os resultados obtidos indicaram uma redução média da toxicidade de 49% e 53% após a remoção de sulfetos e fenóis, respectivamente. Segundo os autores, a pequena redução da toxicidade pode ter sido causada pelo excesso de peróxido utilizado no tratamento, baixa remoção de mercaptanos ou ainda pela formação de enxofre coloidal gerado como subproduto da reação de oxidação.

Nos estudos desenvolvidos pela FUNDESPA foram realizados testes de toxicidade envolvendo três grupos de organismos, um crustáceo, dois moluscos e uma microalga utilizando duas amostras de efluente já tratado, o que impossibilitou a

quantificação da redução da toxicidade. Nos testes de toxicidade aguda com o crustáceo misidáceo *Promysis atlantica* e adultos do gastrópode *Costoanachis sertulariarum* foram obtidos valores de CL50; 96h entre 0,14 e 15,8% de efluente tratado. No teste com larvas do bivalve *Crassostrea brasiliana* os valores de CL50; 24h foram de 6,8 e 0,22% de efluente tratado. No teste com a microalga *Skeletonema costatum* foi obtido um valor de CE50; 96h de 0,3 % de efluente tratado, resultados que indicaram alta toxicidade do efluente (FUNDESPA, 1992; PHAN et al., 1994; SOUSA & TOMMASI, 1997).

REYNIER et al. (1993) constataram toxicidade aguda da água de produção bruta sobre duas espécies de crustáceos, o misidáceo *Mysidopsis juniae* e o copépodo *Temora stillyfera*.

As principais conclusões obtidas pela FUNDESPA (1992) foram de que o efluente tratado apresentou toxicidade elevada e que seu lançamento contínuo poderia vir a causar efeitos adversos à comunidade de organismos nas proximidades do local de descarga.

A partir desse trabalho, algumas questões foram levantadas em relação à magnitude da variação temporal da toxicidade do efluente, à eficácia do sistema de tratamento que havia sido proposto na época e, aos fatores responsáveis pela manutenção da toxicidade do efluente tratado.

A continuidade de pesquisas objetivando o aumento do conhecimento sobre efeitos subletais ou crônicos da água de produção sobre os organismos marinhos são extremamente necessárias para a tomada de medidas de proteção para a biota.

Para responder a essas questões foram desenvolvidos, no presente projeto, estudos direcionados para a caracterização de amostras brutas e tratadas do efluente. Foram realizados fracionamentos físicos e químicos de amostras brutas e tratadas de água de produção seguidos da aplicação de testes de toxicidade com espécies representativas e sensíveis da biota, acompanhados de análises químicas das amostras e, investigados quais os compostos responsáveis pela toxicidade das amostras do efluente

A análise de todas as substâncias químicas presentes em uma mistura complexa e sedimentos contaminados constitui-se em uma atividade analítica e economicamente inviável. Essas substâncias podem estar presentes em níveis abaixo da capacidade de

detecção analítica dos métodos, e mesmo assim podem apresentar toxicidade. Além disso, outros fatores como as interações sinérgicas e antagônicas entre os constituintes do efluente, os processos de intempérie e os coeficientes de partição podem interferir na biodisponibilidade e toxicidade de produtos químicos após sua chegada ao corpo receptor, podendo levar a modificações dos mesmos.

Os testes de toxicidade aparecem como uma das ferramentas indispensáveis em estudos de avaliação, controle e monitoramento da qualidade da água e sedimentos e segundo SANTORO & FIKSLIN (1987), são considerados um procedimento muito eficaz para avaliar os efeitos combinados de vários componentes químicos de misturas complexas sobre os organismos.

Desse modo, os testes de toxicidade com organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (produtor, consumidor primário e secundário), a compartimentos distintos (coluna d'água e sedimento) e a grupos filogenéticos diferentes podem, juntamente com as análises de parâmetros físico-químicos e levantamento de espécies, fornecer informações mais realistas dos efeitos de contaminantes sobre a biota aquática. Dessa forma auxiliam mais eficazmente, o estabelecimento de limites individuais de substâncias químicas, bem como a definição de padrões máximos de emissão de misturas complexas que não venham a causar efeitos adversos sobre os organismos.

A utilização de espécies representativas do ambiente em questão, através de um estudo direcionado à caracterização ecotoxicológica do efluente, possibilita a determinação dos melhores testes ou parâmetros biológicos disponíveis para detectar a toxicidade desse tipo de efluente em níveis que possam assegurar proteção à comunidade biológica local (ANDERSON et al., 1988).

Devido à variação da tolerância apresentada pelas espécies aos constituintes de um efluente recomenda-se a utilização de mais de um grupo de organismos quando se quer determinar os efeitos ecológicos de uma mistura complexa (EPA, 1991). Segundo ANDERSON et al. (1988), para se estimar o impacto de um efluente sobre a comunidade biológica devem ser empregados testes de toxicidade padronizados com espécies sensíveis, ecologicamente importantes e/ou nativas da área a ser estudada.

No presente projeto, foram escolhidos testes de toxicidade que incluem espécies pertencentes a três grupos distintos, bactérias, equinodermos e crustáceos. Nesta seleção foram adotados critérios como, padronização dos testes (CETESB, 1987; 1992a,b), avaliação prévia da sensibilidade tanto a compostos isolados, como a misturas complexas (PRÓSPERI et al., 1992; NIPPER et al., 1993a,b; PRÓSPERI, 1993; REYNIER et al., 1993; ZAMBONI, 1993) e ocorrência natural no ambiente estudado (BADARÓ-PEDROSO, 1993; ZAMBONI, 1993).

Entre as quatro espécies escolhidas foram incluídos quatro parâmetros biológicos, onde em dois testes agudos as respostas medidas foram a emissão de fluorescência da bactéria *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®) e a sobrevivência do misidáceo *M. juniae*. Nos testes crônicos de curta duração, com os ouriços *Lytechinus variegatus* e *Arbacia punctulata*, as respostas foram a capacidade de fecundação e o desenvolvimento embrio-larval.

O ouriço da espécie *Arbacia punctulata* utilizado na parte experimental realizada nos Estados Unidos não ocorre na área estudada, mas apresenta todas as características favoráveis a sua utilização.

Para a identificação dos compostos responsáveis pela toxicidade do efluente foi realizado um Estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT), através da utilização de métodos de fracionamentos físicos e químicos.

Esses procedimentos vêm sendo utilizados, desde a década de 80, para a identificação da toxicidade de efluentes de água doce e mais recentemente, de efluentes salinos e amostras de sedimentos (WALSH & GARNAS, 1983; BOTTS et al., 1989; FAVA et al., 1989; BURGESS et al., 1993a,b, 1996).

Os métodos para avaliação e identificação da toxicidade são baseados no conceito de que alguns fatores, como por exemplo o pH, podem interferir e modificar a toxicidade de uma amostra. Desse modo, os procedimentos de AIT consistem, basicamente, na manipulação física e química do efluente permitindo que mudanças na sua toxicidade possam ser medidas através da utilização de testes de toxicidade padronizados (DORN & COMPERNOLLE, 1995).

Um estudo de AIT envolve três fases: caracterização, identificação e confirmação da toxicidade que podem ser realizadas separadamente ou em paralelo (EPA, 1991).

Na primeira fase, são utilizados métodos para caracterizar a natureza física e química dos constituintes responsáveis por efeitos adversos. Cada um desses métodos de fracionamento é responsável pela remoção ou isolamento de um grupo de compostos. No caso dos metais, esse isolamento é feito através da quelação com EDTA; os orgânicos são extraídos através de uma coluna de C_{18} ; compostos que variam em função do pH, através de uma câmara de atmosfera controlada; compostos voláteis, através de aeração; compostos filtráveis, através de filtração e oxidantes, através de reações de óxido-redução. Com cada amostra fracionada de efluente são realizados testes de toxicidade e os resultados são sempre comparados com um teste realizado com uma amostra controle ou não fracionada. As informações obtidas nessa fase podem ser usadas no planejamento de estudos de tratamento de efluentes.

Na segunda fase, os compostos pertencentes à classe de contaminantes determinada na fase anterior são identificados através de técnicas analíticas específicas.

Na terceira fase, os contaminantes sob suspeita, caracterizados na primeira fase e identificados na segunda, são confirmados através da utilização de testes químicos e toxicológicos adicionais (EPA, 1991; DORN & COMPERNOLLE, 1995).

Estudos de AIT, geralmente, possibilitam a escolha da tecnologia disponível mais apropriada ao controle e tratamento do efluente com vistas à remoção da sua toxicidade. De um total de 52 estudos conduzidos nos Estados Unidos até 1990, em 27 deles foi possível identificar os compostos responsáveis pela toxicidade. No entanto, em 12 indústrias, onde optou-se apenas pela mudança do tipo de tratamento empregado sem a realização prévia de um estudo de AIT, verificou-se que somente 4 estavam de acordo com os limites permitidos de emissão de poluentes previstos pela lei (DORN & COMPERNOLLE, 1995).

No presente projeto, foi realizada a primeira fase de um estudo de AIT, através da utilização de seis fracionamentos físicos e químicos de amostras brutas e tratadas do efluente.

Parte do projeto foi conduzido nos Estados Unidos, onde as amostras fracionadas foram utilizadas em testes de toxicidade com o ouriço *Arbacia punctulata* e após o retorno ao Brasil, os fracionamentos foram repetidos e as amostras fracionadas foram utilizadas em testes de toxicidade com o ouriço *L. variegatus*.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Determinar a toxicidade da água de produção, através da utilização de testes de toxicidade aguda e crônica (de curta duração).
- 2) Avaliar a eficiência do tratamento adotado pela PETROBRÁS na remoção da toxicidade do efluente.
- 3) Verificar se limites legais para compostos químicos em efluentes são contemplados.
- 4) Adequar os métodos de caracterização da toxicidade de amostras salinas tendo como base a metodologia internacional existente.
- 5) Identificar os grupos de compostos do efluente responsáveis pela toxicidade.
- 6) Definir testes para o monitoramento de rotina do efluente lançado no ambiente.

3. CAPÍTULO I
CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA E QUÍMICA DA ÁGUA
DE PRODUÇÃO

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Sistema de tratamento de efluentes da PETROBRÁS

O sistema adotado pela PETROBRÁS na estação de tratamento de efluente (ETE) no Dutos e Terminais Centro-Oeste São Paulo – DTCS (ex-TEBAR) em São Sebastião, SP consiste do processo de flotação por ar induzido, ou seja, flutuação induzida por meio de bolhas de ar, para a separação e a remoção de óleos, seguido da oxidação química com peróxido de hidrogênio para a redução de sulfetos e fenóis, e descarte através de emissário submarino.

3.1.1.1 Histórico

A opção por esse sistema de tratamento foi baseada em resultados de uma série de estudos realizados pela PETROBRÁS em conjunto com a Empresa Ambiental Laboratórios. Foram conduzidas análises físicas e químicas dos efluentes visando determinar os parâmetros fora dos limites permitidos pela legislação de controle de efluentes líquidos, e ensaios de bancada empregando diferentes processos de tratamento para definir qual o mais adequado para a redução desses limites.

Um total de 29 amostragens do efluente foram realizadas visando a sua caracterização física e química. De acordo com o relatório apresentado pela AMBIENTAL (1991), os sulfetos e fenóis apresentaram concentrações acima dos limites permitidos pela Resolução CONAMA (BRASIL, 1986) na maioria das amostras. O nitrogênio amoniacal, o ferro, o zinco e os óleos & graxas, eventualmente ultrapassaram os limites da legislação.

Esses resultados levaram a PETROBRÁS a definir como meta principal, a redução dos níveis de sulfetos e fenóis, e posteriormente, também passou a considerar o uso de algum tratamento específico para a remoção de óleos.

Em 1991, a Empresa Ambiental Laboratórios concluiu os estudos desenvolvidos com ensaios de tratabilidade do efluente visando a remoção de sulfetos e fenóis, através dos processos de floculação/coagulação, eletrofloculação, oxidação por aeração e oxidação por produtos químicos. Os resultados obtidos indicaram o processo de oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como sendo o mais adequado para a redução de sulfetos e fenóis.

A seguir, foram realizadas novas simulações do tratamento químico com peróxido de hidrogênio em uma planta piloto construída no DTCS. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento com peróxido removeu, em média, cerca de 98% de sulfetos e entre 37 a 70% de fenóis indicando boa performance do processo (AMBIENTAL, 1991).

Para verificar a eficiência da oxidação química com peróxido na remoção da toxicidade, foram realizados testes de toxicidade com três amostras de efluente. Uma delas foi tratada no laboratório do Centro de Pesquisas (CENPES) da PETROBRÁS, RJ e as outras duas foram tratadas na estação piloto do DTCS em São Sebastião e enviadas à Fundação de Estudos e Pesquisas Aquáticas – FUNDESPA, localizada em São Paulo.

No CENPES foram realizados testes de toxicidade aguda com *Artemia* sp utilizando amostras não tratadas e tratadas através da oxidação com peróxido visando determinar a eficiência do tratamento na redução da toxicidade.

Na FUNDESPA foram realizados testes de toxicidade envolvendo três grupos de organismos, um crustáceo, dois moluscos e uma microalga utilizando duas amostras de efluente já tratado, o que impossibilitou a quantificação da redução da toxicidade.

Para o tratamento de óleos optou-se pelo sistema físico de flotação devido a adoção prévia do mesmo sistema pela estação gêmea do TEBAR localizada no Terminal Petrolífero de Cabiúnas, RJ. (FILHO, com. pes. 1999)⁴.

⁴ FILHO, J. S. (1999). (Coordenadoria de Qualidade, Segurança Industrial e Meio Ambiente-COSEMA/DTCS/PETROBRÁS, SP). *Comunicação pessoal*.

3.1.1.2 Processo de Flotação

O processo de flotação é utilizado na separação da fase sólida (partículas em suspensão) da fase líquida (misturas complexas) pelas indústrias de processamento químico e mineral há mais de 100 anos. Entre as indústrias que utilizam esse processo para a clarificação de seus efluentes destacam-se as refinarias de petróleo e as indústrias de polpa de papel, além das estações de tratamento de esgotos domésticos e industriais que o utilizam para o espessamento de lodos ativados (EDZWALD & WALSH, 1992; HAMMER & HAMMER, 1996; DAMATO, 1997).

A indústria petrolífera também tem utilizado o processo de flotação para a redução da concentração de hidrocarbonetos de petróleo sob a forma de partículas em suspensão sólidas e oleosas, presentes na água de produção (RIVIERE & GARLAND, 1995).

Outro importante uso a que se destina o processo de flotação é ser a primeira etapa da clarificação para a produção de água potável de águas com presença de algas, baixa turbidez e coloração intensa (ZABEL, 1985).

O processo de flotação pode ser classificado de acordo com a sua aplicação (flotação de carvão e quartzo), presença ou ausência de espuma e ainda pelo método utilizado na produção de bolhas (flotação por ar disperso, microflotação ou flotação por ar dissolvido).

Na flotação por ar disperso as bolhas produzidas por meios mecânicos apresentam tamanho na faixa de 0,1 a 1,0 mm e surfactantes são adicionados para produzir a adesão das bolhas às partículas. Na microflotação são empregadas taxas de fluxo de gás muito baixas e agentes espumantes para a produção de microbolhas com cerca de 40 μm de diâmetro. Na flotação por ar dissolvido as bolhas são produzidas por meio da injeção de ar comprimido e apresentam diâmetros na faixa de 10 a 100 μm (EDZWALD & WALSH, 1992).

A flotação por meio de ar dissolvido é um processo de separação gravitacional, onde as partículas ou agregados de partículas em suspensão aderem-se às bolhas de ar, diminuindo sua densidade aparente e levitando até a interface líquido/ar (MATIS & ZOUBOULIS, 1995a,b).

Na flotação por ar dissolvido, ar pressurizado (1 a 4 atm) pode ser injetado diretamente no efluente a ser tratado ou injetado primeiro em uma parte do efluente

mantida em um tanque de retenção que a seguir é aberto fazendo com que o efluente pressurizado entre em contato com o efluente mantido sob pressão atmosférica. O ar dissolvido hipersaturado ao entrar em contato com a pressão atmosférica é liberado sob a forma de pequenas bolhas de ar que arrastam as partículas de óleo e matéria em suspensão até a superfície, de onde são removidas por meio de raspadores (BRAILE & CAVALCANTI, 1978; WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION, 1994; HAMMER & HAMMER, 1996).

Uma variação da flotação por ar dissolvido é a flotação por ar induzido, onde o ar é obtido por meio de um rotor de aeração que capta o ar contido na parte superior do flotador e o injeta no líquido, promovendo a flotação do óleo livre e parte dos sólidos presentes no efluente (AVELAR, com. pes. 1999)⁵.

Geralmente, o processo de flotação é precedido da adição de produtos químicos visando aumentar a eficiência na remoção de sólidos. Esses produtos agem sobre as gotas de óleo dispersas no meio líquido, desestabilizando-as ou quebrando as emulsões de óleo-água presentes. Entre os produtos mais utilizados na quebra de emulsões ou como floculantes destacam-se os sais inorgânicos de ferro ou alumínio e os polieletrólitos orgânicos (BRAILE & CAVALCANTI, 1978; MANAHAN, 1994; WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION, 1994).

Os polieletrólitos também auxiliam diretamente na flotação dos sólidos em suspensão, através da alteração das propriedades da superfície dos sólidos, líquidos ou mesmo das bolhas de ar e como resultado melhoram a capacidade de adesão das bolhas aos sólidos em suspensão (WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION, 1994). De acordo com HAMMER & HAMMER (1996), a adição de floculantes aumenta a capacidade de adesão das partículas pelas bolhas em cerca de 95% ou mais.

De acordo com WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (1994), quando os sais de ferro ou alumínio são utilizados, um dos problemas apresentados é relacionado ao grande volume de lodo gerado e possíveis dificuldades para a sua disposição adequada.

⁵ AVELAR, J. E. L. (1999). (DTCS/PETROBRÁS, São Sebastião, SP). *Comunicação pessoal*.

Em relação aos polieletrólitos orgânicos, apesar de serem altamente eficientes na demulsificação de óleos, apresentam custo muito elevado.

O flotador utilizado na PETROBRÁS é a ar induzido (marca USFILTER, modelo QUADRICEL Q110™) com capacidade para um volume aproximado de 24m³. Ele é constituído de quatro câmaras de flotação sequenciais, equipadas com rotores de aeração responsáveis pela produção de ar injetado no efluente. A quantidade de ar introduzida no líquido é ajustada manualmente através de uma válvula de controle e o tempo de retenção do efluente no flotador é de aproximadamente 10 minutos para uma vazão máxima projetada de 250m³/h. Escumadores instalados nas duas laterais de cada câmara de flotação coletam continuamente a borra de material flotado que é descarregada em duas canaletas laterais e a partir daí em um tanque de acúmulo (AVELAR, com. pes. 1999)⁵.

Um misturador hidráulico posicionado na entrada do flotador permite a dosagem de soda cáustica, polieletrólito e peróxido de hidrogênio a serem adicionados ao efluente. A soda cáustica a 50% é utilizada para manter o pH do efluente em uma faixa alcalina, o polieletrólito orgânico auxilia na quebra de emulsões e aglutinação do óleo e sólidos em suspensão e o peróxido de hidrogênio é usado para uma pré-oxidação do sulfeto visando minimizar a emissão do H₂S para a atmosfera. O flotador também é equipado com um sistema de segurança constituído de uma válvula que controla a pressão e a formação de vácuo na parte superior do flotador, permitindo a liberação dos gases para a atmosfera. A eficiência do flotador na remoção do óleo livre com densidade média de 0,9 Kg/L é de cerca de 80 a 90%, segundo AVELAR (com. pes. 1999)⁵.

3.1.1.3 Processo de Oxidação Química

Os constituintes orgânicos presentes nos efluentes podem ser tratados através de processos biológicos, químicos e físicos. No entanto, o tratamento biológico nem sempre é possível devido à presença em alguns efluentes de compostos tóxicos e inibidores do crescimento dos microorganismos. Em relação ao tratamento físico, ele sozinho não é suficiente para a remoção dos compostos orgânicos solúveis presentes no efluente. Devido a essas dificuldades, a oxidação química tem sido considerada uma alternativa eficaz para o tratamento de compostos orgânicos (BOWERS, 1990; WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION, 1994).

Muitas indústrias utilizam a oxidação química como uma das etapas para o tratamento dos seus efluentes e dependendo da classe de efluente a ser tratada, diferentes tipos de oxidantes estão disponíveis no mercado (Tabela 1).

Tabela 1- Características dos produtos utilizados no processo de oxidação química.

Oxidante	Fase ^a	Principais aplicações	Características
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	L	Oxidação de orgânicos refratários, fonte de oxigênio	Pode ser estocado no local, produção de produtos indesejáveis não é bem conhecida, econômico, geralmente requer uso de ácido e catalisador
C ₂	G	Desinfecção, oxidação de inorgânicos (CN, NH ₃), Fe ⁺⁺	-
Cl ₂ ou HOCl	G, L ^b	Desinfecção, oxidação de cianetos, clareamento de polpa e papel	Possível formação de orgânicos clorados como espécie residual
ClO ₂	G	Desinfecção, clareamento de polpa e papel	Não produz orgânicos clorados
Ozônio (O ₃)	G	Desinfecção, oxidação de orgânicos refratários e inorgânicos, destruição de trihalometanos precursores na água potável, clareamento de polpa e papel	Altamente reativo, não produz compostos indesejáveis, gerado no local, custo muito elevado
Permanganato (KMnO ₄)	S, L	Oxidação de substâncias húmicas e produtoras de odor e gosto, oxidação de orgânicos e inorgânicos	Pode ser estocado no local, produção de produtos indesejáveis não é bem conhecida, pode gerar sólidos (MnO ₂) de difícil disposição
FeO ₄ ⁻² , S ₂ O ₈ ⁻²	S	Somente estudos de laboratório	Dados de laboratório ou estudos de caso insuficientes

^a Estado típico no qual o oxidante é encontrado. G = gás, L = líquido, e S = sólido

^b Cl₂ fornecido como gás, HOCl fornecido como solução aquosa de NaClO₄

Retirado e modificado de BOWERS (1990) e WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (1994)

Entre as indústrias que utilizam a oxidação química como uma das etapas de tratamento de efluentes estão incluídas as refinarias de petróleo, indústrias de celulose, plásticos e resinas, borracha, e coque e gás (WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION, 1994).

O oxidante escolhido para um determinado tipo de efluente deverá apresentar as seguintes características: baixo custo, fácil aquisição, reatividade com os compostos a serem tratados e a não geração de subprodutos indesejáveis.

A seleção do oxidante adequado não depende somente da sua reatividade, mas também da taxa de reação e necessidade de uso de catalisadores e ajuste de pH, sendo a taxa da reação de oxidação um dos fatores mais importantes a serem considerados na aplicação de um oxidante para o tratamento de determinado tipo de efluente. Ela é dependente de uma série de variáveis como a temperatura, concentração do oxidante, catalisadores, pH,

produção de subprodutos e impurezas no sistema, que devem ser consideradas simultaneamente.

Em temperaturas e concentrações elevadas as reações ocorrem mais rapidamente e o mesmo pode ocorrer na presença de certos catalisadores. No entanto, a necessidade do uso de catalisadores depende do tipo de oxidante e dos compostos a serem oxidados. Os catalisadores mais utilizados incluem os metais e certos espectros de luz, como na fotocatalise.

A velocidade das reações de oxidação também é dependente do pH, resultando na necessidade de seu ajuste para valores ácidos ou básicos, de acordo com o oxidante utilizado. Os subprodutos gerados durante a reação de oxidação e impurezas presentes no sistema também podem interferir na velocidade da reação, agindo como autocatalisadores ou diminuindo a velocidade da reação.

De acordo com o exposto, a realização de ensaios prévios é fundamental para verificar as doses e condições necessárias à obtenção de uma performance adequada do oxidante selecionado (BOWERS, 1990).

Segundo WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (1994) e SIQUEIRA (1998), o peróxido de hidrogênio tem sido um dos oxidantes mais utilizados para o tratamento de efluentes devido a sua capacidade de oxidar a maioria dos compostos orgânicos e vários inorgânicos.

I- Oxidação de sulfetos

Nos efluentes de refinarias de petróleo e naqueles gerados durante as atividades de produção de petróleo, como é o caso da água de produção, compostos de enxofre como sulfeto de hidrogênio e mercaptanas são encontrados em altas concentrações. Um dos fatores responsáveis pela sua formação é a ação das bactérias sulfato redutoras. A oxidação do sulfeto pelo peróxido de hidrogênio apresenta uma grande vantagem devido à ação específica da substância que não se perde em reações secundárias. Outra vantagem é a sua decomposição natural em água e oxigênio, quando é constantemente fornecido ao sistema. O constante fornecimento de peróxido também previne o desenvolvimento de bactérias capazes de reduzir o sulfato a sulfeto, como também auxilia na remoção de odores (SIQUEIRA, 1998).

A reação que rege a oxidação do sulfeto em meio ácido ou neutro é a seguinte:

$H_2S + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$. O tempo dessa reação é de cerca de 15 a 60 minutos e quando são adicionados catalisadores, na forma de íons metálicos, o tempo de reação é de poucos minutos, apresentando como produto da reação a formação de enxofre elementar (SIQUEIRA, 1998).

Na simulação do tratamento do efluente do DTCS em São Sebastião, durante o funcionamento da estação piloto, foi produzido enxofre elementar na forma coloidal ou em suspensão, conferindo ao efluente aspecto turvo (AMBIENTAL, 1991).

II- Oxidação de fenóis

Os fenóis estão presentes em efluentes gerados pelas refinarias de petróleo, atividade de produção de petróleo, nas indústrias de materiais sintéticos e sínteses químicas.

A oxidação do fenol pela utilização de oxidantes à base de cloro não é recomendada devido a formação de subprodutos mais tóxicos que o produto original, como os fenóis clorados. O oxidante mais utilizado na oxidação de fenóis tem sido o peróxido de hidrogênio.

Ao contrário do que ocorre com o sulfeto, o meio ácido é necessário para a oxidação do fenol pelo peróxido de hidrogênio aliado a ação catalisadora de sais de ferro bivalente. A reação que rege a oxidação de fenóis em meio ácido sob a ação de sais de ferro é representada por: $C_6H_5OH + 14 H_2O_2 \rightarrow 6CO_2 + 17H_2O$

O pH ideal para a oxidação de fenóis situa-se entre 3 e 4 com a adição de sulfato férrico como catalisador, e o tempo de reação é de aproximadamente 60 minutos.

3.1.1.4 Descrição do sistema de tratamento da PETROBRÁS

O sistema de tratamento adotado pela PETROBRÁS foi projetado para o tratamento do efluente a uma vazão máxima de 6000m³/dia. A água de produção, juntamente com compostos provenientes da drenagem de águas contaminadas das áreas de tanques, válvulas e bombas, é acumulada em um tanque de segregação com capacidade para um volume de 56.000m³ (Figura 1). Neste tanque ocorre a primeira separação do óleo livre, presente no

efluente, que é coletado através de um anel tubular superficial e é encaminhado aos tanques de petróleo.

A seguir, o efluente é transferido por bombas centrífugas e a uma vazão constante para o flutador onde são adicionados soda cáustica, polieletrólitos e peróxido de hidrogênio. Terminado o tempo de retenção de 10 minutos para a flotação do material oleoso e parte dos sólidos em suspensão, o efluente flotado é encaminhado para os tanques de oxidação de sulfetos. Essa etapa ocorre em dois tanques de 60 m³, equipados com misturadores mecânicos, onde são adicionados o peróxido de hidrogênio a 50%. A seguir, por gravidade, o efluente flui para o tanque de acidificação com 20m³, também equipado com misturador mecânico, onde ocorre a dosagem de H₂SO₄ a 98%, para o ajuste do pH na faixa de 3,5 a 4,0, por meio de bombas dosadoras comandadas por um controlador de pH (AVELAR, com. pes. 1999)⁵.

Após a acidificação, o efluente é encaminhado a dois tanques de oxidação de fenóis com volume unitário de 60m³ onde ocorre a adição de peróxido de hidrogênio a 50% . A seguir, o efluente é neutralizado em um tanque com volume de 20m³, através da adição de hidróxido de sódio a 50%, por meio de bombas dosadoras com vazão determinada por controlador de pH, para obtenção de pH na faixa de 6,0 a 8,0. Terminada a etapa de neutralização, o efluente é encaminhado ao poço de bombeamento para ser descartado através do emissário submarino (Figuras 2 e 3) (AVELAR, com. pes. 1999)⁵.

A diluição do efluente no corpo receptor foi estimada em cerca de 800 vezes a uma distância de aproximadamente 50 m dos difusores (FILHO, com. pes. 1997)⁶.

⁵FILHO, J. S. (1997). (Coordenadoria de Qualidade, Segurança Industrial e Meio Ambiente-COSEMA/DTCS/PETROBRÁS, SP). *Comunicação pessoal*.

3.1.2 Caracterização da água de produção através de testes de toxicidade e de análises químicas

Embora estimativas mundiais indiquem um aumento da produção de petróleo e como consequência direta, um aumento da quantidade de água de produção gerada (BRENDHAUG et al., 1992), somente a partir de meados da década de 80, foi dado um impulso nas pesquisas direcionadas aos efeitos e consequências desse tipo de descarte no ambiente marinho.

A maioria desses estudos foi realizada com água de produção proveniente de campos de petróleo e gás do Mar do Norte e do Golfo do México. Esses trabalhos abrangeram os efeitos agudos e crônicos determinados em condições laboratoriais e de campo, análises químicas das amostras, estudos de dispersão da pluma do efluente e estudos sobre a diversidade e densidade da biota existente no local de descarte do efluente.

HARPER (1986) relata que os efeitos ambientais causados pelo despejo da água de produção dependem da interação de variáveis físicas e químicas do corpo receptor e da água de produção. Entre as características mais importantes do corpo receptor estão incluídas a largura e a profundidade, o sistema de circulação da água, a salinidade, a quantidade total de partículas em suspensão e as taxas de deposição e biodegradação no sedimento. Em relação a água de produção, as características mais importantes a serem consideradas são a salinidade (ou os sólidos dissolvidos totais), as concentrações de hidrocarbonetos, a proporção de íons, o volume do descarte por unidade de tempo e o local de descarte. Os efeitos são mais drásticos em ambientes como rios e estuários devido a menor capacidade de diluição e dispersão, enquanto em mar aberto os efeitos são de menor intensidade.

DAVIES et al. apud SOMERVILLE et al. (1987) avaliaram os efeitos da água de produção de reservatórios do Mar do Norte sobre o fitoplâncton, zooplâncton e fase larval de bacalhau e arenque, e não observaram efeitos diretos do descarte sobre o fitoplâncton e as fases larval. No entanto, observaram uma diminuição na população de copépodos da área sob impacto. A ocorrência desses efeitos foi associada a uma possível interferência de

DAVIES, J. M.; HAY, S. J.; GAVILLE, J. C.; DOW, K. (1987). The ecological effects of produced water discharges from offshore oil platforms in the northern North Sea. *Mar. Env. Res.* apud SOMERVILLE et al. (1987). *Marine Pollution Bulletin*, 18, 10:549-558.

hidrocarbonetos com ácidos carboxílicos, acumulação de hidrocarbonetos no saco vitelino e efeitos sobre respostas comportamentais.

SOMERVILLE et al. (1987) estudaram os efeitos ambientais do descarte da água de produção de reservatórios do Mar do Norte. Esse trabalho envolveu testes de toxicidade, modelagem matemática da pluma do efluente, estudo de campo com rodamina, monitoramento "in situ" com o mexilhão *Mytilus edulis*, bem como análises químicas e experimentos de biodegradação dos principais compostos orgânicos presentes na água de produção. Para esse experimento foram utilizados frascos de fermentação previamente inoculados com microorganismos obtidos do Mar do Norte. Os resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica com a bactéria *Vibrio fisheri*, o celenterado *Campanularia flexuosa*, os crustáceos *Calanus finmarchicus* e *Daphnia magna*, o molusco *Crassostrea gigas* e o peixe *Salmo gairdneri*, indicaram valores de CL e CE50 entre 5 e 10 % de água de produção, demonstrando que o efeito agudo estava restrito às imediações da descarga e não ocorria em diluições superiores a 100 vezes. A modelagem matemática da pluma do efluente testada em campo indicou uma diluição de cerca de 1000 vezes a uma distância inferior a 50 metros do ponto de descarga. As análises químicas indicaram concentrações elevadas de ácidos carboxílicos (1g/L) e de hidrocarbonetos aromáticos como benzeno (18mg/L), tolueno (13mg/L) e 5mg/L de etilbenzeno e xileno. O nitrogênio amoniacal foi encontrado em concentrações de 10 a 30mg/L. A ação das bactérias mantidas em uma cultura contínua nos experimentos de biodegradação foi responsável pela remoção quase completa dos hidrocarbonetos aromáticos de baixo peso molecular e dos ácidos carboxílicos. Os autores concluíram que a presença de qualquer efeito tóxico estaria restrita às imediações do ponto de descarga, mas sugeriram a continuidade de estudos de campo para validar os prognósticos apresentados no trabalho.

GIRLING (1989) investigou os efeitos da água de produção sobre o copépodo calanóide *Acartia tonsa* através de testes de toxicidade aguda (48 h) e crônica (22 dias) com amostras brutas e tratadas por meio de filtração e biodegradação. No teste de toxicidade crônica foi avaliado o efeito da água de produção sobre o crescimento populacional de *A. tonsa*. O autor não observou diferença na toxicidade entre amostras brutas e filtradas, que apresentaram valores de CE₅₀;48h de 3,6 e 2,7% de água de produção. As amostras

biodegradadas apresentaram redução da toxicidade com um valor de $CE_{50;48h}$ de 18 % de água de produção. Em relação aos testes crônicos, houve declínio da população de copépodos após 21 dias, nas concentrações de 1 e 5% das amostras filtradas e aumento populacional em todas as concentrações (0,5 a 15%) das amostras biodegradadas. Os resultados demonstraram através de extrapolações das taxas de diluição na região das plataformas, que os efeitos tóxicos das descargas sobre os copépodos planctônicos daquela região são limitados às imediações do ponto de descarga.

DANIELS & MEANS (1989), estudaram o efeito genotóxico da água de produção descartada em uma região estuarina do Golfo do México utilizando embriões e larvas do peixe *Cyprinodon variegatus* para avaliar a presença de aberrações cromossômicas. Estas foram observadas em concentrações de 2 e 4% de água de produção, indicando que o descarte de água de produção em sistemas semi-fechados pode implicar em efeitos crônicos na população de peixes estuarinos que habitam essas águas.

BALDWIN et al. (1992), expuseram embriões do ouriço *Strongylocentrotus purpuratus* a amostras de água de produção para avaliar a ação desse poluente sobre o desenvolvimento embrio-larval e na indução de uma glicoproteína de alto peso molecular. Concentrações de 3% de água de produção foram suficientes para retardar o desenvolvimento até a fase de gástrula, enquanto concentrações entre 10 e 15% após 3h de exposição dos embriões, induziram a presença da proteína (banda 253 kDa), encontrada em concentrações muito baixas nos embriões controle. Segundo os autores, a expressão dessa proteína parece ter sido específica à presença da água de produção e à presença do arsênico, um dos constituintes encontrados nas amostras de água de produção utilizadas.

STEPHENSON (1992) fez um levantamento dos estudos desenvolvidos pelo governo e indústrias em 42 plataformas localizadas no Golfo do México. Ele agrupou os principais componentes da água de produção em seis categorias: óleos, metais pesados, radionuclídeos, produtos químicos adicionados durante o processo de produção para prevenir problemas operacionais, sais e oxigênio dissolvido. A seguir, descreveu os valores encontrados e os impactos ambientais decorrentes do descarte de cada uma das categorias de poluentes separadamente. Baseado nos trabalhos revisados, o autor concluiu que o descarte da água de produção de plataformas localizadas em alto mar não deveria causar efeitos adversos à vida aquática circunvizinha.

JACOBS et al. (1992) realizaram um trabalho mais completo visando avaliar diferenças na composição da água de produção oriunda de plataformas de petróleo e gás no Mar do Norte. As análises de compostos orgânicos indicaram diferenças quantitativas e qualitativas em relação aos efluentes oriundos dessas plataformas, enquanto para os metais não foram observadas diferenças. A água de produção de plataformas de gás apresentou maiores concentrações de aromáticos monocíclicos e também maior toxicidade em relação a água de produção de plataformas de petróleo. Em relação aos metais, foi dada ênfase à análise de ânions devido à escassez na literatura de dados sobre a sua distribuição.

Entre os trabalhos direcionados somente para a caracterização química da água de produção, destaca-se o estudo conduzido por TIBBETTS et al. (1992) no qual os autores relacionaram os principais parâmetros físicos e químicos necessários para uma real caracterização da composição da água de produção, revisaram as metodologias analíticas usualmente utilizadas e testaram os métodos de análise padronizados, apontando os principais problemas.

Segundo TIBBETTS et al. (1992), os compostos que apresentam maior dificuldade de análise são os mais polares, como os produtos utilizados no tratamento da água de produção para operação eficiente da plataforma. Esses produtos são os inibidores de corrosão, emulsificantes, biocidas, produtos de tratamento e detergentes, que apresentam-se como misturas complexas com várias propriedades químicas e físicas. Muitos possuem alto peso molecular o que os torna difíceis de serem analisados pelos métodos convencionais e também são difíceis de serem extraídos da água.

Entre os trabalhos apresentados no Simpósio Internacional em San Diego (1992) direcionados para a determinação da toxicidade da água de produção destacam-se os estudos conduzidos por SCHIFF et al. (1992), MOFFITT et al. (1992) e BRENDEHAUG et al. (1992).

No trabalho de SCHIFF et al. (1992) foram avaliadas mudanças na composição de amostras de água de produção após diferentes períodos de estocagem e comparados diferentes procedimentos de testes de toxicidade com o misidáceo *Mysidopsis bahia*. A utilização de outras espécies em testes de toxicidade com água de produção também foi avaliada. A estocagem da água de produção a 4°C durante um período de oito dias não resultou em mudanças significativas do carbono orgânico total e de hidrocarbonetos

aromáticos voláteis (BTEX). Nos testes com *M. bahia* onde foram comparados os efeitos de amostras com salinidade e pH ajustados e não ajustados, os valores de CL50; 96h obtidos foram muito próximos.

MOFFITT et al. (1992) avaliaram a toxicidade crônica de amostras de água de produção através da utilização de testes de curta duração (7 dias) com o misidáceo *M. bahia* e o peixe *Cyprinodon variegatus*. Os autores não observaram diferenças significativas entre os resultados dos testes realizados com amostras coletadas em diferentes períodos ou de plataformas com taxas baixas (< 10000 barris/dia) e altas (> 10000 barris/dia) de descarte.

BRENDEHAUG et al. (1992), realizaram testes de toxicidade aguda com amostras de água de produção de plataformas do Mar do Norte e em conjunto com modelos de dispersão e diluição do efluente, estimaram os impactos do descarte da água de produção sobre o ambiente. Os organismos teste utilizados foram a microalga *Skeletonema costatum*, o crustáceo *Artemia sp* e a bactéria *Vibrio fisheri* (Microtox). Os autores concluíram que os efeitos agudos da água de produção poderiam ocorrer na zona de diluição, mas seriam desprezíveis para além dessa área.

Esses trabalhos deram maior ênfase a estudos laboratoriais, através da utilização de testes de toxicidade visando, principalmente, a determinação de valores de toxicidade aguda e caracterização química da água de produção descartada em regiões de alto mar. Já os trabalhos de RAYLE & MULINO (1992), RABALAIS et al. (1992) e NEFF et al. (1992) foram direcionados ao estudo dos impactos causados pelo descarte de água de produção em águas costeiras, como estuários e baías, através da análise de contaminantes nos sedimentos próximos à área de descarte, levantamentos qualitativos e quantitativos da macrofauna bentônica e estudos de bioacumulação com o molusco *Crassostrea virginica*, colocado a diferentes distâncias do ponto de descarte.

O estudo de RAYLE & MULINO (1992) foi conduzido em áreas caracterizadas como sistemas semi-fechados ou de pouca circulação de água no Estado da Louisiana nos Estados Unidos. Foram coletados dados físicos e químicos de áreas próximas a 38 diferentes locais de descarte de água de produção. Os objetivos desse estudo foram o de determinar a ocorrência e a extensão de estratificação da salinidade e de hidrocarbonetos de petróleo, as concentrações de hidrocarbonetos no sedimento até uma distância de 300 m do local de descarte e a ocorrência e a extensão de radionuclídeos acumulados nos sedimentos nas

proximidades dos lançamentos de água de produção. A salinidade média das diferentes amostras de água de produção estudadas foi de 141‰. A estratificação da salinidade da água de fundo foi observada em três estações de coleta até 150 m do ponto de descarga. A presença de hidrocarbonetos de petróleo foi constatada em níveis elevados em sedimentos coletados em uma área de até 300 metros do ponto de descarte. Duas das dez amostras de sedimentos coletados para análise de radionuclídeos apresentaram valores acima dos valores das estações controle.

RABALAIS et al. (1992) mostraram que a presença de sedimentos contaminados por compostos oriundos dos descartes de água de produção ocorre em distâncias superiores (1000 a 1300 m) daquelas observadas em estudos anteriores realizados em ambientes com as mesmas características de pouca circulação de água e profundidade. A fauna bentônica foi severamente reduzida ou ausente nos locais onde o efeito limiar de certos contaminantes, como os hidrocarbonetos voláteis e aromáticos polinucleares, foi ultrapassado. A presença de altas concentrações de hidrocarbonetos nos sedimentos, em profundidades de 25 a 30 cm, em algumas áreas estudadas indicou uma acumulação de longa duração e a resistência à degradação. Estudos de bioacumulação com a ostra *C. virginica* também indicaram o potencial de acumulação tanto em locais próximos ao ponto de descarte, como também em distâncias de 350 a 1000 metros do ponto de despejo da água de produção.

NEFF et al. (1992) estudaram os efeitos do descarte prolongado de água de produção em ambientes de baixa energia, de duas plataformas de petróleo localizadas na costa da Louisiana, Golfo do México, sobre a comunidade bentônica, e a extensão da contaminação nos sedimentos. As concentrações de metais nos sedimentos próximos à área de descarte das duas plataformas não foram elevadas, em comparação às concentrações de uma área controle. Em relação a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, os sedimentos superficiais coletados a uma distância de 20 metros do ponto de descarte (1570 barris/dia) e a uma profundidade de 8 metros, apresentaram baixa a moderada contaminação mas não apresentaram-se contaminados a uma distância de 100 metros. A comunidade bentônica foi afetada pelo descarte crônico em distâncias de até 100m do ponto de descarte, mas não em distâncias superiores a essa. Os sedimentos da plataforma localizada em uma área de pouca profundidade (2 metros) com uma taxa de descarte de 2750 barris/dia por mais de quarenta anos, apresentaram-se contaminados por hidrocarbonetos a uma distância de até 100 metros do ponto de descarte, mas não em distâncias superiores a 300 metros. A comunidade

bentônica foi afetada em distâncias de até 20 metros do ponto de descarte, mas não em distâncias superiores a 100 metros.

OSENBERG et al. (1992) estudaram a presença e a extensão de efeitos biológicos em um ambiente aberto e de alta energia, decorrentes do descarte de água de produção por meio de um emissário submarino localizado a 200-300 metros da costa, com difusores posicionados a 10-12 metros de profundidade, nas proximidades da cidade de Carpinteria no Estado da Califórnia, Estados Unidos. O emissário estava em operação desde 1978 e o estudo foi realizado entre fevereiro de 1989 e outubro de 1990. No período de estudo, o volume médio de água de produção descartado era de 16000 barris/dia. Os autores observaram uma diminuição da densidade da fauna bentônica em áreas próximas ao ponto de descarga do emissário (\leq a 100 m) e concluíram que a extensão espacial do efeito sobre o bentos era bem localizada. No entanto, foram observados efeitos sobre mexilhões transplantados em uma extensão espacial de até 1000 m do ponto de lançamento do efluente. A sobrevivência das duas espécies de mexilhões utilizadas não foi afetada pela água de produção, enquanto as taxas de crescimento tanto de *Mytilus californicus* como de *Mytilus edulis* foram afetadas negativamente, em distâncias de até 1000 m do ponto de descarga do efluente.

HIGASHI et al. (1992) obtiveram o mesmo tipo de efeito em testes laboratoriais realizados com a fração solúvel da água de produção do mesmo local. RAIMONDI & SCHMITT (1992), observaram resultados similares, mas em escala espacial menor no mesmo local, com larvas do gastrópodo *Haliotis rufescens* através da realização de testes "in situ" e laboratoriais. Nos testes "in situ" larvas nas fases pré-competentes (duração de 5 a 7 dias e sem capacidade de fixação) e competentes (duração de 2 a 5 semanas e com capacidade de fixação) foram colocadas separadamente na pluma do efluente, em tubos de PVC em estações distantes 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 metros do difusor, durante períodos de 5,5 horas e 4 dias. Nesses experimentos foi avaliada a relação entre a proximidade da descarga e duração da exposição com a sobrevivência, capacidade de fixação seguida de metamorfose das larvas para a fase adulta e capacidade natatória. Nos testes em laboratório as larvas foram expostas durante 24h a diferentes concentrações do efluente e os efeitos analisados foram os mesmos dos testes "in situ".

Os resultados indicaram que a exposição das larvas planctônicas de organismos bentônicos à pluma da água de produção reduziu a probabilidade das larvas completarem

com sucesso a transição da fase larval para a adulta, denominada de viabilidade. A magnitude do efeito observado foi diretamente relacionada com a distância do difusor e com o tempo de exposição. Quantitativamente, a viabilidade das larvas transplantadas a 10 metros do difusor por 4 dias foi drasticamente reduzida em cerca de 80%, comprovando que efeitos adversos sobre larvas planctônicas podem ocorrer em ambientes abertos e de alta energia.

KRAUSE et al. (1992), em experimentos laboratoriais conduzidos com água de produção proveniente da localidade de Carpinteria na Califórnia, observaram uma demora significativa no desenvolvimento embrionário do ouriço *Strongylocentrotus purpuratus* após exposição dos gametas, durante 10 minutos, e zigotos, durante 48h, a uma concentração de 0,0001 % de água de produção.

Dando continuidade a série de trabalhos realizados com a água de produção da localidade de Carpinteria na Califórnia, KRAUSE (1994) demonstrou a importância da realização de testes "in situ" para detectar efeitos subletais da água de produção em ouriços adultos da espécie *S. purpuratus*. Os ouriços foram mantidos, durante oito semanas, em 13 estações fixas localizadas a distâncias variando de 5 a 1000 metros do ponto de descarga do efluente e a uma profundidade de aproximadamente 11 a 12 metros.

Neste trabalho foram analisados os efeitos da exposição crônica sobre a gametogênese e o desempenho dos gametas de *S. purpuratus*, e embora tenha sido observada a presença de gônadas maiores nos ouriços mantidos nas proximidades (entre 5 a 10 metros) do ponto de descarga do efluente, esses mesmos organismos apresentaram uma diminuição significativa no desempenho dos seus gametas.

Esses efeitos foram mais evidentes na estação a 5 metros de distância do ponto de descarga e continuaram a ser observados em menor magnitude em distâncias de até 100 metros. Devido à inexistência de pontos de experimentação entre 100 e 1000 metros, não foi possível determinar a exatidão da extensão do efeito.

Estudos com a macroalga *Macrocystis pyrifera* também foram conduzidos por GAYLE et al. (1994), REED et al. (1994) e REED & LEWIS (1994) com água de produção da localidade de Carpinteria na Califórnia visando avaliar os efeitos do efluente sobre processos celulares, recrutamento e colonização dos zoósporos.

GAYLE et al. (1994), investigaram os efeitos da água de produção sobre o desenvolvimento dos gametófitos de *M. pyrifera*, em condições laboratoriais. O desenvolvimento dos gametófitos envolve as fases de germinação de zoósporos, crescimento do tubo germinal e migração nuclear que ocorrem em 42h. Entre os parâmetros analisados, a migração nuclear foi o processo mais afetado pela água de produção, com um valor de CEO (menor concentração que causa efeito significativamente diferente do controle) de 4% de água de produção, 12% para o crescimento do tubo germinal e 16% para germinação dos zoósporos.

REED & LEWIS (1994), conduziram experimentos laboratoriais para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de água de produção (0,01; 0,1; 1 e 10%) sobre a duração da capacidade natatória, habilidade para fixação e germinação dos zoósporos de *M. pyrifera*. Os resultados indicaram que somente concentrações iguais ou maiores que 1% de água de produção afetaram os parâmetros biológicos analisados.

REED et al. (1994), realizaram experimentos em campo e em laboratório para avaliar o efeito da água de produção sobre esporófitos adultos, sobrevivência e sucesso reprodutivo de gametófitos. Esporófitos adultos foram transplantados para estações localizadas a 5, 50, 100 e 1000 m de distância do difusor e após 75 dias as plantas foram retiradas para análise da produção de zoósporos. A sobrevivência e sucesso reprodutivo de gametófitos foi avaliada "in situ", transplantando-se zoósporos recém fixados nas mesmas estações utilizadas para o experimento com esporófitos adultos. A produção de zoósporos não foi afetada pela água de produção em nenhuma das estações, enquanto a sobrevivência e o sucesso reprodutivo somente foram afetados na estação a 5 m de distância do difusor. Os testes laboratoriais, por sua vez, indicaram que a reprodução dos gametófitos foi significativamente afetada na concentração de 0,01% de água de produção.

Em um trabalho posterior, KRAUSE (1995), estimou as concentrações da água de produção da localidade de Carpinteria na Califórnia, na pluma do efluente e detectou concentrações de aproximadamente 0,0002% de água de produção a uma distância de 1000m do ponto de descarga. Esses resultados sugeriram que embora a água de produção fosse rapidamente diluída, pois o difusor foi projetado para uma diluição inicial de 125:1, concentrações subletais persistiram em distâncias de até 1 Km da fonte de despejo. Esse trabalho permitiu a extrapolação dos resultados dos experimentos laboratoriais para as

condições reais de campo, ou seja, as concentrações efetivas do efluente em ambiente aberto e de alta energia.

Além dos estudos desenvolvidos para a avaliação do impacto causado por descargas de água de produção em ambientes abertos e de alta energia, como os da localidade de Carpinteria na Califórnia, trabalhos mais recentes relacionados à determinação do grau de contaminação de sedimentos de áreas estuarinas cronicamente impactadas pela descarga de água de produção foram desenvolvidos por D'UNGER et al. (1996) na baía de Nueces e por ROACH et al. (1993) e CARR et al. (1996a) na baía de Galveston, ambas no Texas.

Nesses trabalhos foram utilizadas importantes metodologias para a determinação da contaminação de sedimentos de áreas próximas às plataformas de petróleo, como os testes de toxicidade com o sedimento e água intersticial, além da "tríade da qualidade do sedimento" que permite a real avaliação do nível de contaminação, e que ainda não havia sido utilizada em locais sob efeito do descarte de água de produção.

Segundo D'UNGER et al. (1996), o Texas ainda é um dos poucos Estados americanos no Golfo do México que ainda permitem a descarga de água de produção em águas costeiras. Nos estados da Flórida, Alabama e Mississipi o descarte é proibido. Existe uma proposta de lei nos Estados Unidos datada de 1995 que visa proibir efetivamente o descarte de água de produção em qualquer região estuarina do país, com exceção feita a Cook Inlet, no Alasca.

A baía de Nueces caracteriza-se por conter campos de petróleo e gás com numerosos poços, com alta proporção água-óleo e em alguns deles, a água de produção representa uma proporção maior que 95%. No trabalho de D'UNGER et al. (1996), amostras de sedimento e de efluente foram coletadas nas proximidades das plataformas visando a determinação da toxicidade. O anfípodo bentônico *Grandidierella japonica* foi utilizado nos testes com sedimento e o poliqueto *Dinophilus gyrociliatus* nos testes com água intersticial. Os testes de fecundação e de desenvolvimento embrio-larval com o ouriço *Arbacia punctulata* foram utilizados para determinar a toxicidade dos efluentes.

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com anfípodos e poliquetas mostraram que todos os sedimentos e águas intersticiais foram altamente tóxicos quando comparados com o sedimento e água intersticial utilizados como referência. Nos testes com *A. punctulata*

realizados com efluente os valores de CE50; 60min variaram de 5 a 9,7% no teste de fecundação, e os valores de CE50; 48h de 7,3 a 24,6 %, no teste de desenvolvimento embrionário-larval.

Já, CARR et al. (1996a), através da utilização da tríade da qualidade do sedimento, composta de análises químicas, testes de toxicidade e levantamento da fauna bentônica, realizados todos com as mesmas amostras de sedimento, obtiveram associações significativas entre os parâmetros químicos, físicos, biológicos e toxicológicos analisados em sedimentos provenientes de diferentes origens. Essas associações possibilitaram a classificação dos locais estudados em categorias de acordo com o grau de contaminação e degradação. De acordo com essa classificação, duas estações próximas às plataformas de separação de água de produção foram classificadas como contaminadas. Esse trabalho confirmou a grande utilidade da tríade da qualidade do sedimento, como uma ferramenta indispensável para a classificação do grau de contaminação de sedimentos.

CARR et al. (1996b), em um trabalho posterior, como parte de um programa multidisciplinar para avaliar o impacto crônico gerado pelas atividades de exploração e produção de gás e petróleo em regiões "offshore" no Golfo do México, obtiveram, através da realização de testes de toxicidade com água intersticial utilizando três diferentes espécies e análises químicas da água, uma excelente correlação entre os métodos de teste utilizados. Através desses resultados foi possível demonstrar que a contaminação no ambiente estaria limitada às imediações das plataformas estudadas, em uma área não superior a 150 m.

Diferentemente do trabalho de CARR et al. (1996b) que teve como objetivo principal avaliar a presença de contaminação crônica nos sedimentos pela descarga de água de produção efetuada ao longo de vários anos, STRØMGREN et al. (1995) avaliaram os efeitos agudos do descarte da água de produção, de plataformas em alto mar na região do Mar do Norte, em relação a sua composição química e dispersão. Nesse trabalho, os resultados obtidos indicaram que a presença de toxicidade aguda do efluente estaria limitada às imediações do descarte e em distâncias superiores a 2Km, os efeitos agudos seriam desprezíveis.

Em 1995 foi realizado na Noruega o segundo Simpósio Internacional sobre água de produção (REED & JOHNSEN, 1996). Muitos trabalhos foram direcionados a determinação dos efeitos agudos do descarte da água de produção no ambiente. Os dados gerados foram

comparados com dados obtidos em estudos prévios realizados nos mesmos locais, possibilitando a caracterização dos ambientes atingidos quanto ao aumento, estabilização e diminuição dos níveis de contaminação. A conclusão da reunião foi de que a maioria dos trabalhos sobre água de produção ainda são direcionados para a determinação de efeitos de curta duração através do uso de testes de toxicidade aguda. Foram feitas recomendações quanto a um maior investimento em pesquisas direcionadas à obtenção de informações sobre os efeitos crônicos do descarte de água de produção em ambientes de alta energia, como no Mar do Norte e em outras partes do mundo.

Entre os diversos trabalhos apresentados no Simpósio, alguns se destacaram pois contribuíram com novos conhecimentos sobre a composição da água de produção e seus efeitos sobre organismos marinhos. Através do estudo de PILLARD et al. (1996) foi possível conhecer o efeito do desequilíbrio iônico de sais essenciais, comum na água de produção, sobre três organismos marinhos. Esse projeto de pesquisa teve a sua primeira fase direcionada para a quantificação da toxicidade de sete íons sobre três organismos de água doce. Isto resultou no desenvolvimento de um programa de computador (PROGRAMA GRI-FW STR™) capaz de estimar a toxicidade aguda de um efluente, utilizando as concentrações de íons como variáveis de entrada (GULLEY et al., 1992). A segunda fase do projeto, teve como objetivo principal determinar a toxicidade aguda da salinidade e de íons específicos (K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Sr^{++} , SO_4^- , HCO_3^- , Br^- e $B_4O_7^-$) sobre três organismos marinhos (*Mysidopsis bahia*, *Cyprinodon variegatus* e *Menidia beryllina*), visando a aplicação do programa anteriormente desenvolvido.

No trabalho de PILLARD et al. (1996) foram apresentados apenas os dados de toxicidade obtidos para *M. bahia*, pois a pesquisa ainda não havia sido concluída. Quando finalizada, essa pesquisa deverá ser muito útil, pois o programa estatístico possibilitará discriminar a toxicidade presente na água de produção, como resultado de um desequilíbrio iônico ou decorrente de outras causas.

O trabalho de FLYNN et al. (1996), apresentado no mesmo Simpósio, contribuiu com informações sobre os estudos recentes realizados com água de produção no Mar do Norte, onde foram abordados aspectos relativos a sua composição, toxicidade e destino no ambiente. Esse trabalho faz parte de um amplo programa em desenvolvimento desde 1992 que envolve cinco campos de produção de petróleo e gás. Os resultados obtidos indicaram os ácidos graxos voláteis, como os principais componentes orgânicos presentes na água de

produção dos campos estudados, em concentrações variando de 13 a 380 mg/L. Entre os compostos orgânicos, os fenóis apresentam uma forte correlação com a toxicidade aguda da água de produção. A toxicidade aguda da água de produção proveniente de plataformas de petróleo foi menor que a toxicidade de plataformas de gás, o que confirma os resultados anteriormente obtidos por JACOBS et al. (1992). Em geral, os constituintes orgânicos da água de produção são rapidamente biodegradados sob condições laboratoriais e por fim, modelos de dispersão da pluma do efluente indicam que a diluição mínima do efluente é maior que 700 vezes numa distância de até 500 metros da plataforma.

Seguindo a mesma linha do trabalho de PILLARD et al. (1996), DOUGLAS & HORNE (1997) avaliaram os efeitos interativos dos íons Ca, Mg, K e Br e da salinidade na sobrevivência de *M. bahia* em testes de toxicidade aguda com 96h de duração. Após a determinação da faixa de tolerância da espécie aos diferentes íons, realizaram testes com água de produção contendo naturalmente um excesso de cálcio, em comparação aos níveis normais da água do mar. Após terem ajustado a concentração de cálcio para níveis normais, obtiveram redução da toxicidade do efluente comprovando que o desequilíbrio iônico presente na água de produção pode ser um dos fatores responsáveis pela sua toxicidade.

Estudos recentes e ainda em desenvolvimento vêm sendo realizados por NEFF & SMITH (1998) em campos de petróleo e gás localizados na Indonésia. Esse estudo visa a determinação da composição química e dos efeitos ambientais do descarte de grandes volumes de água de produção (17,3 a 141 milhões litros/ dia) no mar de Java. Os resultados iniciais indicaram altas concentrações de alguns metais (bário, zinco e arsênico) e compostos orgânicos (BTEX- 331 a 3638 mg/L, HAP-231 a 745 mg/L, fenóis- 2490 a 6329 mg/L). A toxicidade aguda da água de produção para *M. bahia* variou de 18,4 a 34,8% e para *Menidia berylina*, de 12,3 a 19,5%. Através de modelagem matemática estimou-se a diluição inicial do efluente entre 12 a 100 vezes, dependendo da taxa de descarga e das condições oceanográficas presentes.

Um estudo de avaliação de risco mostrou que a comunidade zooplancônica pode ser adversamente afetada caso entre na pluma do efluente. No entanto, os autores levantam dúvidas em relação às causas do efeito, que pode ter sido tóxico ou mesmo um efeito físico da pluma.

Os trabalhos apresentados na revisão bibliográfica cobrem um período de 12 anos e mostram a evolução e o direcionamento das pesquisas sobre os efeitos da água de produção no ambiente marinho. Em relação aos ambientes caracterizados como de baixa energia, as pesquisas comprovam os efeitos adversos sobre a biota ocasionados pelo descarte agudo e crônico de água de produção. Esses estudos resultaram na proibição do descarte de água de produção em regiões estuarinas de todo Estados Unidos, com exceção feita somente para o campo de Cook Inlet no Alasca.

O impacto do descarte em regiões de alto mar caracterizadas como ambientes de alta energia provavelmente ocorre nas proximidades das plataformas, mas alguns autores recomendam a realização de estudos mais abrangentes para estabelecer a intensidade desse impacto sobre a comunidade zooplanctônica.

A caracterização química da água de produção também apresenta deficiências quanto aos métodos de análise de alguns compostos rotineiramente utilizados para o tratamento da água injetada.

Pode-se concluir através da revisão bibliográfica efetuada que o impacto em regiões de alto mar estaria restrito às imediações das plataformas, mas ainda não estão esclarecidos os efeitos sobre os organismos presentes na coluna d'água, como também os efeitos crônicos das descargas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Efluente

A água de produção utilizada no presente estudo foi proveniente, principalmente, dos poços de Bonito e Bicudo, localizados na Bacia de Campos, Rio de Janeiro. Esse efluente era transportado até o DTCS em São Sebastião, SP (Figura 4), onde era descarregado e estocado no parque de armazenamento em tanques com capacidade para cerca de 60.000 m³ (VIEIRA, com. pes. 1996)⁷.

Atualmente, todo efluente do DTCS, composto preponderantemente de água de produção e menores proporções de compostos provenientes de drenagem de águas contaminadas das áreas de tanques, válvulas e bombas, está sendo tratado através dos processos de flotação e oxidação química antes de ser lançado a 25 metros de profundidade e a mais de um quilômetro da costa.

Coleta, armazenamento e transporte das amostras

No período de 16/04/1996 a 10/08/1998 foram realizadas 18 coletas de água de produção dos tanques de armazenamento do DTCS em São Sebastião, sendo que seis das 18 amostras foram enviadas aos Estados Unidos. Na época do estudo, a estação de tratamento ainda não havia sido construída e dessa forma o tratamento das amostras foi simulado em laboratório.

Amostras foram coletadas de um único tanque ou em proporções iguais de cada tanque, quando mais de um estava sendo usado. Os volumes amostrados variaram de 2 a 30 litros.

⁷VIEIRA, N. (1996). (Dutos e Terminais do Centro Oeste e São Paulo – DTCS, PETROBRÁS, São Sebastião, SP). *Comunicação pessoal*.

As amostras eram homogeneizadas vagarosamente com uma colher de plástico e alíquotas, uma de 0,5 litro e outra de 8 litros foram separadas para utilização imediata no laboratório da PETROBRÁS. A primeira foi utilizada para as análises de sulfetos, fenóis, amônia, óleos e graxas, cloretos e pH e a outra, para a simulação do processo de flotação. Terminado este tratamento uma subamostra de 0,5 litro foi retirada para realização das mesmas análises químicas feitas com a amostra não tratada.

Para o transporte até o laboratório as amostras homogeneizadas eram transferidas para recipientes de polietileno completamente cheios, fechados e mantidos em isopor com gelo, lá sendo mantidos em refrigerador a 4°C.

As três primeiras amostras de efluente coletadas em abril, junho e julho de 1996 não foram submetidas a simulação do tratamento. Essas amostras tiveram sua salinidade ajustada através da adição de água destilada e a seguir foram decantadas por 2h.

Seis amostras brutas de efluente, coletadas entre 22/10/1996 e 18/04/1997, foram enviadas aos Estados Unidos em frascos mantidos refrigerados com uma mistura de gelo-x, à base de celulose vegetal, e de gelo seco, em menor proporção. No laboratório de Corpus Christi, Texas, foram imediatamente transferidos para uma câmara refrigerada a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Simulação do tratamento e preparo da água de produção em laboratório

A simulação do tratamento das amostras consistiu de duas etapas: flotação e tratamento químico com peróxido de hidrogênio. A flotação foi feita imediatamente após a coleta no próprio laboratório da PETROBRÁS e a oxidação química com peróxido de hidrogênio foi realizada nos laboratórios de Corpus Christi no Texas e do Centro de Biologia Marinha – CEBIMar em São Sebastião, SP. Após a simulação do tratamento, as amostras tiveram sua salinidade ajustada através da adição de água destilada e a seguir os sólidos em suspensão foram separados através dos processos de decantação, no Brasil, ou de centrifugação, nos Estados Unidos.

Cada amostra coletada gerou três outras que foram denominadas de:

Água de produção 1 (AP1) - amostra bruta não submetida a tratamento

Água de produção 2 (AP2) - amostra submetida ao tratamento com peróxido de hidrogênio

Água de produção 3 (AP3) - amostra submetida ao processo de flotação e a seguir, ao tratamento com peróxido de hidrogênio

Nos Estados Unidos, as amostras brutas e tratadas foram acondicionadas em frascos de polietileno totalmente preenchidos e mantidos em câmara refrigerada a 5°C sem adição de preservativos até sua utilização nos testes de toxicidade com o ouriço *Arbacia punctulata*.

No Brasil, os frascos com amostras destinadas aos testes de toxicidade com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox), *Mysidopsis juniae* e *Lytechinus variegatus* foram totalmente preenchidos e mantidos em geladeira a 4°C sem adição de preservativos, enquanto as amostras destinadas às análises químicas foram acondicionadas e preservadas de acordo com os procedimentos recomendados para cada tipo de parâmetro, descritos no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1988).

As amostras destinadas ao teste MICROTOX® e análises químicas foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas aos laboratórios da CETESB e TCA, no dia seguinte após a coleta e tratamento.

Descrição das etapas do tratamento das amostras de água de produção:

I- Flotação

A simulação do processo de flotação por meio de ar induzido foi feita de acordo com as recomendações da PETROBRÁS (FILHO, com. pes. 1996)⁸.

A simulação do processo de flotação não foi realizada com todas as amostras coletadas. A simulação da flotação foi realizada com a última amostra enviada aos Estados Unidos (amostra de abril de 1997) e com as amostras coletadas em Agosto/Outubro de 1997 e Fevereiro/Abril de 1998.

⁸FILHO, J. S. (1996). (Coordenadoria de Qualidade, Segurança Industrial e Meio Ambiente-COSEMA/DTCS/PETROBRÁS, SP). *Comunicação pessoal*.

Imediatamente após a coleta a amostra foi homogeneizada e uma alíquota de 8 litros foi retirada para o tratamento pelo processo de flotação. Essa alíquota foi transferida para um frasco plástico de boca larga com capacidade para um volume de 10L e com uma abertura na parte inferior para o recolhimento da amostra. Três pedras porosas foram colocadas na base do frasco e após 15 minutos de aeração, o sistema foi desligado e procedeu-se a coleta de todo o líquido abaixo da superfície, tomando-se o cuidado de fechar o sistema para não ocorrer a mistura do óleo da camada superficial com o líquido da coluna .

Logo a seguir, foi feita uma subamostragem para a análise da concentração de sulfeto, e o restante foi acondicionado em um frasco plástico de polietileno mantido sob gelo até ser encaminhado ao laboratório do CEBIMar e ser tratado com peróxido de hidrogênio.

II- Oxidação química com peróxido de hidrogênio

A simulação do tratamento com peróxido de hidrogênio foi feita segundo AMBIENTAL (1991) e FILHO (com. pes. 1996)⁸.

A simulação da oxidação química foi feita com as amostras coletadas em Outubro de 1996, Janeiro/ Fevereiro/ Março/ Abril/ Agosto/ Outubro de 1997 e Fevereiro/ Abril de 1998.

O tratamento das amostras de Outubro de 1996 e Janeiro/ Fevereiro/ Março/ Abril de 1997 foi feito no laboratório de Ecotoxicologia Marinha em Corpus Christi, Texas. Duas simulações do tratamento com peróxido de hidrogênio foram realizadas com a amostra de Outubro de 1996, antes de se dar início aos testes de toxicidade, visando-se estabelecer os procedimentos para o tratamento e quantificar sua eficiência na remoção de sulfeto e fenol .

As amostras de Agosto/ Outubro de 1997 e Fevereiro/ Abril de 1998 foram tratadas no laboratório do CEBIMar em São Sebastião, SP.

⁸FILHO, J. S. (1996). (Coordenadoria de Qualidade, Segurança Industrial e Meio Ambiente-COSEMA/DTCS/PETROBRÁS, SP). *Comunicação pessoal*.

As simulações do tratamento com peróxido foram feitas com uma amostra bruta e outra já tratada pelo processo de flotação. Os materiais e equipamentos utilizados no tratamento foram dois balões volumétricos com capacidade para 3 ou 6 litros de amostra, um agitador magnético, dois imãs, um medidor e eletrodo de pH, duas pipetas automáticas com capacidade para 100µl e 5000µl, duas pipetas graduadas de 10 ml, um "timer", peróxido de hidrogênio a 50%, ácido sulfúrico a 98% e hidróxido de sódio a 50%.

A simulação do tratamento do efluente foi feita a uma temperatura entre 19 a 24 °C. A oxidação de sulfetos foi feita, em meio levemente ácido ou neutro (pH entre 6,3 a 7,0), após a adição de uma quantidade de peróxido de hidrogênio determinada previamente, através de cálculo estequiométrico baseado na concentração de sulfeto da amostra. A duração da etapa para oxidação de sulfetos foi de aproximadamente 20 minutos, durante a qual a amostra foi mantida sob agitação constante. A seguir e sem interrupção da agitação, a amostra foi acidificada pela adição de ácido sulfúrico, e após aproximadamente 5 minutos foi feita a oxidação de fenóis em meio ácido (pH entre 2,1 a 4,3) pela adição de 20% do valor do peróxido utilizado na oxidação de sulfetos. Após 20 minutos de agitação, hidróxido de sódio foi adicionado à amostra para o ajuste pH que permaneceu entre 6,4 a 8,4. Após aproximadamente 5 minutos o processo de tratamento foi encerrado.

As amostras bruta e tratada por flotação foram continuamente agitadas durante todo o processo. A verificação do pH após a adição do ácido e da base foi feita, com o sistema em funcionamento, utilizando-se um eletrodo de pH.

As etapas do tratamento com peróxido de hidrogênio consistiram em:

1- Análise da concentração de sulfeto (S²⁻)

Nos Estados Unidos, a concentração de sulfeto da amostra de efluente foi medida através de um eletrodo específico da Marca ORION e no Brasil através de um "kit" colorimétrico da Marca Merck.

2- Oxidação de sulfetos

Após a determinação da concentração de sulfeto (g/L), o volume de peróxido de hidrogênio (µl) a ser adicionado ao efluente foi calculado segundo as recomendações de FILHO (com. pes. 1996)⁸. Para cada 32g de S²⁻ são consumidos 34g de H₂O₂ em proporção estequiométrica, como é mostrado na reação seguinte:



Para uma concentração hipotética de sulfeto de 0,012g/L será necessário um volume de 25,5 µl de H₂O₂, obtido através dos cálculos abaixo:

Nº de moles de sulfeto = $0,012/32 = 0,000375$ e,

Massa de H₂O₂ (100% W/W) = $0,000375 \times 34 = 0,01275$ g

Massa de H₂O₂ (50% W/W) = $0,01275 \times 2 = 0,0255$ g ou 25,5 µl

O peróxido de hidrogênio foi adicionado e a amostra foi agitada (40 r.p.m) durante vinte minutos.

3- Acidificação até pH 3,5-4,0

A amostra foi acidificada com ácido sulfúrico (H₂SO₄ 98%) até atingir o pH entre 3,5 e 4,0 e foi agitada (40 r.p.m) por cinco minutos. Em algumas amostras, os valores de pH obtidos foram menores ou maiores que o limite recomendado.

4- Oxidação de fenóis

A oxidação de fenóis foi feita adicionando-se um volume de peróxido equivalente a 20% do peróxido utilizado na oxidação de sulfetos. A seguir, a amostra foi agitada (60 r.p.m.) durante vinte minutos.

5- Neutralização até pH 6,0-7,0

A amostra foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH 50%) até atingir o pH entre 6,0 e 7,0 e foi agitada (60 r.p.m) por cinco minutos. Em algumas amostras, os valores de pH obtidos ultrapassaram o limite de 7,0 UpH.

III- Ajuste de salinidade

Após o término do tratamento com peróxido de hidrogênio, a salinidade das amostras do efluente, que variaram de 59 à 120‰, foram ajustadas até 30 e 34‰ com água destilada nas amostras utilizadas nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente.

O volume de água destilada adicionado foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$Vd = Vf - \left(\frac{Sam \cdot Vf}{Se} \right)$$

Onde: Vd = volume de água destilada a ser adicionado;

Vf = volume final desejado;

Sam = salinidade da água do mar;

Se = salinidade do efluente.

IV- Separação dos sólidos em suspensão

Centrifugação

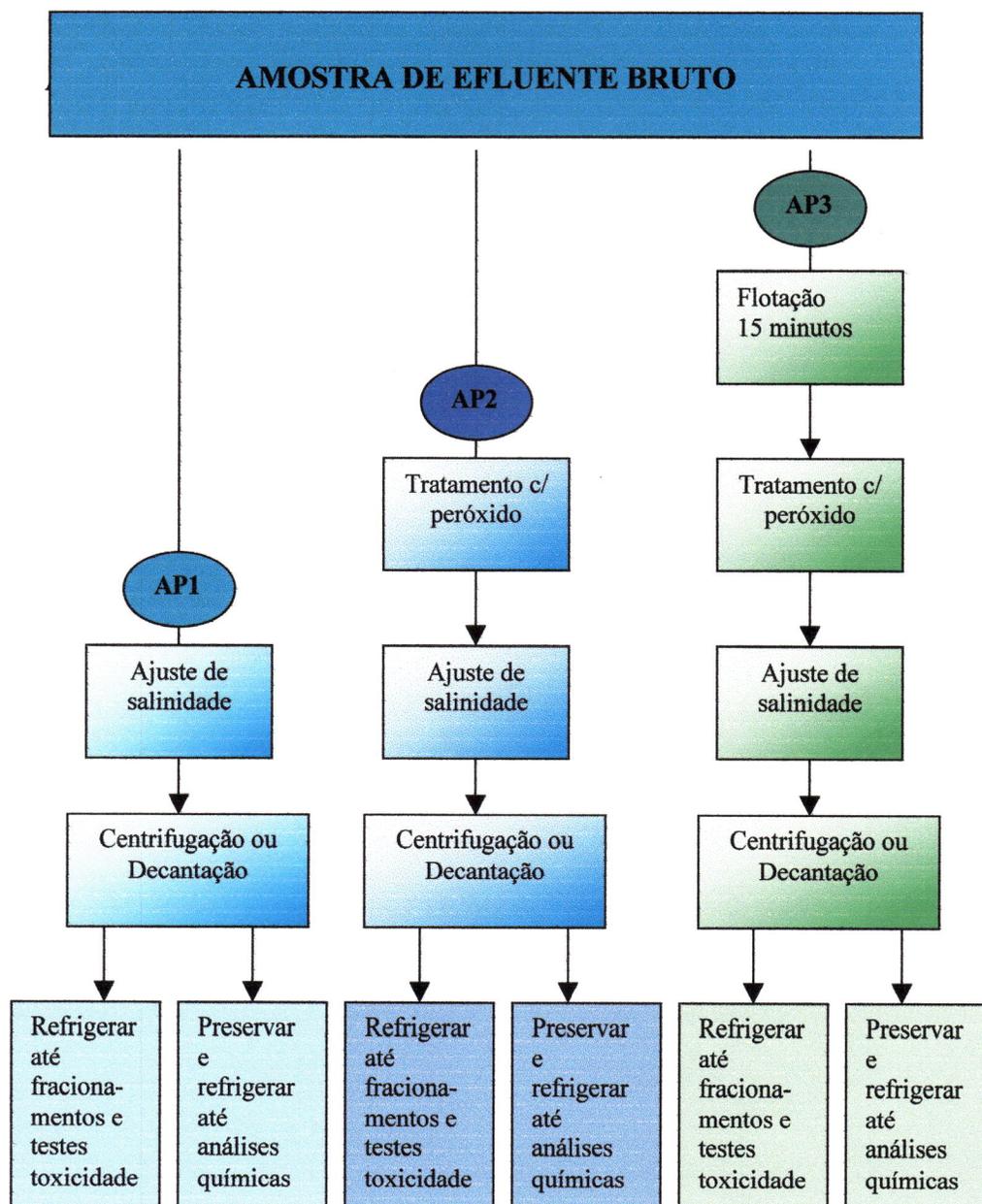
Nos Estados Unidos, após o ajuste da salinidade, as amostras foram centrifugadas durante 40 minutos a 2.000X g para separação dos sólidos em suspensão e acondicionadas em frascos e mantidas refrigeradas a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Decantação

No Brasil, após o ajuste da salinidade, as amostras foram decantadas durante 2 horas e acondicionadas em frascos e mantidas refrigeradas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

A seguir é apresentado o fluxograma referente ao tratamento do efluente e preparo das amostras.

**FLUXOGRAMA DE TRATAMENTO E PREPARO DA ÁGUA DE
PRODUÇÃO COLETADA NO DTCS, PETROBRÁS EM SÃO SEBASTIÃO, SP.**



AP1- amostra bruta não submetida a tratamento

AP2- amostra submetida ao tratamento com peróxido de hidrogênio

AP3- amostra submetida ao tratamento completo: flotação seguida de oxidação química com peróxido de hidrogênio

3.2.2 Testes de toxicidade

Coleta e manutenção dos organismos-teste

Mysidopsis juniae

Os misidáceos foram coletados na região infralitoral da praia do Segredo na margem continental do Canal de São Sebastião (latitudes 23° 41'S e 23° 53'5"S e longitudes 45° 19'W e 45° 30'W) a uma profundidade de 0,5 a 1,0 metro através do arrasto manual de um puçá com 30 cm de diâmetro e abertura de malha de 500 μ m (Figura 5). Imediatamente após a coleta, os organismos foram transferidos para o laboratório e as fêmeas com marsúpio desenvolvido foram separadas (Figura 6). As fêmeas foram transferidas, com o auxílio de uma pipeta "Pasteur" de boca larga, para uma rede com abertura de malha de aproximadamente 1 mm (saco de filó) colocada em um cristalizador com 5 litros de água do mar filtrada e aeração. Após a separação das fêmeas, elas foram alimentadas "ad libitum" com náuplios de *Artemia* sp recém eclodidos.

No dia seguinte, após o nascimento dos filhotes que ocorria durante a noite, retirava-se o saco de filó com as fêmeas e após o sifonamento de $\frac{3}{4}$ da água iniciava-se a contagem e transferência dos filhotes para um outro cristalizador. Os filhotes foram mantidos com aeração suave e alimentados "ad libitum" com náuplios de *Artemia* recém eclodidos durante três a quatro dias, quando então foram utilizados nos testes de toxicidade.

Os organismos foram mantidos em água do mar filtrada com salinidade de 33 \pm 1‰ em uma sala com temperatura de 24 \pm 1°C e fotoperíodo natural.

Nos meses de abril e junho de 1996, os jovens recém nascidos foram transportados até São Paulo, em recipientes de plástico com água do mar filtrada e aeração, para realização dos testes no laboratório de Fisiocologia de Crustáceos. Em julho de 1996, jovens com dois dias de idade foram comprados da CETESB, que mantém um cultivo em seu laboratório, para a realização dos testes em São Paulo. Em agosto e outubro de 1997, os testes foram realizados no CEBIMar, em São Sebastião, com jovens nascidos de fêmeas coletadas em campo.

Lytechinus variegatus

Aproximadamente trinta a quarenta ouriços da espécie *L. variegatus* (Figura 7) foram coletados pelos técnicos do CEBIMar através de mergulho livre, no interior do canal de São Sebastião, nas proximidades do CEBIMar, antes da realização de cada série de testes de toxicidade.

Os organismos foram mantidos em tanques com água do mar corrente e alimentados com a alga *Ulva* sp até sua utilização nos testes realizados em São Sebastião, à temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, salinidade de $32 \pm 1\%$ e fotoperíodo natural, ou foram mantidos em aquários com capacidade para 100 e 80 litros de água e alimentados com alface, quando os testes foram realizados no laboratório de Fisiocologia de Crustáceos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP. A temperatura foi mantida a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, a salinidade a $33 \pm 1\%$ e o fotoperíodo foi de 12 h luz/ 12 h escuro.

Arbacia punctulata

Os ouriços da espécie *A. punctulata* foram obtidos de uma fonte comercial e assim que chegaram ao laboratório de Port Aransas, Texas, a identificação dos machos e fêmeas foi feita através da aplicação de estímulos elétricos, com uma voltagem de 12 V que possibilitou a liberação dos gametas, esbranquiçados nos machos e violeta nas fêmeas (Figura 8). Machos e fêmeas adultos foram mantidos separadamente em aquários com sistemas de recirculação da água e ajuste automático de temperatura. A dieta era constituída de folhas de alface fornecidas 2 a 3 vezes por semana, ocasião na qual também era feita a limpeza dos aquários através do sifonamento dos detritos acumulados e lavagem ou troca das fibras de vidro e esponjas dos filtros (Figura 9).

A temperatura dos tanques foi mantida a $15 \pm 1^\circ \text{C}$ quando não havia necessidade dos gametas, e foi aumentada gradualmente até $19 \pm 1^\circ \text{C}$ uma semana antes da coleta dos gametas para os testes de toxicidade. O fotoperíodo foi de 16 horas de luz e a salinidade de $30 \pm 1\%$. Os parâmetros de qualidade da água, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados uma vez por semana.

Metodologia dos Testes de Toxicidade

Sistema MICROTOX®

O Sistema Microtox® é um equipamento que permite a realização de testes de toxicidade aguda, com base na inibição metabólica da bactéria marinha *Vibrio fischeri*, anteriormente denominada *Photobacterium phosphoreum*. Esse teste avalia a toxicidade por meio das medidas da quantidade de luz emitida e da luz perdida pelas bactérias após a exposição ao agente tóxico. O chamado Sistema Microtox é constituído de um fotômetro específico acompanhado das cubetas para leitura, das bactérias liofilizadas e dos três reagentes básicos: água de reconstituição, diluente e solução de ajuste osmótico.

Os testes com as amostras de água de produção coletadas em abril/ junho de 1996, agosto/ outubro de 1997 e fevereiro/ abril de 1998 foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Divisão de Microbiologia Ambiental da CETESB e os testes com as amostras de maio/ agosto de 1998 foram realizados no Laboratório de Ensaios Biológicos Ambientais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN. Os testes foram realizados de acordo com a metodologia padronizada e descrita na Norma CETESB L5.227 (CETESB, 1987), à temperatura de 15°C, sendo referidos somente os resultados de CE50 com 15 minutos de tempo de exposição.

Para a realização do teste, 10µl de uma suspensão bacteriana contendo 10⁶ células/ ml de solução de reconstituição (água altamente purificada) foram transferidos para cinco cubetas contendo 0,5 ml de uma solução de diluente e cloreto de sódio a 2%. A seguir foi feita a medida da quantidade de luz inicialmente emitida pelas bactérias nas cinco cubetas. Após essa primeira leitura, um número mínimo de 4 diluições seriadas da amostra de água de produção foram preparadas e 0,5 ml de cada uma das diluições foram transferidos para as cubetas. A primeira cubeta permaneceu como o controle do teste, sendo adicionados somente os 0,5 ml do diluente e não a água de produção. Após 15 minutos foi realizada a segunda medida da quantidade de luz emitida nas cubetas já contendo as amostras de água de produção.

A quantidade de luz perdida por cubeta foi proporcional às concentrações da amostra submetidas ao teste. A perda de luz foi expressa como valor gama, que é definido como a razão entre a luz perdida e a luz remanescente.

A determinação da CE50 foi feita graficamente, plotando-se em papel dilog, a concentração da amostra versus o valor do efeito gama. A CE50 é a concentração da amostra que corresponde ao valor de gama igual a 1.

Paralelamente a cada teste com efluente foi realizado um teste com uma substância de referência para verificar a sensibilidade do lote de organismos utilizados. Nos testes com as amostras de água de produção coletadas em Abril e Junho de 1996, as substâncias de referência utilizadas foram o sulfato de zinco e o dimetil sulfóxido (DMSO), enquanto o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) foi utilizado em paralelo aos outros testes.

Teste com *Mysidopsis juniae*

O teste estático de toxicidade aguda com o crustáceo *Mysidopsis juniae* consiste na exposição de misidáceos jovens durante 96 horas a diferentes concentrações do agente tóxico onde o efeito observado é a mortalidade. Os testes foram realizados de acordo com a Norma CETESB L5.251, modificada em relação ao volume de solução utilizada (CETESB, 1992b).

Os testes foram realizados em frascos de vidro de 150 ml com 100 ml de amostra e três réplicas por concentração. As concentrações teste foram preparadas em escala logarítmica a partir da solução estoque do efluente e da substância de referência. A água do mar utilizada nos controles e como diluente foi filtrada através de cartuchos sequenciais de celulose com poros de 25 e 2 μm para a retirada de material particulado. Após a randomização dos organismos, dez misidáceos com três dias de idade foram transferidos para os frascos-teste. Diariamente, os frascos foram observados para contagem dos organismos vivos, retirada dos mortos e fornecimento de 300 náuplios de *Artemia* sp, como alimento, por frasco teste. Completadas as 96 h, os organismos sobreviventes foram contados e o teste foi encerrado. Os testes foram conduzidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de $33 \pm 1\%$ e fotoperíodo natural. Medidas de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram feitas no início e final de cada teste.

Os resultados foram expressos em valores de CL50; 96h que é a concentração que causa um efeito letal a 50% dos organismos após 96h de exposição ao agente tóxico.

Paralelamente a cada teste com efluente foi realizado um teste de toxicidade utilizando-se o sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), como substância de referência para verificar a sensibilidade do lote de organismos utilizados.

Teste de fecundação com *Lytechinus variegatus*

O teste crônico de curta duração (80 minutos) com gametas do ouriço *Lytechinus variegatus* consiste na exposição de espermatozoides durante 60 minutos a diferentes concentrações do agente tóxico, seguida da adição e exposição dos óvulos durante 20 minutos e encerramento do teste. O teste avalia um efeito subletal agudo onde é observada a capacidade de fecundação dos óvulos pelos espermatozoides

Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita em NIPPER et al. (1993b) e ZAMBONI (1993), modificada em relação ao tipo de frasco teste utilizado e número de óvulos adicionados.

Os testes foram realizados em frascos de vidro de 10 ml com 5 ml de amostra e quatro réplicas por concentração. As concentrações teste foram preparadas através de diluições seriadas (fator 2 de diluição ou dividido por 2) feitas a partir das maiores concentrações das amostras (soluções estoque do efluente e da substância de referência), utilizando-se água do mar filtrada como diluente. A água do mar utilizada nos controles e como diluente foi filtrada através de cartuchos sequenciais de celulose com poros de 25 e 2 μm .

Após o preparo da solução espermática diluída 50 vezes, 100 μl dessa solução foram adicionados aos frascos teste e após 60 minutos de incubação, um volume máximo de 100 μl contendo 2000 óvulos foram adicionados e incubados por mais 20 minutos. Para o cálculo de um volume máximo de 100 μl contendo 2000 óvulos, preparou-se uma solução de óvulos diluída 100 vezes (1 ml da solução inicial de óvulos em 99 ml de água do mar filtrada) e contou-se o número de óvulos de três subamostras de 1 ml dessa solução diluída. A contagem foi feita ao microscópio utilizando-se uma câmara de Sedgwick-Rafter. O valor médio obtido após as três contagens foi extrapolado para a concentração de óvulos/ml da solução inicial, através de uma regra de três. O teste foi encerrado após 80 minutos, através da transferência das amostras teste para frascos de plástico (tubos de filme) contendo 0,5 ml de formalina 10% tamponada. Todos os testes foram conduzidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ C$, salinidade de $33 \pm 1\%$ e fotoperíodo de 12



horas de luz. Medidas de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram feitas no início e final de cada teste.

Paralelamente a cada teste com efluente foi realizado um teste de toxicidade utilizando-se o sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), como substância de referência para verificar a sensibilidade do lote de organismos utilizados.

A leitura das amostras-teste foi feita ao microscópio sob um aumento de 100 vezes utilizando-se uma câmara de Sedgwick-Rafter. Uma ou mais subamostras por réplica foram contadas até a obtenção de um valor total de 100 óvulos fecundados (ovos) e não fecundados.

Os óvulos foram considerados fecundados quando apresentaram uma membrana de fecundação, podendo ser ela parcial ou ao redor de todo o óvulo (Figuras 10a,b). Os resultados dos testes foram expressos em valores de CE50; 80 minutos (concentração efetiva que causa um efeito deletério a 50% dos organismos testados), CI50 (concentração de inibição de 50% do efeito biológico observado), CI25 (concentração de inibição de 25% do efeito biológico observado) e CENO (maior concentração testada onde não foi observado um efeito significativamente diferente do controle).

Teste de fecundação com *Arbacia punctulata*

O teste crônico de curta duração (60 minutos) com gametas do ouriço *A. punctulata* consiste na exposição de espermatozóides durante 30 minutos a diferentes concentrações do agente tóxico, seguida da adição e exposição dos óvulos durante 30 minutos e encerramento do teste. O teste avalia um efeito subletal agudo onde é observada a capacidade de fecundação dos óvulos pelos espermatozóides.

Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita em CARR & CHAPMAN (1992) e CARR (1993).

Os testes foram realizados em frascos de cintilação de vidro descartáveis com 5 ml de amostra e cinco réplicas por concentração. As concentrações teste foram preparadas a partir das soluções estoque do efluente e da substância de referência através de diluições seriadas, utilizando-se água do mar como diluente. A água do mar utilizada como controle e água de diluição foi filtrada através de filtro millipore com 0,45 μm .

Antes de cada teste com a água de produção e a substância de referência, pré-testes eram realizados para a seleção de gametas com qualidade e a determinação de uma diluição de esperma, a ser utilizada no teste definitivo, que fosse responsável por uma taxa de fertilização entre 60 a 90%. No pré-teste os gametas de machos e fêmeas eram coletados e mantidos separados para que pudessem ser feitas diferentes combinações de seus gametas e várias diluições de esperma. Geralmente o pré-teste era feito utilizando-se gametas de dois machos e duas fêmeas, combinados separadamente, cinco concentrações de esperma e duas réplicas por concentração. As diluições utilizadas eram de 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:7500 e 1:10000. A combinação de macho/fêmea em uma diluição de esperma que resultasse em uma taxa de fertilização entre 60 a 90% era escolhida para o teste definitivo.

Uma nova solução espermática com a concentração determinada no pré-teste era preparada utilizando-se o esperma não diluído e guardado sob gelo, do macho escolhido. Após o preparo da solução espermática na diluição determinada no pré-teste, 50 µl dessa solução foram adicionados aos frascos teste e após 30 minutos de incubação, 200 µl da solução de óvulos, da fêmea selecionada no pré-teste, foram adicionados e incubados por mais 30 minutos. O teste foi encerrado após 60 minutos através da adição de 0,5 ml de formalina 10% tamponada diretamente em cada frasco. Todos os testes foram conduzidos à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de $30 \pm 1\text{‰}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Medidas de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram feitas no início e final de cada teste.

Paralelamente a cada teste com efluente foi realizado um teste de toxicidade utilizando-se o dodecil sulfato de sódio (DSS) como substância de referência para verificar a sensibilidade do lote de organismos utilizados.

A leitura das amostras-teste foi feita ao microscópio sob um aumento de 100 vezes utilizando-se uma câmara de Sedgwick-Rafter. Uma ou mais subamostras por réplica foram contadas até a obtenção de um valor total de 100 óvulos fecundados (ovos) e não fecundados.

Os óvulos foram considerados fecundados quando apresentavam uma membrana de fecundação, podendo ser ela parcial ou ao redor de todo o óvulo (Figura 11). Os

resultados dos testes foram expressos em valores de CE50; 60 minutos, CI50, CI25 e CENO.

Teste de desenvolvimento embrionário com *L. variegatus*

O teste crônico de curta duração de desenvolvimento embrionário com o ouriço *L. variegatus* consiste na exposição de ovos fecundados a diferentes concentrações do agente tóxico durante um período de 24 a 28 horas onde o efeito observado é o retardamento do desenvolvimento embrionário ou a presença de anomalias em relação ao controle.

Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita na Norma CETESB L5.250 (CETESB, 1992a), modificada em relação ao volume de solução teste utilizado.

Os testes foram realizados em frascos de vidro de 10 ml com 5 ml de amostra e quatro réplicas por concentração. As concentrações teste foram preparadas a partir das soluções estoque do efluente e da substância de referência através de diluições seriadas, utilizando-se água do mar como diluente. A água do mar utilizada como controle e água de diluição foi filtrada através de cartuchos sequenciais de celulose com poros de 25 e 2 µm.

Após o preparo da solução espermática diluída 50 vezes, 2 ml dessa solução foram adicionados a um béquer contendo 600 ml de uma solução de óvulos. Decorridos 10 minutos a solução contendo os ovos foi diluída 100 vezes através da adição de 1 ml da solução em 99 ml de água de diluição. Essa solução diluída foi sub-amostrada três vezes para a determinação do número médio de ovos e cálculo do volume da solução contendo 300 ovos. A quantidade da solução contendo 300 ovos foi adicionada a cada frasco-teste.

Quinze minutos antes da 24^a hora um frasco controle foi observado para verificação do estágio de desenvolvimento de 100 organismos e esse procedimento foi repetido a cada hora, por no máximo 28 horas.

O teste foi encerrado quando no mínimo 80% dos embriões nos controles houvessem atingido o estágio larval de pluteus no período entre 24 e 28 horas dependendo da velocidade dos organismos para atingir esse estágio de desenvolvimento.

Desse modo, nos diferentes testes realizados o período de duração de cada teste variou entre 24 e 28 horas, quando então as amostras-teste foram transferidas para frascos de plástico (tubos de filme) contendo 0,5 ml de formalina 10% tamponada. Todos os testes foram conduzidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de $33 \pm 1\text{‰}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz. Medidas de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram feitas no início e final de cada teste.

Paralelamente a cada teste com efluente foi realizado um teste de toxicidade utilizando-se o sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como substância de referência para verificar a sensibilidade do lote de organismos utilizados.

A leitura dos testes foi feita ao microscópio sob um aumento de 100 vezes utilizando-se uma câmara de Sedgwick-Rafter. Uma ou mais sub-amostras por réplica foram contadas até a obtenção de um valor total de 100 organismos.

A leitura dos testes foi feita considerando-se desenvolvidos todos os embriões no estágio de larva pluteus e, não desenvolvidos, todos os estágios anteriores e aqueles que apresentavam deformações (Figuras 12a, b). Os resultados dos testes foram expressos em valores de CE50; 24-28 horas, CI50, CI25 e CENO.

Teste de desenvolvimento embrionário com *Arbacia punctulata*

O teste crônico de curta duração de desenvolvimento embrionário com o ouriço *Arbacia punctulata* consiste na exposição de ovos fecundados a diferentes concentrações do agente tóxico durante um período de 48 horas onde o efeito observado é o retardamento do desenvolvimento embrionário ou a presença de anomalias em relação ao controle.

Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita em CARR & CHAPMAN (1992) e CARR (1993).

Os testes foram realizados em frascos de cintilação de vidro descartáveis com 5 ml de amostra e cinco réplicas por concentração. As concentrações teste foram preparadas a partir das soluções estoque do efluente e da substância de referência através de diluições seriadas, utilizando-se água do mar como diluente. A água do mar, utilizada como controle e água de diluição, foi filtrada através de filtro millipore com $0,45 \mu\text{m}$.

Após o preparo da solução de óvulos, 2 ml de uma solução de penicilina foram adicionados a 100 ml da solução de óvulos cinco minutos antes do início do teste. A penicilina foi adicionada para evitar o crescimento de bactérias que podem ocasionar a desintegração dos embriões antes do término do teste. A seguir, 200 µl da solução de óvulos com penicilina foram adicionados aos frascos-teste e imediatamente após, 50 µl de uma solução de esperma, com concentração determinada no pré-teste, foram adicionados. O teste foi encerrado após 48 horas através da adição de 0,5 ml de formalina 10% tamponada diretamente em cada frasco. Todos os testes foram conduzidos à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, salinidade de $30\pm 1\%$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Medidas de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram feitas no início e final de cada teste.

Paralelamente a cada teste com efluente foi realizado um teste de toxicidade utilizando-se o dodecil sulfato de sódio (DSS) como substância de referência para verificar a sensibilidade do lote de organismos utilizados.

A leitura dos testes foi feita ao microscópio sob um aumento de 100 vezes utilizando-se uma câmara de Sedgwick-Rafter. Uma ou mais sub-amostras por réplica foram contadas até a obtenção de um valor total de 100 organismos.

A leitura dos testes foi feita considerando-se desenvolvidos todos os embriões no estágio de larva pluteus e, não desenvolvidos, todos os estágios anteriores e aqueles que apresentavam deformações (Figura 13). Os resultados dos testes foram expressos em valores de CE50; 48 horas, CI50, CI25 e CENO.

Critérios de aceitabilidade dos testes

Para a aceitabilidade dos resultados dos testes são exigidos critérios mínimos de sobrevivência, fecundidade e larvas desenvolvidas nos controles de cada teste. Os critérios adotados foram de acordo com os autores que descreveram os métodos de teste.

Foram considerados como aceitáveis os valores mínimos de 80% de sobrevivência no teste com *M. juniae*, 70% de fecundação e 80% de larvas no estágio pluteus nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus*, respectivamente. Nos testes com *A. punctulata* foi considerado aceitável um valor mínimo de 80% de fecundação e larvas pluteus nos controles de ambos os testes.

Os parâmetros de qualidade da água de cada teste também foram considerados como um dos critérios para a aceitabilidade dos resultados dos testes. Os limites estabelecidos para cada parâmetro foram de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ para a temperatura, mínimo de 5,0 mg/L para o oxigênio dissolvido (WEBER et al., 1988) e de 7,1 a 8,28 para o pH (CETESB, 1980) nos testes realizados no Brasil.

Nos Estados Unidos esses limites foram de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ para a temperatura, mínimo de 5,0 mg/L de oxigênio dissolvido e entre 7,2 a 8,6 para o pH.

Preparo das soluções utilizadas

No Brasil, a maior concentração do efluente (solução estoque) foi obtida após diluição com água destilada até atingir a salinidade de 34‰. A água de diluição utilizada na manutenção dos organismos, controle e preparo das soluções-teste foi água do mar captada na Ponta do Jarobá (extremidade norte da Praia do Segredo no CEBIMar-USP) que é armazenada em caixas d'água e filtrada através de filtros sequenciais de celulose com poros de 25 e $2\mu\text{m}$.

Nos Estados Unidos, a maior concentração do efluente (solução estoque) foi obtida após diluição com água destilada até atingir a salinidade de 30‰. A água de diluição utilizada como controle e no preparo das soluções-teste foi água do mar filtrada (AMF) através de filtro "millipore" de $0,45\mu\text{m}$. A água de diluição foi filtrada e mantida sob aeração um dia antes da realização dos testes de toxicidade.

As soluções-teste de água de produção e substâncias de referência utilizadas nos testes de fecundação e desenvolvimento embrionário foram preparadas diretamente nos frascos-teste através de diluições seriadas das maiores concentrações do efluente e substância de referência.

Após a distribuição e marcação dos frascos-teste, 5 ml da água de diluição foram adicionados em todos os frascos, com exceção do primeiro, onde foram colocados 10 ml da solução estoque do efluente. A seguir, com o auxílio de uma pipeta automática, 5 ml da solução estoque foram transferidos para o frasco contendo 5 ml de água de diluição. Após

terem sido misturados, 5 ml dessa segunda solução foram transferidos para o próximo frasco e assim consecutivamente.

As soluções-teste de água de produção e zinco utilizadas nos testes com misidáceos e em alguns testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval foram preparadas em balões volumétricos a partir de uma solução estoque. As concentrações teste foram determinadas com base em uma escala logarítmica e o cálculo dos volumes de efluente e água de diluição (AMF) a serem adicionados para cada concentração foi feito utilizando-se a fórmula:

$$C1V1 = C2V2 \quad \text{onde:}$$

C1 = concentração da solução estoque

V1 = volume da solução estoque a ser adicionado

C2 = concentração desejada

V2 = volume desejado

Nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus* realizados com as amostras de efluente coletadas em abril/ junho e julho de 1996 foram utilizadas concentrações-teste de zinco de 0,034; 0,076; 0,15 e 0,22 mg Zn/L preparadas a partir de uma solução-estoque com 10 mg Zn/L de água do mar, que por sua vez, havia sido preparada a partir de outra solução com 100 mg Zn/L de água destilada.

Nos testes onde as soluções foram preparadas por diluição seriada as concentrações foram de 0,0137; 0,027; 0,055 e 0,11 mg Zn/L feitas a partir de uma solução-estoque com 0,22 mg Zn/L de água do mar, preparada a partir de uma outra solução-estoque com 100mg Zn/L de água destilada.

Nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata* foram utilizadas concentrações-teste de DSS de 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg DSS/L de água do mar através de diluição seriada preparada a partir da solução de 10mg DSS/L de água do mar.

Nos testes com *M. juniae* as concentrações-teste de zinco foram de 0,18; 0,32 e 0,56 mg/L de água do mar preparadas a partir de uma solução estoque com 100mg Zn/L de água destilada.

Nas Tabelas 2a e b são apresentadas as soluções estoque ou as maiores concentrações do efluente obtidas após o ajuste da salinidade, e as concentrações utilizadas nos testes.

Tabela 2a- Datas de coleta e concentrações (%) de água de produção utilizadas nos testes de toxicidade com *L. variegatus* e *M. juniae*.

Data de coleta AP	Soluções estoque (% AP)	Soluções testadas (% AP)	
		<i>L. variegatus</i>	<i>M. juniae</i>
16/04/96	43	0,0001; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10	0,01; 0,1; 0,75; 1,0; 1,5; 3,0; 7,0; 14 e 28
18/06/96	50	0,01; 0,1; 1,0; 10; 50	0,01; 0,1; 1,0; 10; 50 (48h)
	50	0,06; 0,18; 0,56; 1,75; 5,48 e 16,9	0,18; 0,56; 1,75; 5,48
25/07/96	50	0,01; 0,1; 1,0; 10 e 50	-
	50	0,032; 0,1; 0,31; 0,96; 2,97 e 9,2	0,032; 0,1; 0,31; 0,96; 2,97 e 9,2
20/08/97	45,9	0,17; 0,35; 0,7; 1,4; 2,8; 5,7; 11,5; 22,9; 45,9	0,045; 0,17; 0,7; 2,8; 11,5
21/10/97	43,6	0,17; 0,34; 0,68; 1,36; 2,72; 5,45; 10,9	0,08; 0,34; 1,36; 5,45
10/02/98	59,2	0,23; 0,46; 0,92; 1,85; 3,7; 7,4; 14,8; 29,6; 59,2	-
01/04/98	38,6	0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8; 9,6; 19,3	-
29/04/98	28,3	0,11; 0,22; 0,44; 0,88; 1,76; 3,5; 7,1; 14,1; 28,3	-
18/05/98	35	0,13; 0,27; 0,54; 1,09; 2,18; 4,37; 8,75; 17,5 e 35	-

Tabela 2b- Datas de coleta e concentrações (%) de água de produção utilizadas nos testes de toxicidade com *A. punctulata*.

Data coleta AP	Soluções estoque (% AP)	Soluções testadas (% AP)
22/10/96	42,8; 21,4	10,7; 5,3; 2,6; 1,3; 0,6; 0,3
	42,8; 21,4	10,7; 5,3; 2,6; 1,3; 0,6; 0,3; 0,16
	42,8; 21,4	10,7; 5,3; 2,6; 1,3; 0,6
03/12/96	44; 22	11; 5,5; 2,7; 1,37; 0,68; 0,34; 0,17
	44; 22	11; 5,5; 2,7; 1,37; 0,68
10/01/97	44; 22	11; 5,5; 2,7; 1,37; 0,68; 0,34; 0,17
	44; 22; 11; 5,5	2,7; 1,37; 0,68; 0,34; 0,17
	44; 22; 11; 5,5; 2,7; 1,37	0,68; 0,34; 0,17; 0,08; 0,04
	44; 22; 11; 5,5	2,7; 1,37; 0,68; 0,34; 0,17; 0,08
20/02/97	44; 22	11; 5,5; 2,7; 1,37; 0,68; 0,34
	50; 25	12,5; 6,2; 3,1; 1,56; 0,78; 0,39
	50	25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097
20/03/97	50; 25; 12,5; 6,2; 3,1	1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097; 0,048; 0,024
	42,2	0,01; 0,1; 1,0; 10,0
18/04/97	42,2	0,004; 0,024; 0,139; 0,8; 4,6; 26,4
	48,4	48,4; 24,2; 12,1; 6,05; 3,0; 1,5; 0,75; 0,38; 0,19; 0,09; 0,047; 0,023; 0,011

Parâmetros de qualidade da água

Medidas de temperatura (°C), salinidade (‰), oxigênio dissolvido (mg/L) e pH foram feitas em uma réplica do controle e da maior e menor concentração de todos os testes realizados. Medidas de amônia total (mg/L) também foram feitas, mas somente nas amostras enviadas aos Estados Unidos.

No Brasil, a salinidade foi medida com um refratômetro da marca Atago® ou Reichert®, o oxigênio dissolvido com um oxímetro da marca Digimed® e o pH com um medidor de pH e eletrodo específico da marca Digimed®.

Nos Estados Unidos, a salinidade foi medida com um refratômetro da marca American Optical® ou Reichert®, o oxigênio dissolvido com um medidor YSI® que também fornecia a temperatura das amostras e o pH e a amônia total foram medidos com medidores da marca ORION® e seus eletrodos específicos.

O cálculo da amônia não ionizada (NH₃), que é a fração tóxica da amônia, foi feito de acordo com as tabelas de BOWER & BIDWELL (1978) que apresentam a porcentagem de NH₃ em função do valor da amônia total das amostras, temperatura, pH e salinidade.

3.2.3 Controle de qualidade dos testes

Os procedimentos para o controle de qualidade dos testes incluíram o uso de uma substância de referência e a determinação da precisão intralaboratorial através do cálculo dos coeficientes de variação para cada tipo de teste realizado.

Substância de referência

Os testes com substância de referência foram realizados em paralelo a cada teste com efluente para verificação da sensibilidade de cada lote de organismos utilizado. Para averiguar a aceitabilidade da sensibilidade de cada lote foi calculado o intervalo compreendido pela média dos valores das CL50 e CE50 de todos os testes com substância de referência, acrescida ou diminuída de duas vezes o seu desvio padrão ($X \pm 2DP$). A sensibilidade do lote de organismos foi considerada aceitável quando os valores de CL50 e CE50 obtidos estavam dentro do intervalo delimitado.

Precisão intralaboratorial

A precisão intralaboratorial dos resultados foi expressa como porcentagem do coeficiente de variação ($CV = \text{desvio padrão} \times 100 / \text{média}$) através da utilização da média e desvio padrão dos valores de CL50, CE50 e CI50 de todos os testes realizados.

3.2.4 Análises químicas

Imediatamente após a coleta e homogeneização das amostras não diluídas, foram realizadas medidas de amônia, fenol, sulfeto, óleos e graxas, cloretos e pH no laboratório da PETROBRAS no DTCS, e assim que as amostras chegaram aos laboratórios do CEBIMar ou de Ecotoxicologia Marinha em Corpus Christi, foram feitas medidas de salinidade, amônia, sulfeto, fenóis, oxigênio dissolvido e pH. As metodologias utilizadas nas análises desses parâmetros são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3- Metodologias adotadas nas análises dos parâmetros físicos e químicos da água de produção bruta nos laboratórios da PETROBRÁS, do CEBIMar e de Ecotoxicologia Marinha em Corpus Christi.

PARÂMETRO	LABORATÓRIO		
	PETROBRÁS	CEBIMar	Corpus Christi
Cloretos	Condutivímetro	-	-
Amônia (mg/L)	Kit colorimétrico Merck	-	Medidor e eletrodo ORION
Sulfeto (mg/L)	Kit colorimétrico Merck	-	Medidor e eletrodo ORION
Fenóis (mg/L)	Kit colorimétrico Riedel H.	-	Kit colorimétrico Chemet
Óleos e graxas (mg/L)	Extração c/ trifluoretano e leitura no analisador Oriba infra- vermelho	-	-
pH	Medidor e eletrodo Digimed	Medidor e eletrodo Digimed	Medidor e eletrodo ORION
Salinidade (‰)	-	Refratômetro Atago ou Reichert	Refratômetro American Optical ou Reichert
Oxigênio dissolvido (mg/L)	-	Medidor Digimed	Medidor YSI

No próprio dia da coleta ou no seguinte, as amostras de água de produção preservadas, de acordo com as recomendações da CETESB (1988), e mantidas sob gelo foram encaminhadas aos laboratórios responsáveis pelas análises dos parâmetros físicos e químicos apresentados na Tabela 4.

Quatro laboratórios realizaram as análises químicas das amostras. Os laboratórios envolvidos foram: (1) Empresa de Apoio Tecnológico e Consultoria Ambiental (TCA), (2) Divisão de Caracterização Química do Departamento de Caracterização de Materiais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, (3) Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB e (4) Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Os métodos de análise foram baseados na 18ª e 19ª edições do "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA/AWWA/WPCF, 1992, 1995). A relação das metodologias utilizadas e os respectivos limites de detecção para cada parâmetro são apresentados no Apêndice II.

As três primeiras amostras de água de produção coletadas em abril, junho e julho de 1996 foram enviadas aos laboratórios sem ajuste prévio da salinidade, enquanto as amostras coletadas em agosto/ outubro de 1997 e fevereiro/ abril de 1998 foram enviadas aos laboratórios após diluição com água destilada para ajuste de salinidade.

Na Tabela 4 são apresentados os parâmetros analisados em cada amostra e os laboratórios responsáveis.

Tabela 4- Datas de coleta de água de produção, concentração e salinidade das amostras e análises de parâmetros físicos e químicos realizadas por diferentes laboratórios.

Data Coleta AP	Concentração (%) e Salinidade (‰) da amostra	Análises realizadas	Laboratório responsável
16/04/96	100 e 76	Cloreto, DBO, DQO, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes	TCA
		Al, B, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn	IPEN
18/06/96	100 e 68	Cloreto, DBO, DQO, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, V e Zn	TCA
		Benzeno, Toluceno e Xileno (BTX)	CETESB
25/07/96	100 e 68	Fenóis e sulfeto	TCA
		DBO, DQO, nitrogênio amoniacal	Fac. Saúde Pública-USP
		Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, V e Zn	IPEN
20/08/97	45,9 e 34	AP1 Cloreto, DBO, DQO, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Pb, Sr, Zn, BTEX* e série de sólidos**	TCA
		AP2 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
		AP3 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
21/10/97	43,6 e 34	AP1 Cloreto, DBO, DQO, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Pb, Sr, Zn, BTEX* e série de sólidos**	TCA
		AP2 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
		AP3 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
10/02/98	59,2 e 34	AP1 Cloreto, DBO, DQO, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Pb, Sr, Zn, BTEX* e série de sólidos**	TCA
		AP2 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
		AP3 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
29/04/98	28,3 e 34	AP1 Cloreto, DBO, DQO, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Pb, Sr, Zn, BTEX* e série de sólidos**	TCA
		AP2 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	
		AP3 Cloreto, fenóis, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, pH, sulfeto, surfactantes, BTEX* e série de sólidos**	

*Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

** totais, fixos totais, voláteis totais, dissolvidos totais, suspensos totais, sedimentáveis, dissolvidos fixos e voláteis, suspensos fixos e voláteis.

3.2.5 Análise estatística dos resultados

Testes com *M. juniae*

O método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) foi utilizado para calcular os valores da CL50; 96h de todos os testes com água de produção e substância de referência.

Testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval

O método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) com correção de Abbott (MORGAN, 1992) foi utilizado para calcular os valores da CE50 de todos os testes com água de produção e substâncias de referência.

Nos testes de fecundação foram calculados os valores de CE50; 80 min. (*L. variegatus*) e CE50; 60 min. (*A. punctulata*), e nos testes de desenvolvimento embrio-larval foram calculadas as CE50; 24-28h e 48h, para *L. variegatus* e *A. punctulata*, respectivamente.

A ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos e o controle foi determinada através de um teste de hipóteses, que possibilita a estimativa dos valores de CENO e CEO, e através do método de interpolação linear, que possibilita o cálculo de valores de CI25 e CI50.

O programa estatístico Toxstat versão 3.3 (GULLEY et al., 1991) foi utilizado para a determinação dos valores de CENO e CEO e o Método de Interpolação Linear versão 2.0 (USEPA, 1993) para os valores de CI25 e CI50.

Os procedimentos estatísticos adotados para a análise dos resultados através do uso do programa Toxstat e do Método de Interpolação Linear seguiram as recomendações apresentadas no manual da USEPA (1994).

No Toxstat os dados foram inseridos na planilha em proporção de óvulos fecundados (teste de fecundação) e proporção de larvas no estágio pluteus (teste de desenvolvimento embrio-larval) em cada uma das réplicas do controle e das concentrações teste. As concentrações que não apresentaram óvulos fecundados ou larvas pluteus foram excluídas das análises.

A seguir, os dados foram transformados para o arco seno da raiz e testados quanto a sua distribuição normal através do teste de Shapiro-Wilk, e quanto a homocedasticidade ou homogeneidade de variância através do teste de Bartlett.

Quando as suposições de distribuição normal dos dados e homogeneidade de variância foram cumpridas, a estimativa dos valores de CENO e CEO foram feitas através de testes paramétricos, ou caso contrário, utilizando-se os não-paramétricos.

Na estatística paramétrica, foi feita análise de variância seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnet e de William para determinar quais concentrações diferiam significativamente do controle. Os testes de Dunnet e de William foram utilizados quando o número de réplicas era igual, e o Teste-T com ajuste de Bonferroni para número de réplicas diferentes.

Quando os dados não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, os testes não paramétricos "Steel many-one rank", para número de réplicas igual, e "Wilkoson rank sum" com ajuste de Bonferroni, para número de réplicas diferente, foram utilizados. A utilização dos métodos não paramétricos requer um número mínimo de quatro réplicas por concentração teste.

Após a determinação dos valores de CENO e CEO, foi feito o cálculo da média geométrica que representa uma estimativa arbitrária do efeito limiar ("effect-threshold"). A média geométrica dos valores de CENO e CEO é denominada, nos Estados Unidos, como valor crônico ou algumas vezes valor subcrônico. No entanto, segundo ENVIRONMENT CANADA (1992) o termo mais adequado seria concentração de efeito limiar ("threshold-effect concentration") já que tanto os testes de fecundação, como o de desenvolvimento embrio-larval representam uma fração extremamente pequena do ciclo de vida dos ouriços e não constituem uma exposição crônica.

Portanto, no presente trabalho a média geométrica dos valores de CENO e CEO foi denominada de concentração de efeito limiar (CEL) calculada através da raiz quadrada dos valores de CENO e CEO multiplicados.

O uso do Método de Interpolação Linear apresenta algumas vantagens em relação ao teste de hipóteses para estimativa dos valores de CENO e CEO, como a possibilidade do cálculo do coeficiente de variação dos valores da CIp (concentração de inibição ou de redução de uma porcentagem pré-definida de um parâmetro biológico não letal dos organismos teste), a escolha do valor da porcentagem (p) que causa redução do efeito observado em comparação ao controle (ENVIRONMENT CANADA, 1992) e ainda a possibilidade da inclusão das concentrações-teste onde o número de óvulos fecundados e larvas no estágio pluteus foi igual a zero (USEPA, 1994).

A escolha do valor de p no presente trabalho foi baseada nas recomendações da USEPA (1991, 1994) que sugere os valores de 25 e 50%. Segundo USEPA (1991) os valores da CENO obtidos através do uso da CI25 são muito próximos dos valores da CENO derivados do Teste de Hipóteses e dessa forma a CI25 seria a medida estatística mais indicada para a determinação da CENO.

No presente trabalho, optou-se pela apresentação dos valores da CENO obtidos através do Teste de Hipóteses e da CI25 visando a comparação dos resultados.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Características gerais das amostras de água de produção

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas no dia da coleta, em São Sebastião, SP, e quando do recebimento das amostras em Corpus Christi, TX. Na Tabela 6 estão os valores máximos permitidos de alguns dos parâmetros analisados no efluente, para o descarte em águas costeiras, além dos valores médio, mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos analisados.

As amostras demoraram de quatro a oito dias para chegarem ao laboratório em Corpus Christi, TX. A amostra de dezembro estava semi congelada devido a um excesso de gelo seco adicionado para a manutenção da temperatura, que resultou em uma diminuição da concentração de sulfeto de cerca de 87% do valor inicial.

Considerando-se as diferenças entre os métodos de análise utilizados pelos dois laboratórios para as medidas de sulfeto, houve uma diminuição de sulfeto durante a viagem que variou de 15 a 56% do valor inicial.

Todas as amostras apresentaram valores muito elevados de amônia (62 a 600 mg/L), salinidade (59 a 157‰) e sulfeto (4,38 a 80 mg/L). O fenol analisado apenas em parte das amostras apresentou valores variando de 0,1 a 3,0 mg/L, enquanto para óleos e graxas, analisados em duas amostras, os valores foram de 59 e 85 mg/L. O pH, que variou de 5,97 a 8,72, foi levemente ácido na maioria das amostras com exceção de algumas amostras onde ele se apresentou neutro ou levemente básico. Os valores de oxigênio dissolvido foram muito baixos e variaram de 0,64 a 3,9 mg/L.

Todos parâmetros analisados, com exceção feita para a temperatura e pH, ultrapassaram os limites permitidos para o descarte de efluentes em águas costeiras, segundo a legislação vigente.

3.3.2 Efeito do tempo de estocagem sobre parâmetros físico-químicos

Na Tabela 7 são apresentados os valores iniciais e finais de pH, sulfeto, amônia e fenol de amostras de água de produção estocadas por períodos entre 4 a 11 dias até a realização dos testes de toxicidade.

Durante o período de até 6 dias ocorreu aumento dos valores de pH entre 3,1 a 9,8% dos valores iniciais e no período entre 8 a 11 dias, houve diminuição de cerca de 1,7 a 20,5%. A maioria dos valores de sulfeto sofreu uma variação em torno de 10 a 24% dos valores iniciais e na amostra de março de 1997 houve uma redução de cerca de 56%. Os valores de amônia e fenol obtidos somente para a amostra de abril de 1998 indicaram uma redução de 30% de amônia após 7 dias de estocagem, enquanto o fenol não sofreu modificações.

3.3.3 Efeito da decantação e centrifugação sobre a toxicidade das amostras

Na Tabela 8 são apresentados os resultados dos experimentos preliminares realizados para verificar o efeito da decantação e centrifugação das amostras de água de produção sobre os testes de fertilização e embrio-larval com *A. punctulata*. Esses experimentos foram realizados após ter sido observada a formação de uma camada de material sedimentado no fundo do frasco da primeira amostra de água de produção tratada através da simulação do processo de oxidação química com peróxido de hidrogênio. A presença desse material poderia vir a mascarar os resultados dos testes de toxicidade e dessa forma os dois processos de separação de sólidos em suspensão foram avaliados para a seleção e adoção de um deles como uma das etapas a serem seguidas durante o preparo de todas as amostras posteriores.

A decantação e a centrifugação das amostras de água de produção bruta (AP1) e tratada com peróxido de hidrogênio (AP2) resultaram na redução da toxicidade indicando que a presença de sólidos em suspensão estava interferindo com os resultados dos testes de toxicidade utilizados. Nos testes de fecundação números 3 e 4 com as amostras brutas (AP1), a centrifugação reduziu em cerca de 1,6 e 3,3 vezes a toxicidade inicial. No teste embrio-larval número 3 com a amostra bruta (AP1), a centrifugação reduziu em cerca de 2 vezes a toxicidade inicial. Nos testes de fecundação números 1, 2 e 3 com as amostras tratadas (AP2), a decantação reduziu em cerca de 23, 3 e 2 vezes, respectivamente, a toxicidade

inicial, enquanto a centrifugação nos testes de fecundação números 3 e 4 reduziu em cerca de 2,6 e 2 vezes a toxicidade inicial. No teste embrio-larval número 2 com a amostra tratada (AP2), a decantação reduziu em cerca de 2 vezes a toxicidade inicial, enquanto no teste embrio-larval número 4 com a amostra tratada (AP2), a centrifugação não reduziu a toxicidade da amostra.

De acordo com os resultados obtidos, a decantação parece ter sido um pouco mais eficiente na redução da toxicidade do que a centrifugação. No entanto, devido a maior praticidade do processo de centrifugação, este foi adotado como o procedimento a ser utilizado na etapa de preparo das amostras de água de produção brutas e tratadas.

3.3.4 Eficiência da oxidação química com H_2O_2 na redução de sulfetos e fenol

Os resultados da simulação do tratamento da água de produção através da oxidação química de sulfetos e fenóis são apresentados nas Tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Resultados referentes às concentrações de amônia também foram incluídos visando verificar se o peróxido exercia algum efeito oxidativo sobre esse composto. Antes do tratamento ser iniciado foram retiradas duas subamostras do efluente bruto. A primeira, denominada de não tratada inicial refletiu a concentração de sulfeto antes do tratamento e a segunda, denominada de não tratada final, foi analisada juntamente com a subamostra retirada logo após o término do tratamento para verificar a perda natural de sulfeto da amostra (Figuras 14, 15 e 16).

A remoção natural de sulfeto variou de 23,4 a 51,8%, enquanto a remoção através de tratamento químico variou de 82,3 a 99% do valor inicial. A remoção de fenóis após o tratamento com peróxido foi de 40 a 50% do valor inicial. Estes valores resultaram em concentrações finais de 0,040 a 1,05 mg/L de sulfetos e de 1,0 a 1,5 mg/L de fenóis.

A remoção natural de amônia foi de 3,4 e 34,4%, enquanto a remoção após o tratamento químico variou de 6,4 a 29% do valor inicial, indicando que a redução da amônia das amostras foi decorrente de perda natural e não devido à oxidação pelo peróxido de hidrogênio.

Observou-se a formação de uma camada de material sedimentado em consequência da oxidação do sulfeto a enxofre elementar que pode apresentar-se na forma coloidal ou mesmo em suspensão.

A constatação da presença desse material gerou outras questões relacionadas aos efeitos adversos que poderiam ser ocasionados, e dessa forma foram realizados experimentos comparando-se a toxicidade do efluente tratado homogeneizado e do seu sobrenadante após decantação e centrifugação.

3.3.5 Toxicidade das amostras de água de produção

Nas Tabelas 15, 16 e 17 são apresentados os valores da CL e CE50 de todos os testes de toxicidade realizados com amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) de água de produção. Na tabela 18 são apresentados os valores médios de todos os testes realizados com as amostras AP1, AP2 e AP3.

Para as amostras de água de produção não tratada (AP1) os valores da CL50 do teste com *M. juniae* variaram de 1,29 a 2,66% de AP1, de 0,33 a 5,4% de AP1 no teste com *V. fisheri* (Microtox), de 1,34 a 24,3% no teste de fecundação e de 0,37 a 1,64 no teste embriolarval com *L. variegatus*. Nos testes com *A. punctulata*, os valores da CE50 variaram de 0,24 a 0,56% no teste de fecundação e de <0,39 a 4,67% de AP1 no teste embriolarval (Tabela 15).

Para as amostras de água de produção tratada com peróxido (AP2) o valor da CL50 do teste com *M. juniae* foi de 0,92% de AP2, enquanto os valores da CE50 variaram de 0,44 a 9,8% de AP2 no teste com *V. fisheri*, de 4,75 a >45,9% no teste de fecundação e de 0,40 a 1,04% no teste embriolarval com *L. variegatus*. Nos testes com *A. punctulata*, os valores da CE50 variaram de 0,15 a 0,76% no teste de fecundação e de 0,45 a 4,29% de AP2 no teste embriolarval (Tabela 16).

Para as amostras de água de produção tratadas através dos processos de flotação e oxidação química (AP3) os valores da CL50 dos dois testes realizados com *M. juniae* foram iguais a 2,2% de AP3, enquanto os valores da CE50 variaram de 0,25 a 10,2% de AP3 no teste com *V. fisheri*, de 3,84 a 11,9% no teste de fecundação e de 0,38 a 2,03% no teste embriolarval com *L. variegatus*. No teste de fecundação com *A. punctulata* o valor da CE50 foi de 3,27% (Tabela 17).

A comparação de todos valores de CL e CE50 obtidos indicou que as amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) de água de produção apresentaram a mesma faixa de

toxicidade e esses valores variaram de <0,39 a 10,6% para AP1, de 0,15 a 10,1% de AP2 e de 0,25 a 11,9% de AP3, com exceção feita para os valores de CE50 dos testes de fecundação com *L. variegatus* realizados com as amostras AP1 e AP2 de agosto de 1997.

A sensibilidade dos diferentes métodos de teste utilizados no Brasil e nos Estados Unidos não diferiu entre as amostras brutas e tratadas (Tabela 18). A classificação dos testes, no Brasil, quanto ao nível de sensibilidade indicou para as amostras não tratadas (AP1) o teste embrio-larval com *L. variegatus* como o mais sensível seguido pelos testes com *M. juniae*, *V. fisheri* e fecundação com *L. variegatus* (Embrio > *M. juniae* > Microtox > Fecundação). Para as amostras tratadas (AP2 e AP3) a mesma classificação foi obtida. Nos Estados Unidos, o teste de fecundação com *A. punctulata* foi mais sensível que o teste embrio-larval tanto nas amostras brutas como nas tratadas.

A sensibilidade dos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval diferiu de acordo com a espécie utilizada. Nas amostras testadas no Brasil, o teste embrio-larval foi mais sensível que o teste de fecundação com *L. variegatus* e nas amostras testadas nos Estados Unidos, o teste de fecundação foi mais sensível que o teste embrio-larval com *A. punctulata*.

Comparando-se a efetividade dos tratamentos através dos testes mais sensíveis, ou seja, embrio-larval com *L. variegatus* e fecundação com *A. punctulata*, é possível visualizar que as amostras AP3 tiveram sua toxicidade diminuída enquanto as amostras AP2 não diferiram das AP1.

3. 3. 6 Determinação da CENO e CI25 para os testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval

Nas Tabelas 19 e 20 são apresentados os valores da CE50, CI50, CI25, CENO, CEO e CEL dos testes de toxicidade crônica de curta duração com amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2) realizados com *A. punctulata*. Os valores de CI50 foram incluídos para efeito de comparação com os valores de CE50.

Na Tabela 19 a comparação dos valores médios de CE50 e CI50 dos testes de fecundação indicou similaridade entre os valores tanto para as amostras brutas, como para as tratadas. Os resultados dos coeficientes de variação dos valores de CE e CI50 indicaram

maior variabilidade das amostras de água de produção após o tratamento com peróxido de hidrogênio. A comparação de cada um dos valores da CI25 e CENO para as amostras brutas e tratadas mostrou que os valores de CENO gerados através do teste de hipóteses foram um pouco mais restritivos que os valores de CI25 gerados pelo método de interpolação linear. As concentrações médias de efeito limiar (CEL) apresentaram valores muito semelhantes tanto para as amostras brutas (0,34%) como para as tratadas (0,33%).

Na Tabela 20 a comparação dos valores médios de CE50 e CI50 dos testes de desenvolvimento embrio-larval indicou similaridade entre os valores tanto para as amostras brutas, como para as tratadas. Os resultados dos coeficientes de variação dos valores de CI50 para a amostra bruta (AP1) e dos valores de CE50 e CI50 para a amostra tratada (AP2) indicaram grande variabilidade de ambas as amostras. A comparação de cada um dos valores da CI25 e CENO para as amostras brutas e tratadas mostrou novamente que os valores de CENO gerados através do teste de hipóteses foram mais restritivos que os valores de CI25 gerados pelo método de interpolação linear. As concentrações médias de efeito limiar (CEL) apresentaram o mesmo valor de 1,39% para as amostras brutas e tratadas de água de produção.

Nas Tabelas 21 e 22 são apresentados os valores de CE50, CI50, CI25, CENO, CEO e CEL dos testes de toxicidade crônica de curta duração com amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) realizados com *L. variegatus*. Os valores de CI50 foram incluídos para efeito de comparação com os valores de CE50.

Na Tabela 21, a comparação dos valores médios de CE50 e CI50 dos testes de fecundação indicou similaridade entre os valores, tanto para as amostras brutas (AP1) como para as tratadas (AP2 e AP3). Os resultados dos coeficientes de variação dos valores de CE50 e CI50 indicaram grande variabilidade das amostras de água de produção bruta e menor variabilidade das amostras tratadas. A comparação de cada um dos valores da CI25 e CENO para as amostras brutas e tratadas mostrou que os valores de CENO gerados através do teste de hipóteses foram mais restritivos que os valores de CI25 gerados pelo método de interpolação linear. As concentrações médias de efeito limiar (CEL) apresentaram valores de 5,74% para a amostra bruta (AP1) e de 7,6 e 6,79% para as amostras tratadas AP2 e AP3, respectivamente.

Na Tabela 22, a comparação dos valores médios de CE50 e CI50 dos testes de desenvolvimento embrio-larval indicou grande similaridade entre os valores, tanto para as amostras brutas (AP1) como para as tratadas (AP2 e AP3). Os resultados dos coeficientes de variação dos valores de CE e CI50 indicaram valores entre 51 a 55% para as amostras brutas e tratadas (AP2) e entre 62 a 71% para as amostras submetidas ao tratamento completo (AP3). A comparação de cada um dos valores da CI25 e CENO para as amostras brutas e tratadas mostrou que os valores de CENO gerados através do teste de hipóteses foram mais restritivos que os valores de CI25 gerados pelo método de interpolação linear para amostras brutas. As concentrações médias de efeito limiar (CEL) apresentaram valores muito próximos para as amostras AP1 (0,69%) e AP2 (0,65) e de 1,15 para a amostra AP3.

3. 3.7 Efeito do tratamento da água de produção sobre a toxicidade das amostras

A comparação dos valores da CE50 dos testes com *A. punctulata* realizados com amostras brutas e tratadas demonstrou que o tratamento químico com peróxido para redução de sulfetos e fenóis não reduziu a toxicidade da maioria das amostras, enquanto o tratamento completo (flotação + oxidação química), realizado apenas com uma amostra, foi responsável pela redução da toxicidade (Figuras 17 e 18).

Na Figura 17 podemos observar que os valores da CE50; 60 min. da água de produção bruta (AP1) e tratada (AP2) dos testes de fecundação com *A. punctulata* foram muito próximos para as amostras de janeiro, fevereiro e março de 1997. A amostra de abril de 1997, após tratamento com peróxido, apresentou aumento da toxicidade de aproximadamente 2,8 vezes, enquanto após o tratamento completo, através do processo de flotação e oxidação química, exibiu redução da toxicidade de aproximadamente 7,6 vezes.

Na Figura 18, onde são apresentados os valores da CE50; 48h para o teste embrio-larval com *A. punctulata*, houve aumento da toxicidade de aproximadamente 1,4 vezes na amostra de janeiro de 1997 e diminuição da toxicidade nas amostras de fevereiro e março de 1997 de aproximadamente 1,1 e 1,4 vezes, respectivamente.

Na Figura 19 e Tabela 18 são apresentados os valores médios das CL50 e CE50 determinadas para todos os testes de toxicidade realizados com as amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) de água de produção.

Através da comparação dos valores médios das CL50 e CE50 fica evidente a maior sensibilidade do teste de fecundação com *A. punctulata* seguido pelo teste embrio-larval com *L. variegatus*. Em relação a toxicidade das amostras submetidas aos diferentes tratamentos, os resultados mostraram que as amostras tratadas através da oxidação química com peróxido de hidrogênio (AP2) exibiram redução da toxicidade nos testes Microtox e de fecundação com *L. variegatus*, enquanto para as amostras submetidas ao tratamento completo (AP3) foi possível observar redução da toxicidade para cinco dos testes de toxicidade realizados.

3. 3. 8 Testes com substâncias de referência

A sensibilidade dos vários testes com *V. fisheri* foi similar de acordo com os resultados dos testes realizados com sulfato de cobre e o coeficiente de variação foi de 17,7% (Tabela 23 e Figura 20).

A sensibilidade dos diferentes lotes de *M. juniae* utilizados nos testes com sulfato de zinco mostrou-se similar para quatro dos testes realizados. O lote utilizado em agosto de 1997 apresentou menor sensibilidade indicada pelo valor de CL50 > 0,56 mg/L. O coeficiente de variação de quatro testes foi de 17,98% (Tabela 23 e Figura 21).

A sensibilidade dos diferentes lotes de ouriços utilizados nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus* mostrou-se variável para os testes realizados com sulfato de zinco. Os lotes que apresentaram menor sensibilidade foram os dos testes números 5 (17/8/97) e 10 (1/4/98). Os lotes mais sensíveis foram os dos testes números 7 (21/10/97), 8 (5/2/98) e 12 (1/4/98). O coeficiente de variação de sete testes de fecundação foi de 82% (Tabela 24 e Figura 22).

Em relação aos testes de desenvolvimento embrio-larval realizados com sulfato de zinco, que utilizaram os mesmos lotes de organismos dos testes de fecundação, a sensibilidade foi similar, mas foi realizado um número menor de testes. Somente o lote de junho de 1996 (teste 2) apresentou-se mais sensível com uma valor de CE50 < 0,034 mg/L. O coeficiente de variação de quatro testes foi de 23,6% (Tabela 24 e Figura 23).

A sensibilidade de *A. punctulata* utilizado nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval foi similar para os testes de fecundação realizados com DSS

e variável para os testes realizados com sulfato de zinco. Os coeficientes de variação para os testes de fecundação com DSS e Zinco foram de 22 e 81%, respectivamente (Tabela 25 e Figuras 24 e 25).

Em relação aos testes de desenvolvimento embrio-larval foram utilizados os mesmos organismos dos testes de fecundação e a sensibilidade tanto para os testes com DSS como para os testes com zinco foi similar. Os coeficientes de variação para os testes com DSS e zinco foram de 4,8 e 37,7%, respectivamente. Cabe ressaltar, que os CV foram obtidos de apenas dois testes (Tabela 25).

3.3.9 Critérios de aceitabilidade dos resultados dos testes

Controle dos testes

Na Figura 26 são apresentados os resultados da porcentagem média de sobrevivência nos controles de todos os testes realizados com *M. juniae*. Somente no primeiro teste realizado com a amostra de água de produção coletada em abril de 1996, a sobrevivência no controle foi abaixo do valor mínimo recomendado de 80%.

Na Tabela 24 e Figura 27 são apresentados os resultados da porcentagem média do número de fecundados e pluteus normais nos controles dos testes com *L. variegatus*. Os testes de fecundação números 1, 4, 9 e 12 apresentaram valores variando entre 23 a 69% de fecundados, abaixo do valor mínimo recomendado de 70%. Os testes de desenvolvimento embrio-larval números 1 e 6 apresentaram valores de 73 e 52%, abaixo do valor mínimo recomendado de 80%.

Na Tabela 25 e Figura 28 são apresentados os resultados da porcentagem média do número de fecundados e pluteus normais nos controles dos testes com *A. punctulata*. Somente o teste de fecundação número 4 apresentou valor de 77%, um pouco abaixo do valor mínimo recomendado de 80% e entre os testes de desenvolvimento embrio-larval, todos foram acima do valor mínimo de 80%.

Parâmetros de qualidade da água

Na Tabela 26 são apresentados os parâmetros físico-químicos das amostras utilizadas nos testes com *M. juniae* e *L. variegatus*. O oxigênio dissolvido variou de 6,7 a 8,3 mg/L e permaneceu acima do limite mínimo de 5,0 mg/L, recomendado por WEBER et al. (1988). Devido a problemas apresentados no medidor de oxigênio, os valores de OD das amostras dos testes realizados em 14/2/98 e 3/4/98 mostraram valores de 0,79 a 4,87 mg/L.

A salinidade apresentou valores entre 34 a 37‰. Para *M. juniae* esses valores foram aceitáveis pois os limites de salinidade recomendados para testes agudos com essa espécie são de 24 a 40‰ (CETESB, 1991). Para *L. variegatus*, os valores recomendados variam entre 32 a 35‰ (ZAMBONI, 1993), no entanto a salinidade de 36‰ obtida em alguns controles dos testes de fecundação e embrio-larval do presente estudo não afetou a fecundidade e o desenvolvimento embrionário dos organismos.

A temperatura variou de 23 a 25°C permanecendo dentro dos limites recomendados para a execução de testes de toxicidade com *M. juniae* e *L. variegatus*.

Os valores de pH variaram de 6,8 a 8,1 unidades e apenas o valor de 6,8 não esteve dentro dos limites recomendados de 7,1 a 8,28 unidades de pH de acordo com CETESB (1980).

Na Tabela 27 são apresentados os parâmetros físico-químicos das amostras de água de produção utilizadas nos testes com *A. punctulata*.

Os valores de todos os parâmetros medidos nos controles, constituídos de água do mar filtrada, estiveram dentro de níveis aceitáveis. O oxigênio dissolvido variou de 5,15 a 6,83 mg/L e o pH de 7,9 a 8,1 unidades. As concentrações de amônia e sulfeto foram abaixo dos limites de detecção.

As concentrações de oxigênio dissolvido variaram de 5,5 a 7,6 mg/L nas soluções-teste de água de produção. Esses valores estiveram sempre acima do valor mínimo recomendado para a realização de testes desse tipo, que é de 5,0 mg/L (WEBER et al., 1988).

Os valores de pH variaram de 7,5 a 8,1 unidades. Ambos os valores, mínimo e máximo, estiveram dentro de níveis aceitáveis.

Os valores de amônia total variaram de 0,004 a 25,3mg/L, e de amônia não ionizada de 0,1 a 880µg/L. Os valores de CEO (menor concentração que causa um efeito observável) para NH₃ obtidos para os testes de fertilização e desenvolvimento embrionário com *A. punctulata* são de 600 e 58µg/l, respectivamente (Anexo 1). O valor de 600µg/L foi excedido somente uma vez na concentração de 48,4% de AP do teste realizado com a sexta amostra de água de produção. No entanto, o valor de 58µg/L foi excedido várias vezes.

As concentrações de sulfeto estiveram abaixo do limite de detecção de 0,1mg/L, com exceção do valor de 2,47mg/L de sulfeto obtido na solução estoque de 44% de AP referente ao teste realizado em 17/01/97 com a terceira amostra de água de produção.

3. 3. 10 Análises químicas

Na Tabela 28 são apresentados os resultados das análises químicas realizadas com três amostras do efluente bruto não diluído coletadas em abril, junho e julho de 1996. Na mesma tabela, para efeito de comparação, também são apresentados os valores máximos permitidos para descarte de efluentes em águas costeiras, valores de referência para água do mar da região do Mar do Norte e para amostras superficiais coletadas no canal de São Sebastião, não atingidas por atividades antropogênicas.

Os parâmetros analisados que ultrapassaram os limites máximos permitidos em todas as amostras foram a DBO, óleos e graxas, nitrogênio amoniacal e o ferro. Os valores de salinidade e cloreto, embora não apresentem limites definidos na legislação, foram muito superiores aos valores normalmente encontrados na água do mar em todas as amostras analisadas. Os parâmetros que apresentaram valores acima dos limites permitidos, em pelo menos uma das amostras foram o tolueno, fenol, sulfeto, bário, boro, chumbo e níquel. O pH, cádmio, cromo e manganês nem sempre apresentaram-se dentro dos limites permitidos pela legislação. A concentração de cálcio medida apenas na amostra de abril de 1996 apresentou-se muito acima da faixa de valores normalmente encontrada na água do mar.

A amostra de junho com as maiores concentrações para oito dos parâmetros analisados foi a que apresentou maior toxicidade para o teste embrio-larval com *L. variegatus* (Tabela 15).

Nas Tabelas 29 a 32 são apresentados os valores das análises físico-químicas realizadas com as amostras diluídas brutas e tratadas de água de produção. Mesmo após a diluição das amostras com água destilada para o ajuste da salinidade, muitos parâmetros ainda mostraram-se acima dos valores permitidos na legislação. O parâmetro de demanda bioquímica de oxigênio foi excedido em todas as amostras não tratadas diluídas de água de produção (AP1). Os valores de nitrogênio amoniacal obtidos nas amostras AP1, AP2 e AP3 sempre ultrapassaram o valor máximo permitido, enquanto óleos e graxas não ultrapassaram o valor permitido somente na amostra AP2 de outubro de 97 e nas amostras AP1 e AP3 de abril de 98. Os outros parâmetros que apresentam limites estabelecidos na legislação, nem sempre ultrapassaram os valores máximos permitidos.

Na Tabela 33 estão apresentados os valores das análises de metais realizadas nas amostras não tratadas diluídas (AP1) de água de produção. Dos metais que apresentam limites estabelecidos na legislação somente o bário, em todas amostras, e o ferro, na amostra de agosto de 97, ultrapassaram os valores máximos permitidos. Em relação as análises de cálcio, estrôncio, magnésio e potássio, embora não existam valores definidos na legislação, observamos um excesso ou deficiência desses íons quando os valores obtidos são comparados com os valores de referência para água do mar.

3.4 DISCUSSÃO

A água de produção é uma mistura complexa de substâncias químicas que podem apresentar ações aditivas, antagônicas e sinérgicas entre si. O descarte contínuo desse efluente em um ecossistema marinho como o Canal de São Sebastião que tem suas águas classificadas como pertencentes a classe cinco, ou seja, destinadas à recreação de contato primário, à proteção da biota aquática e à aquicultura, requer a adoção de medidas preventivas e efetivas que protejam a biota aquática presente no local e proporcionem a manutenção de suas condições de qualidade.

Para a adoção de qualquer medida de proteção da vida aquática de um determinado ambiente é necessário o conhecimento da área, através de estudos da flora e fauna local, das condições hidrodinâmicas, das fontes de poluição e da sua toxicidade, bem como das características químicas das mesmas, entre outros.

Estudos envolvendo várias áreas de conhecimento sobre o Canal de São Sebastião têm sido desenvolvidos por várias décadas, mas se concentram principalmente nas de 70, 80 e 90. AMARAL et al. (1996) reuniram 946 referências sobre estudos desenvolvidos sobre o Canal de São Sebastião em uma coletânea bibliográfica. Os trabalhos foram divididos por áreas e nestas, o número de publicações foi de 345 para Fisiologia, 200 para Ecologia, 142 para o Meio Ambiente, 139 para Zoologia, 70 para Oceanografia, 26 para Geologia, 17 para Botânica e 7 para Geografia.

Apesar do grande número de publicações sobre o Canal ainda existe um potencial muito grande a ser explorado em diversas áreas de conhecimento, entre elas a ecotoxicologia aquática.

O Canal de São Sebastião é um importante ecossistema marinho, pois apresenta uma rica diversidade florística e faunística presente em suas águas e sedimento. No entanto, também apresenta vulnerabilidade crescente devido à presença de fontes pontuais e esporádicas de poluentes. Os esgotos domésticos, ricos em matéria orgânica, se constituem

em uma das principais fontes pontuais que lançam continuamente compostos químicos nas suas águas e têm sua carga aumentada nos períodos de maior afluxo turístico. As fontes esporádicas são constituídas pelos derramamentos acidentais de petróleo por navios petroleiros e pelas atividades de rotina de carga e descarga no Terminal Petrolífero.

Recentemente foi adicionada mais uma fonte pontual de poluentes lançados no Canal, constituída pelos efluentes derivados do Terminal Petrolífero da PETROBRÁS, compostos preponderantemente de água de produção.

Dessa forma é importante o conhecimento e estabelecimento da carga tóxica do efluente e os possíveis impactos que poderão advir do seu descarte contínuo.

Para isso duas abordagens para o controle dos agentes tóxicos presentes nos efluentes podem ser utilizadas. Uma delas utiliza o controle através de substâncias específicas, realizado a partir de determinações estabelecidas pelas Legislações Estadual e Federal que contém as concentrações máximas permitidas de alguns parâmetros físicos e químicos. Na outra abordagem, o controle é feito através do uso de testes de toxicidade no efluente como um todo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

No controle dos agentes tóxicos presentes em um efluente, através da segunda abordagem, são utilizados testes de toxicidade aguda e crônica que apresentem metodologias padronizadas. Para avaliar os efeitos letais e subletais causados pela exposição a um efluente recomenda-se o uso de no mínimo três espécies pertencentes a filos distintos ou a diferentes níveis tróficos (produtores, consumidores primários e secundários). O uso de mais de um organismo se faz necessário, pois as espécies podem apresentar diferenças na sensibilidade a um agente tóxico determinado. Geralmente a diferença entre a espécie menos sensível e a mais sensível é de várias ordens de magnitude (EPA, 1991).

Em um estudo conduzido por SCHIMMEL ET AL. (1989) envolvendo cinco organismos marinhos pertencentes a três filos ficou demonstrada a diferença de sensibilidade entre as espécies, dependendo do tipo de efluente. Em um total de 13 efluentes testados a alga *Champia parvula* foi mais sensível em 15% dos casos, *Arbacia punctulata* em 54%, *Mysidopsis bahia* em 31% e duas espécies de peixes em 15%.

Em alguns casos específicos, onde o efluente apresenta variação mínima, o uso das duas espécies mais sensíveis também é recomendado (EPA, 1991).

No presente estudo, o uso da bactéria *V. fisheri*, do crustáceo *M. juniae* e dos equinodermos *L. variegatus* e *A. punctulata* se mostrou adequado, pois os organismos utilizados, pertencentes a níveis tróficos distintos, apresentaram diferentes sensibilidades tanto em nível de espécie como em nível de resposta biológica, podendo aumentar a segurança para a detecção de variações na toxicidade do efluente.

Nos organismos utilizados no Brasil, o posicionamento das espécies quanto à sensibilidade demonstrou que o teste de desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus* foi o mais sensível e o teste de fecundação, com a mesma espécie, foi o menos sensível entre todos os tipos de teste, cerca de 7 vezes. Essa diferença de sensibilidade entre respostas biológicas para *L. variegatus* foi observada por ZAMBONI (1993), onde o teste embrio-larval foi cerca de 15 vezes mais sensível que o teste de fecundação, após exposição à amônia. Uma diferença na sensibilidade de cerca de 2 vezes entre os dois métodos também foi observada por PRÓSPERI (1993), após exposição ao efluente da COSIPA.

Outros autores obtiveram o mesmo tipo de resposta para o ouriço *A. punctulata*. CARR et al. (1996a) reportaram diferenças de sensibilidade após exposição à amônia não ionizada (NH₃), onde o teste embrio-larval foi cerca de 9 vezes mais sensível que o teste de fecundação. Para NACCI et al. (1986) o teste de fecundação foi 3 e 6 vezes mais sensível que o embrio-larval após exposições a prata e ao chumbo, respectivamente, enquanto o teste embrio-larval foi cerca de 3 vezes mais sensível do que o teste de fecundação após exposição ao cádmio. Para dois compostos orgânicos o teste de fecundação foi aproximadamente 100 e 1000 vezes mais sensível que o teste embrio-larval.

A maior sensibilidade do teste de fecundação em relação ao teste embrio-larval apresentada por *A. punctulata* nas amostras de água de produção enviadas aos Estados Unidos, cerca de 9 vezes, também foi reportada por D'UNGER et al. (1996) quando estudaram os efeitos da água de produção, descartada na baía de Nueces no Texas, sobre essa espécie.

A diferença de sensibilidade entre *L. variegatus* e *A. punctulata* pode estar relacionada a diferenças entre os métodos de teste e na composição da água de produção.

As durações do teste de fecundação com *L. variegatus* e *A. punctulata* são de 80 e 60 minutos, respectivamente, enquanto os testes de desenvolvimento embrio-larval apresentam durações de 24-28 e 48 horas.

Os testes de fecundação com as duas espécies de ouriço também apresentam diferenças relativas ao preparo da solução espermática. No teste com *L. variegatus* uma solução espermática padrão é preparada adicionando-se 0,5 ml de esperma puro a 24,5 ml de água de diluição para a obtenção de uma solução diluída 50 vezes. No teste com *A. punctulata* um pré-teste é realizado com cinco diluições de esperma variando de 1:1250 a 1:10000 vezes para a determinação da diluição responsável por uma taxa de fecundação entre 60 a 90%, evitando-se com isso o efeito da poliespermia conhecido por diminuir a sensibilidade do teste. Após a escolha da diluição adequada, esta é utilizada nos testes com o efluente e a substância de referência.

A menor sensibilidade do teste de fecundação com *L. variegatus* pode estar relacionada com uma possível poliespermia ocasionada por uma quantidade maior de espermatozoides do que a necessária para fertilizar todos os óvulos. Este efeito, responsável pela diminuição da sensibilidade do teste de fecundação, foi observado em testes realizados com *A. punctulata* após exposição ao cobre. A magnitude desse efeito foi de uma diminuição da sensibilidade de aproximadamente 2,5 vezes para uma razão esperma:óvulo (E:O) de 250:1 e 2500:1, respectivamente (WEBER et al., 1988, CHAPMAN, 1995).

No presente estudo não foram efetuadas contagens do número de espermatozoides adicionados impossibilitando a determinação da relação E:O, no entanto com base em um estudo prévio realizado por BADARÓ-PEDROSO & SANTOS (dados não publicados), soluções padrão de espermatozoides diluídas 50 vezes resultaram em uma relação que variou de $14,5 \times 10^3$ a 72×10^3 espermatozoides por óvulo e produziram porcentagens de fecundação nos controles variando de 47 a 99%. De seis experimentos realizados, apenas um apresentou valor abaixo do número mínimo recomendado de 70%.

Considerando-se que a mesma faixa de variação para o número de fecundados foi obtida para o presente estudo, também poderíamos considerar a mesma variação na relação esperma:óvulo.

Em testes de fecundação com *L. variegatus* realizados por NIPPER et al. (1993b) utilizando-se sulfato de zinco e dodecil sulfato de sódio não foi observada variação significativa na sensibilidade do método, devido a diferenças na relação esperma:óvulo. As taxas do número de espermatozoides por óvulo utilizadas em todos os testes variaram de $18,7 \times 10^3$ a $58,2 \times 10^3$ e foram similares às taxas estimadas para o presente estudo.

No entanto, em estudos conduzidos por PRÓSPERI (1993) a autora obteve uma relação de 21×10^3 a 54×10^3 espermatozoides por óvulo, e em um total de oito testes realizados, apenas dois apresentaram porcentagens de fecundação iguais ou maiores que 88,8%. No restante dos testes essa porcentagem variou de 5 a 44,2%.

Outra possibilidade para explicar a diferença entre as respostas apresentadas pelos dois métodos é relacionada à duração dos testes. Segundo KOBAYASHI (1980), a sensibilidade do teste embrio-larval com ouriço muda de acordo com o estágio de desenvolvimento e aumenta principalmente a partir do estágio de gástrula que antecede o estágio final onde o embrião passa para a fase de pluteus. Essas fases são muito próximas ao período final de exposição aos agentes tóxicos, que no teste com *L. variegatus* é de 24h e no teste com *A. punctulata* é de 48h. Considerando-se a hipótese de que durante esses períodos, a composição do efluente esteja sendo modificada através de processos de degradação e volatilização, onde certos compostos estão diminuindo suas concentrações ou se transformando em compostos menos tóxicos, no teste com *A. punctulata* que apresenta maior duração, o período de maior sensibilidade do teste estaria coincidindo com uma diminuição da toxicidade do efluente.

Existe uma grande possibilidade disso ter ocorrido, já que análises químicas da água de produção realizadas no dia da coleta e após períodos de estocagem, variando entre cinco a onze dias, indicaram diminuições nas concentrações de sulfeto entre 10 até 56,2% e de 30% de amônia, após sete dias de estocagem (Tabela 7).

Segundo USEPA (1994) a avaliação da toxicidade de uma amostra de efluente deve ser feita preferencialmente dentro de um período máximo de 36h após a coleta e esse período pode ser estendido até 72h caso fique comprovado que a amostra não apresenta redução da sua toxicidade. No presente estudo, principalmente com as amostras enviadas aos Estados Unidos foi impossível cumprir o prazo recomendado devido a demora para a entrega das amostras. No entanto, todos os cuidados necessários a manutenção da integridade das

amostras foram seguidos, como o preenchimento total dos frascos e a manutenção da temperatura de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante o transporte e após a entrega. Outros autores como SCHIFF et al. (1992) reportaram o mesmo tipo de dificuldade com o prazo de entrega de amostras de água de produção e avaliaram o efeito da estocagem durante um período de 8 dias à 4°C sobre alguns parâmetros químicos das mesmas. Os resultados obtidos indicaram não ter havido redução significativa do carbono orgânico total e dos hidrocarbonetos aromáticos voláteis (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno: BTEX). A diminuição da concentração de BTEX foi de no máximo 10% após o período de 8 dias.

MONTGOMERY et al. apud SCHIFF et al. (1992) avaliaram o efeito de diferentes períodos de estocagem de água de produção sobre o teste de toxicidade com misidáceos. Os resultados dos testes de toxicidade realizados com amostras recém coletadas foram similares aos resultados das amostras estocadas por períodos de 4 e 8 semanas.

SOMERVILLE et al. (1987), GIRLING (1989) e STRØMGREN et al. (1995) realizaram experimentos de biodegradação com água de produção e comprovaram a redução ou remoção de muitos compostos através desse processo.

SOMERVILLE et al. (1987) determinaram a taxa de biodegradação de constituintes orgânicos em condições de cultura contínua com taxas de diluição de 0,05 a 0,1/hora. A ação bacteriana nessas condições foi responsável pela remoção quase completa dos hidrocarbonetos aromáticos de baixo peso molecular (etilbenzeno; 1,2, 1,3 e 1,4 dimetilbenzeno; isopropilbenzeno, 1,2,4 trimetilbenzeno; 2 e 4 metilfenol; 2,4 xilenol e naftaleno) e de ácidos carboxílicos (acetato, propionato e butirato).

GIRLING (1989) utilizou um inóculo de bactérias para a biodegradação de compostos orgânicos em um experimento com dez dias de duração conduzido a temperatura de 20°C e mantido continuamente sob homogeneização. Após o experimento, as amostras foram filtradas para a retirada das bactérias em suspensão e gotas de óleo. Testes agudos (48h) realizados com o copépodo *Acartia tonsa* indicaram redução da toxicidade em cerca de

MONTGOMERY et al. (1988). Produced (formation) water: Methods development and preliminary toxicity tests results. Apud SHIFF et al. (1992). A comparative evaluation of produced water toxicity. In: RAY, J. P. and ENGELHARDT, F. R. eds. *Produced Water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. new york, Plenum Press. p.199-207.

80%. Em testes crônicos com duração de 21 dias ocorreu um aumento significativo da população de copépodos nas concentrações de 0,5 a 15% das amostras biodegradadas, em contraste com uma diminuição nas concentrações de 1 e 5% das amostras não biodegradadas.

Devido às condições experimentais adotadas nos dois trabalhos anteriores, os resultados obtidos podem estar superestimando o processo de biodegradação sob condições naturais.

No entanto, o estudo conduzido por STRØMGREN et al. (1995) foi o que mais se aproximou do processo natural de biodegradação no mar, através do uso de água do mar como inóculo. Em experimentos iniciais realizados com água de produção não diluída foi obtida inibição completa da atividade bacteriana devido provavelmente a alta salinidade da amostra e concentrações elevadas de compostos inorgânicos. Baseado nesses resultados os experimentos de biodegradação foram conduzidos com água de produção na concentração de 10% e a duração do experimento foi de 28 dias à temperatura de 20°C. Os resultados indicaram redução acentuada principalmente dos fenóis devida em parte à evaporação durante a homogeneização diária da amostra. Para avaliar a toxicidade das amostras brutas e biodegradadas foram utilizados testes de toxicidade com organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos. A microalga *Skeletonema costatum*, mexilhões jovens de *Mytilus edulis*, o bivalve *Abra alba*, e embriões da ostra *Crassostrea gigas*. Nas amostras biodegradadas provenientes de três diferentes campos de produção houve redução significativa da toxicidade para *M. edulis* e *A. alba* nos campos 2 e 3, e para *C. gigas* somente no campo 3. No entanto para o campo 1 ocorreu aumento significativo da toxicidade para *M. edulis*.

Esses resultados confirmam a importância da utilização de diferentes organismos para a detecção de variação da toxicidade em amostras de efluente e também evidenciam a natureza complexa da água de produção que em alguns casos pode ter a sua toxicidade aumentada através da formação de subprodutos mais tóxicos após ter sido submetida ao processo de biodegradação.

A comparação da toxicidade apresentada pela água de produção não tratada através do uso de diferentes organismos no presente estudo com dados da literatura mundial de

testes de toxicidade aguda e crônica de curta duração mostrou uma grande similaridade entre a faixa de valores de CL e CE50 obtidos. No presente estudo a toxicidade da água de produção variou de 0,24 a 24,3% para todos os organismos e respostas biológicas utilizadas (Tabela 15), enquanto nos dados da literatura a toxicidade variou de 0,2 a 67,6% (Anexo 2).

No Anexo 2 é interessante observar que a sensibilidade à água de produção varia de acordo com os organismos e respostas biológicas empregadas e também em função da composição da água de produção utilizada. Se tomarmos como exemplo os trabalhos de SCHIFF et al. (1992) e BRENDEHAUG et al. (1992) isso fica evidente.

Em SCHIFF et al. (1992) a comparação da sensibilidade dos diferentes testes de toxicidade utilizados mostrou o teste de fecundação com o ouriço *Strongylocentrotus purpuratus* como o mais sensível (CE50 de 0,74 a 1,73%), seguido pelos testes com *Menidia beryllina* (CL50 >1,12 a 5,8%), *M. bahia* (CL50 de 4,9 a 11,8%), Microtox (CE50 de 8,9 a 16,6%) e *Neanthes arenaceodentata* (CL50 de 18,1 a 28,5%).

No entanto, no estudo conduzido por BRENDEHAUG et al. (1992) o teste Microtox foi o mais sensível com valores de CE50 variando de 4 a 20% de água de produção, seguido pelo teste com *Artemia sp* (CL50 de 1,9 a 35,7 % de AP) e *S. costatum* (CE50 de 4,5 a 50% de AP).

No mesmo anexo também observamos que em nível individual os testes mais utilizados foram o Microtox com a bactéria *V. fischeri* seguido do teste com a microalga *S. costatum* e do teste com o copépodo *A. tonsa*. Em nível de grupo, os crustáceos (12) foram os mais utilizados seguidos pelas algas (8) e, bactéria (6) e moluscos (6) em igual número de vezes.

Para a avaliação da toxicidade das amostras de água de produção utilizadas no presente estudo, devem ser considerados fatores relacionados com a variação da sensibilidade dos diferentes lotes de organismos e precisão dos métodos de teste utilizados, a variabilidade do efluente, suas características físico-químicas, a simulação do tratamento físico e químico a que as amostras foram submetidas e a diluição da água de produção no corpo receptor.

A variação da sensibilidade, dos diferentes lotes de organismos utilizados nos testes de toxicidade com substâncias de referência, pode interferir na precisão dos resultados se os organismos apresentarem sensibilidade maior ou menor que o valor médio obtido.

Entre todos os testes de toxicidade utilizados, o teste de fecundação com *L. variegatus* foi o que apresentou maior variação de sensibilidade. De doze testes realizados, cinco apresentaram valores das CE50 fora do intervalo delimitado. Dois lotes utilizados apresentaram menor sensibilidade, enquanto três foram mais sensíveis. A variação da sensibilidade do teste de fecundação pode ser atribuída a mudanças das condições dos organismos relacionadas ao tamanho, dieta, fase do ciclo reprodutivo, condições e período de manutenção dos adultos, método do teste e substância de referência utilizada.

Os ouriços utilizados no presente estudo nem sempre foram coletados no mesmo local e este fator poderia estar influenciando a qualidade dos gametas obtidos. O tamanho dos ouriços pode estar relacionado com a sua maturidade reprodutiva e como consequência, com a qualidade dos gametas. No presente estudo procurou-se coletar ouriços apresentando o mesmo tamanho, mas isso nem sempre ocorreu. GARCIA et al. (1996) determinaram uma relação entre diferentes classes de tamanho, entre 30 e 70mm de diâmetro, do ouriço *L. variegatus* e índice de maturidade gonadal. Essa relação foi diferente para machos e fêmeas. Nas fêmeas, as etapas de desenvolvimento gametogênico acompanharam o crescimento dos indivíduos até a classe de 60 mm. Nos machos, o desenvolvimento gametogênico não acompanhou o crescimento dos indivíduos, mas nas classes de 55 e 65mm foram observadas maiores porcentagens de espermatozóides.

Os ouriços utilizados no presente estudo foram coletados em diferentes épocas do ano e apresentavam diferentes classes de tamanho. Portanto, dependendo da época do ano, caso exista alguma variação sazonal relativa a uma maior ou menor viabilidade dos gametas, e do tamanho dos ouriços utilizados, esses fatores podem ter interferido na sensibilidade dos testes.

No entanto, segundo CHAPMAN (1995), essas mudanças refletem variações que ocorrem constantemente nas populações naturais de organismos que os testes de toxicidade são destinados a proteger.

A polispermia ou um maior número de espermatozóides do que o necessário para fertilizar todos os óvulos pode diminuir a sensibilidade do teste de fecundação com ouriço e isso pode ter sido a causa da diminuição da sensibilidade dos testes realizados em 17/8/97 e 1/4/98.

Embora alguns dos lotes de organismos utilizados tenham apresentado variação da sua sensibilidade, os parâmetros físico-químicos de qualidade da água e a maioria dos controles dos testes estiveram dentro dos padrões recomendados. Dessa forma os testes realizados não foram descartados.

Em relação a precisão intralaboratorial do teste de fecundação com *L. variegatus*, o coeficiente de variação obtido foi acima dos valores obtidos por outros autores. NIPPER et al. (1993b) obtiveram valores de coeficientes de variação para o zinco e o DSS em testes de fecundação com *L. variegatus* de 48,6 e de 21,2%, respectivamente. SCHIMMEL et al. (1989) obtiveram coeficientes de variação de 55,9 % para o cobre e de 26,1% para o DSS em testes de fecundação com *A. punctulata*. Resultados similares foram apresentados pela EPA (1991) com valores de 48,2% para o cobre e 33,3% para o DSS, em testes de toxicidade com a mesma espécie.

Nos testes de fecundação com *A. punctulata* realizados no presente estudo, os coeficientes de variação obtidos foram de 22,1% para o DSS e de 80,6% para o zinco. O valor para o zinco foi muito próximo ao coeficiente de variação de 82% obtido para o teste de fecundação com *L. variegatus*. Esses resultados talvez sejam uma indicação de que a grande variabilidade apresentada pelo teste de fecundação com *L. variegatus* seja decorrente da substância de referência utilizada, já que a mesma faixa de variação foi obtida para *A. punctulata* quando o zinco foi utilizado. BAY et al. (1993) em uma revisão sobre os testes de fecundação com equinodermos indicaram uma maior variação dos testes nos quais um metal, no caso o cobre, foi utilizado como substância de referência. Os mesmos autores relacionam uma série de fatores que podem interferir nos resultados dos testes de fecundação com o ouriço *Strongylocentrotus purpuratus*. Entre esses fatores estão incluídos os métodos de coleta de esperma, concentração do esperma, período de exposição, desempenho dos controles, substância de referência utilizada, água de diluição e espécie.

Os resultados do trabalho de PHILLIPS et al. (1998) sobre a variação espacial e temporal do teste de fecundação com o ouriço *S. purpuratus* utilizando o zinco como

substância teste reforçam algumas das hipóteses levantadas para explicar a grande variação dos resultados do teste de fecundação com *L. variegatus* obtidos no presente estudo. Os coeficientes de variação foram de 86,5% nos testes realizados com ouriços mantidos no laboratório e de 76,8% para ouriços obtidos em campo. Segundo os autores essa variação pode estar relacionada ao uso do zinco como substância teste e a efeitos causados por diferenças sazonais entre as temperaturas de campo e de laboratório e a temperatura de teste.

Em relação aos outros testes utilizados no presente estudo os valores dos coeficientes de variação estiveram na faixa entre 17,7 e 23,6%. Esses valores indicam boa reprodutibilidade dos testes e estão muito próximos aos valores obtidos por outros autores (NIPPER et al., 1993a,b; BADARÓ-PEDROSO, 1993; PRÓSPERI, 1993 e RODRIGUES et al, 1998).

Para os testes de toxicidade com *M. juniae* e embriões de *L. variegatus* foi definida uma faixa aceitável de valores da CL e CE50 para uma série de testes realizados com zinco por NIPPER & PRÓSPERI (1993), durante um período de quatro anos. Esses valores foram de 0,25 a 0,45 mgZn/L para *M. juniae* e de 0,014 a 0,106 mgZn/L para *L. variegatus*. Os valores obtidos no presente estudo, para ambos os testes, estão dentro desse intervalo.

Segundo a EPA (1991), para a avaliação adequada da variabilidade da toxicidade de um efluente recomenda-se a realização trimestral de testes de toxicidade com três espécies diferentes durante um período de um ano. O resultado do teste de toxicidade referente à espécie ou resposta biológica mais sensível é considerado como a toxicidade medida do efluente analisado.

No presente estudo foram realizadas 18 amostragens de água de produção ao longo de três anos. Durante um período, as amostras foram mensais e no outro, irregulares. No entanto, devido ao grande número de amostragens realizadas, elas podem ser consideradas representativas do efluente em questão. Quanto aos testes de toxicidade, nem sempre foi possível realizar todos os três testes com a mesma amostra.

Os testes que melhor caracterizam a toxicidade das amostras não tratadas (AP1) ao longo desse período foram os testes de desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus* (teste crônico) e microtox com *V. fisheri* (teste agudo) realizados em paralelo com 6 amostras coletadas em abril/ junho/96, agosto/97, fevereiro/ abril e maio de 98. Dessa forma,

a toxicidade média da água de produção está representada por valores de 0,83% ($\pm 0,46$) para o teste embrio-larval e de 2,56% ($\pm 1,77$) para o teste Microtox.

É importante ressaltar que devido à alta salinidade da água de produção, que variou de 59 a 157‰, optou-se pelo ajuste da salinidade de todas as amostras para remover a influência da salinidade sobre a toxicidade. Essa decisão foi baseada em estudos prévios realizados pela FUNDESPA (1992), SCHIFF et al. (1992), D'UNGER et al. (1996), PHAN et al. (1994) e SOUSA & TOMMASI (1997).

Nos estudos da FUNDESPA que abrangem os trabalhos de PHAN e SOUSA & TOMMASI, publicados posteriormente, foram realizados experimentos preliminares para verificar o efeito da adição da água destilada no ajuste da salinidade para os testes com misidáceos. Os resultados obtidos indicaram que a adição da água destilada não afetou a qualidade da água e nem a sobrevivência dos organismos.

No estudo de D'UNGER et al. (1996) o uso de água destilada para ajustar a salinidade das amostras de água de produção também não apresentou toxicidade, pois esse procedimento foi utilizado em vários estudos prévios realizados por eles em testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata*.

SCHIFF et al. (1992) realizaram experimentos com o misidáceo *M. bahia* e amostras de água de produção com salinidade e pH ajustados e não ajustados. Nos experimentos com salinidade ajustada, foi adicionada água destilada para a obtenção de uma salinidade final de 20‰ e pH 8,0, enquanto nos outros, as diluições de água de produção foram preparadas adicionando-se água do mar com salinidade de 20‰. Nessa segunda série de experimentos, o uso de água de produção hipersalina (188 a 196‰) resultou em várias salinidades nas diferentes diluições-teste. Os valores da CL50; 96h para os experimentos com salinidade ajustada e não ajustada foram de 5,27% e 8,15% de água de produção, respectivamente. Os tratamentos onde foi feito ajuste de salinidade e pH, concomitantemente, apresentaram pouco efeito sobre os resultados e indicaram até menor toxicidade das amostras ajustadas. O misidáceo *M. bahia* apresenta uma boa tolerância a variações da salinidade, pois é uma espécie estuarina e isso provavelmente deve ter influenciado os resultados.

Outro trabalho onde também foram avaliados os efeitos da salinidade sobre a toxicidade da água de produção hipersalina foi realizado por MOFFITT et al. (1992). Neste,

a água de diluição utilizada para o preparo das soluções teste foi constituída de água do mar artificial, com salinidade entre 25-26‰. Foram realizados testes de toxicidade crônica de curta duração (7 dias) com o misidáceo *M. bahia* e o peixe *Cyprinodon variegatus*. Para determinar se a toxicidade observada para as duas espécies poderia ser atribuída à alta salinidade inicial, entre 58 a 150‰, das amostras de água de produção, foram calculados os coeficientes de correlação para os valores de CL50; 96h e 7 dias. Os coeficientes de correlação obtidos não foram significativamente diferentes de zero, indicando não haver relação significativa entre a sobrevivência e a salinidade.

No entanto, PILLARD et al. (1999) determinaram os valores da CL50; 48h de concentrações salinas variando de 0 a 80‰ para as duas espécies anteriormente estudadas. Os resultados obtidos indicaram valores de CL50; 48h de 45‰ e 70‰ para *M. bahia* e *C. variegatus*, respectivamente. Esses resultados mostraram que as altas concentrações da salinidade da água de produção, presentes nos estudos de MOFFITT et al. (1992), podem ocasionar efeitos letais aos dois organismos.

A toxicidade de soluções hipersalinas pode ser devida às condições osmóticas e também ser resultado de concentrações específicas de certos íons. As amostras de água de produção utilizadas no presente estudo apresentaram salinidade que variou de 59 a 157‰, enquanto a salinidade normal da água do mar é de cerca de 32‰. Organismos habitantes de ambientes marinhos como o Canal de São Sebastião são na sua maioria classificados como espécies estenoalinas, ou seja, toleram apenas uma variação reduzida na salinidade do meio circundante, embora espécies eurialinas também ocorram no Canal.

O copépodo planctônico eurialino *Euterpina acutifrons* possui ocorrência registrada em ambientes com salinidades variando de 8 a 39‰ e estudos laboratoriais mostraram a capacidade de reprodução da espécie, em salinidades de 15 a 45‰ (MOREIRA & YAMASHITA, 1975). No entanto, estudos conduzidos por MOREIRA (1975) mostraram que populações dessa espécie, provenientes do estuário de Santos e do Canal de São Sebastião, exibiram diferentes tolerâncias a variações da salinidade. Em um estudo posterior, MOREIRA & VERNBERG (1978) atribuíram essa diferença à capacidade regulatória das duas populações a diferentes níveis de contaminação apresentados pelos dois locais. A população de copépodos do Canal de São Sebastião apresentou capacidade de regulação metabólica em uma extensa faixa de salinidades quando foi utilizada água do Canal. Quando foi utilizada água de Santos, ambas as populações apresentaram uma redução acentuada da

capacidade de regulação em salinidades extremas. Análises de chumbo e níquel realizadas por MOREIRA & VERNBERG (1978) em uma amostra de água coletada em Santos, indicaram valores de 0,27 mg/L de chumbo e de 0,2 mg/L de níquel. Dados recentes obtidos por MOREIRA et al. (1989) para o Canal de São Sebastião indicaram valores $< 0,004$ e $0,006$ mg/L de chumbo e níquel, respectivamente.

Esse talvez seja o primeiro estudo realizado no Brasil, onde foi possível demonstrar o efeito sinérgico da toxicidade de amostras ambientais e salinidades extremas (15 a 55‰), sobre a capacidade de regulação metabólica de uma espécie eurialina. Considerando-se a alta salinidade apresentada pela água de produção, aliada à presença de várias substâncias químicas em concentrações elevadas, é possível que ocorram efeitos deletérios sobre espécies eurialinas e estenoalinas do plâncton, caso as mesmas sejam atingidas pela pluma do efluente na sua zona de mistura. No entanto, somente estudos de campo, aliados a testes laboratoriais, poderão confirmar essa hipótese para a água de produção lançada no Canal de São Sebastião.

Resultados obtidos por NEFF & SMITH (1998), sobre os efeitos da pluma da água de produção descartada de plataformas localizadas no Mar de Java na Indonésia, mostraram uma diminuição das comunidades fitoplanctônicas e zooplanctônicas do local. Em ambos os casos, os autores questionaram se esses efeitos foram devidos às características físicas ou tóxicas da água de produção. Um estudo de avaliação de risco também mostrou que o zooplâncton local poderia ser adversamente afetado caso ele fosse atingido pela pluma do efluente. Cabe ressaltar que o efluente estudado apresentou baixa salinidade em relação a água do mar e que devido à baixa densidade, a água de produção foi diluída vagarosamente. Modelagens matemáticas também mostraram que a diluição inicial da água de produção após seu descarte oceânico variou de 12 a mais que 100 vezes, dependendo da taxa de descarte e das condições oceanográficas locais.

O primeiro impacto da água de produção descartada no Canal de São Sebastião poderá ser devido à alta salinidade, já que o efluente não será diluído antes do seu lançamento. A extensão estimada desse impacto se dará aproximadamente até 10 metros de distância dos difusores do emissário submarino, onde estima-se a ocorrência de uma diluição de cerca de 500 vezes.

Embora não tenha sido objetivo do presente estudo avaliar o efeito integrado da alta salinidade com os outros compostos presentes na água de produção, todas as amostras tiveram sua salinidade ajustada, estudos desenvolvidos por outros pesquisadores indicam a presença de efeitos sinérgicos e antagônicos como resultado da interação entre salinidade, compostos químicos e especiação química de alguns compostos.

DE LISLE & ROBERTS (1988) estudaram o efeito da variação da salinidade sobre a toxicidade de diferentes espécies químicas do cádmio utilizando o misidáceo *M. bahia* em testes de toxicidade aguda. A toxicidade do cádmio total foi menor em salinidades mais elevadas, enquanto sob a forma de Cd^{2+} a toxicidade foi maior em salinidades extremas.

SCHULER & HEAGLER (1998) estudaram o efeito da salinidade e do íon cloreto na bioacumulação do cádmio sobre o peixe *Menidia beryllina*. A biodisponibilidade de metais na água é determinada pela espécie química dominante e em águas com altas concentrações de cloreto, o cádmio é complexado formando íons complexos com os íons cloreto disponíveis. A exposição de *M. beryllina* a 35 µg/L de cádmio em salinidades de 0 a 20‰, resultaram na acumulação de 7,73 µg/g de Cd na salinidade mais baixa e de 1,50 µg/g de Cd na salinidade mais alta. Esses resultados foram consistentes com um modelo matemático proposto onde na salinidade zero somente 11,3% de cádmio apresenta-se sob a forma de $CdCl^+$ e na salinidade de 20‰, 51% do cádmio apresenta-se como $CdCl^+$, 32% como $CdCl_2$ e 6,9% como $CdCl_3^-$. Essas formas de cádmio não são consideradas biodisponíveis e reforçam a hipótese de que a tomada de Cd por *M. beryllina* é dependente da complexação química do Cd com íons cloreto.

PALANCH & SANTOS (1996) estudaram o efeito combinado da variação da salinidade e cobre sobre o metabolismo respiratório do caranguejo *Ucides cordatus*. Em condições extremas de salinidade de 9 e 34‰, em relação a salinidade isosmótica do animal (26‰), os organismos apresentaram um aumento significativo do consumo de oxigênio.

Estudos realizados por TOLEDO & SANTOS (1996) através da exposição de *U. cordatus* ao benzeno e a diferentes salinidades, indicaram alteração das taxas de consumo de oxigênio. A exposição ao benzeno alterou o consumo, elevando-o em animais expostos a 9S e diminuindo-o em caranguejos expostos a 26 e 34S.

Os diferentes padrões de resposta exibidos pela mesma espécie indicam um modo de ação distinto apresentado pelas duas classes de compostos, metais e orgânicos quando os organismos foram submetidos a condições de estresse osmótico.

AIDAR et al. (1994) avaliaram o efeito da água de produção tratada com peróxido de hidrogênio, sem ajuste prévio da salinidade, sobre o crescimento da microalga *S. costatum*. Os autores observaram efeitos sinérgicos entre a toxicidade do efluente e a salinidade sobre o crescimento da alga e concluíram que a disposição do efluente com alta salinidade no Canal de São Sebastião poderá vir a causar efeitos deletérios sobre a biota local.

Enquanto a alta salinidade da água de produção pode causar efeitos tóxicos sobre a biota, o desequilíbrio iônico entre seus componentes, presente através de um excesso ou deficiência dos seus íons, também pode ser uma fonte de toxicidade aos organismos.

As análises físico-químicas realizadas nas amostras brutas de água de produção do presente estudo mostraram esse desequilíbrio iônico nas amostras que não tiveram sua salinidade ajustada para a salinidade normal da água do mar como também naquelas onde foi feito ajuste da salinidade (Tabelas 28 e 33).

Na água de produção bruta não diluída foram medidas as concentrações de cloretos nas amostras de abril/ junho e julho de 96 e de cálcio somente na amostra de abril de 96. As concentrações de cloretos variaram de 37000 a 65200 mg/L, enquanto a concentração média para a água do Canal de São Sebastião é de 17700mg/L. A concentração de cálcio foi de 1800 mg/L, enquanto as concentrações consideradas normais para água do mar variam de 393 a 427 mg/L. Ambas as análises indicaram um excesso de cloretos (ânion) e cálcio (cátion) em relação as concentrações normais da água do mar (Tabela 28).

Nas amostras de água de produção de agosto/ outubro de 1997 e fevereiro/abril de 1998, diluídas com água destilada para ajuste da salinidade até 34‰, foram feitas medidas de cloretos, cálcio, estrôncio, magnésio e potássio. Os resultados obtidos indicaram um excesso de cloretos nas amostras de agosto/ outubro/97 e fevereiro/98, e uma deficiência na amostra de abril/98, em relação à concentração média de cloretos para as águas do Canal de São Sebastião. Os cátions cálcio e estrôncio apresentaram concentrações acima das concentrações normais da água do mar em todas as amostras. As concentrações de magnésio

foram próximas às concentrações normais da água do mar na amostra de agosto de 97 e deficientes em todas as outras. As concentrações de potássio foram deficientes em duas amostras e acima das concentrações consideradas normais, na última amostra (Tabelas 29 a 33).

PILLARD et al. (1996) determinaram os efeitos tóxicos de diferentes salinidades e de íons específicos, na sobrevivência do misidáceo *M. bahia* após 48h de exposição a salinidades variando entre 0 a 60‰. Fizeram também, manipulações dos íons potássio (K^+), magnésio (Mg^{++}), cálcio (Ca^{++}), estrôncio (Sr^{++}), sulfato (SO_4^-), bicarbonato (HCO_3^-), brometo (Br^-) e borato ($B_4O_7^-$). A salinidade nas soluções contendo diferentes concentrações dos íons específicos foi mantida a 31‰, através do ajuste das concentrações de sódio e cloreto. A sobrevivência dos misidáceos foi reduzida em soluções com baixas e altas salinidades. Em baixas salinidades a CL50; 48h foi de 3,9‰ e, em altas salinidades, a CL50 foi de 43‰. A sobrevivência de 100% dos organismos foi obtida em salinidades variando entre 7 e 40‰.

Os íons testados produziram três padrões de respostas sobre os misidáceos: toxicidade devida a um excesso e deficiência do íon, toxicidade devida somente a um excesso do íon e nenhuma toxicidade.

O primeiro padrão de toxicidade foi exibido pelos íons cálcio e potássio que causaram toxicidade tanto em altas, como em baixas concentrações. Para o cálcio, as concentrações responsáveis por elevadas mortalidades foram maiores que 1202 mg/L e menores que 120 mg/L e para o potássio foram de 3910 e 117mg/L.

O segundo padrão de toxicidade foi exibido pelos íons magnésio, bicarbonato, borato ($B_4O_7^-$) e sulfato que apresentaram toxicidade ao misidáceo somente na presença de um excesso de íons. Os íons estrôncio e brometo (Br^-) não causaram toxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

DOUGLAS & HORNE (1997) realizaram um estudo similar com *M. bahia* em testes de toxicidade aguda com 96h de duração e incluíram experimentos para verificar quais íons seriam necessários para a sobrevivência através da variação da salinidade sobre a tolerância da espécie, após exposição a diferentes concentrações iônicas. Os íons estudados foram o Ca, K, Mg e Br em salinidades variando de 10 a 35‰. Somente a mistura dos íons Ca, Mg, K e

Br nas concentrações encontradas na água do mar resultaram na sobrevivência completa dos misidáceos após 96 h. Os íons Ca, Mg e K apresentaram efeito tóxico em concentrações altas e baixas. O íon Br não apresentou efeito tóxico significativo em nenhuma das concentrações testadas entre 5 a 480 mg/L, embora na concentração de 5mg/l tenha ocorrido mortalidade em níveis não significativos, entre 20 a 40%. Em salinidades baixas houve diminuição da tolerância de *M. bahia* a um excesso dos íons K, Ca e Mg e em salinidades altas ocorreu aumento da tolerância a um excesso de cálcio e magnésio.

Ambos os trabalhos mostraram a importância do desequilíbrio iônico na sobrevivência do misidáceo *M. bahia*, embora tenha ocorrido divergência entre os resultados relativos ao magnésio.

A ocorrência do misidáceo *M. juniae* foi registrada, até hoje, apenas em ambientes com salinidade entre 32 a 35‰. No entanto, em experimentos laboratoriais conduzidos por NIPPER et al. (1991) foi observada a sobrevivência de mais de 80% dos organismos nas salinidades de 21 a 45‰, após um período de 96h. A CL50; 96h para baixas salinidades foi entre 18 e 21‰ e para altas salinidades foi > 45‰. Esses resultados mostraram o comportamento eurialino da espécie quando submetida a estresse osmótico sob condições laboratoriais.

A comparação da tolerância a variações da salinidade apresentada por *Mysidopsis bahia* e *Mysidopsis juniae* mostra que as duas espécies apresentam capacidade de regulação osmótica em altas e baixas salinidades, embora *M. juniae* apresente menor tolerância a salinidades baixas. Essa diferença pode ser explicada pelo tipo de ambiente onde as espécies ocorrem. *M. bahia* é uma espécie estuarina e a presença de *M. juniae* só foi registrada até hoje em ambientes marinhos.

Embora não existam estudos com *M. juniae* referentes a sua tolerância a um excesso ou deficiência de íons, é possível que essa espécie apresente respostas similares às respostas apresentadas por *M. bahia*. Se essas suposições forem verdadeiras, as concentrações de cálcio e potássio encontradas nas amostras de água de produção de agosto/outubro/97 e fevereiro/abril/98 seriam responsáveis por parte dos efeitos tóxicos apresentados pelas amostras de acordo com os estudos de PILLARD et al. (1996) e DOUGLAS & HORNE (1997). Em relação ao magnésio, de acordo com os resultados obtidos por PILLARD et al. (1996) as concentrações deficientes desse íon não estariam afetando a sobrevivência dos

misidáceos, mas se considerarmos os estudos de DOUGLAS & HORNE (1997) as deficiências do magnésio poderiam estar sendo responsáveis por efeitos tóxicos.

As análises de outros constituintes inorgânicos na água de produção indicaram a presença de altas concentrações de alguns metais em relação às concentrações na água do mar. O bário, o boro, o chumbo, o cobre, o ferro e o zinco foram encontrados em concentrações cerca de 10 a 1000 vezes mais elevadas que as concentrações normalmente encontradas na água do mar, em pelo menos uma das amostras não diluídas de água de produção (Tabela 28).

Nas amostras diluídas de água de produção (Tabela 33) foram feitas análises de bário, chumbo, cobre, ferro e zinco. Nessas amostras, as concentrações de bário e ferro permaneceram muito elevadas, enquanto as concentrações de chumbo, cobre e zinco foram cerca de 10 a 400 vezes mais elevadas que as concentrações da água do mar, em pelo menos uma das amostras analisadas.

As concentrações individuais de alguns desses metais podem ser responsáveis por efeitos letais e subletais sobre os organismos testados. Comparado-se os resultados da Tabela 33 com o Anexo 1, para o chumbo, a concentração de 0,3 mg/L medida na amostra de agosto de 1997 pode ter sido responsável por parte do efeito tóxico observado para a bactéria *V. fisheri*. Para o cobre as concentrações de 0,15 e 0,04 mg/L medidas nas amostras de agosto e outubro de 1997 podem ter ocasionado efeitos deletérios sobre *V. fisheri* e *M. juniae*. Embora não existam dados na literatura sobre os efeitos subletais do cobre sobre *L. variegatus*, concentrações de 0,014 a 0,029 mg/L parecem ter sido responsáveis por efeitos sobre os gametas e embriões dos ouriços *A. punctulata* e *S. purpuratus*. Para o zinco todas as concentrações medidas nas amostras de agosto/ outubro de 97 e fevereiro/abril de 98 podem ter sido responsáveis por parte dos efeitos letais e subletais observados para *V. fisheri*, *M. juniae* e *L. variegatus*.

O bário foi um dos metais encontrados em concentrações muito elevadas nas amostras diluídas de água de produção que variaram de 10,6 a 45,2 mg/L (Tabela 33). Os altos valores encontrados são devidos aos resíduos dos fluidos de perfuração que possuem como um dos seus componentes principais a barita ou sulfato de bário (BaSO₄). Até recentemente, acreditava-se que o bário apresentava pouca toxicidade aos organismos marinhos devido a sua baixa solubilidade na água do mar, pois em contato com o sulfato

presente na mesma, seria precipitado sob a forma de barita tornando-se não biodisponível (API, 1995; SPANGENBERG & CHERR, 1996).

Estudos de campo desenvolvidos por CHERR & FAN apud API (1995) mostraram a bioacumulação do bário por mexilhões mantidos a distâncias de 1 e 10 metros dos difusores de um emissário de água de produção, com altas concentrações de bário. As concentrações de bário presentes nos tecidos foram de 0,7 e 1,04 mg/Kg de peso úmido, em relação a concentração nos tecidos dos organismos controle mantidos em um local distante da pluma do efluente, menor que 0,48 mg/Kg de peso úmido.

Estudos laboratoriais demonstraram que o bário dissolvido ou coloidal pode apresentar toxicidade a fases de vida sensíveis de organismos marinhos. Nesses estudos foi observado que concentrações de 0,3 e 0,4 mg/L de bário dissolvido inibiram o desenvolvimento embrionário do mexilhão *Mytilus californianus* em testes laboratoriais com 48h de duração, particularmente, a diferenciação celular da fase de pré-gastrula. Os experimentos foram realizados com acetato de bário, pois é a única forma de bário que não precipita na água do mar, em concentrações menores ou iguais a 10 mg/L. Em concentrações maiores que 10mg/L a toxicidade diminuiu com o aumento das concentrações, sugerindo que o íon bário dissolvido, e não partículas de barita, foram responsáveis pelos efeitos tóxicos. Esses resultados também são consistentes com o prognóstico de que a complexação do bário com ácidos orgânicos diminui a taxa de precipitação do bário na água do mar (CHERR & FAN apud API, 1995).

SPANGENBERG & CHERR (1996) estudaram os efeitos do bário sobre o desenvolvimento embrio-larval do bivalve *Mytilus californianus*. As larvas véliger exibiram desenvolvimento anormal e retardado após 48h de exposição a concentrações nominais de acetato de bário variando entre 0,2 e 0,8 mg/L. Em concentrações nominais menores que 0,2 mg/L e maiores que 0,9 mg/L (que correspondem a concentrações medidas de 0,2 e 0,6 mg/L) não foram observados efeitos significativamente diferentes do controle.

CHERR, G. N. & FAN, T. W.-M. (1993). Chronic toxicological effects of produced water on reproduction and development in marine organisms. p.60-66. In: R.J. Schnitt, ed., University of California Southern California Educational Initiative. Program Overview. March 1993. Report to the U.S. Dept. of the Interior, Minerals Management Service, Pacific OCS office, Camarillo, Ca apud API (1995). *Barium in produced water: fate and effects in the marine environment*. Publication number 4633.

Em concentrações maiores que 1 mg/L foi observada a presença de um precipitado nos frascos-teste. A presença desse precipitado provavelmente foi devida à formação de sulfato de bário. A CE50 obtida foi de 0,189 mg/L e a CENO de 0,1 mg/L.

Esses resultados sugerem que a diluição da água de produção, contendo altas concentrações de bário, no corpo receptor pode resultar na rápida precipitação do íon bário na presença de altas concentrações do sulfato da água do mar, formando um precipitado na forma de $BaSO_4$ não disponível biologicamente. Os níveis de bário seriam rapidamente diminuídos até 1 mg/L e próximo dessa concentração, parte permaneceria solúvel e portanto, biodisponível. Aliado a isso, parte do bário presente na água de produção está complexado a várias moléculas orgânicas. Após a mistura com a água do mar, esses compostos podem se dissociar liberando a forma iônica do bário que estaria biodisponível.

No presente estudo, as concentrações nominais de bário observadas nas concentrações de água de produção de agosto de 97 e fevereiro/abril de 98, podem ter sido responsáveis pelos efeitos subletais sobre o desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*. Elas estão na mesma faixa de concentrações obtidas por CHERR & FAN apud API (1995) e SPANGENBERG & CHERR (1996) de 0,2 a 0,6 mg/L de bário, responsáveis pelo desenvolvimento anormal dos embriões de *M. californianus*.

Os valores das CE50; 24-28h de água de produção obtidas para os testes embrio-larval com *L. variegatus* nas amostras de agosto de 97 e fevereiro/ abril de 98 foram de 1,09%, 1,64% e 0,65%. Os valores equivalentes das concentrações nominais de bário nessas diluições de água de produção foram de 0,52 mg/L, 0,29mg/L e 0,65mg/L de bário. Esses resultados indicam que o bário pode ter sido responsável pela toxicidade apresentada pelas amostras de água de produção sobre o desenvolvimento embrionário de *L. variegatus*.

Outros compostos que podem ter contribuído para a toxicidade da água de produção são representados pelo nitrogênio amoniacal, sulfeto e compostos orgânicos.

O nitrogênio amoniacal ou amônia total medida nas amostras brutas e diluídas da água de produção apresentaram concentrações muito elevadas (Tabelas 5, 28, 29, 30, 31 e 32). Essas concentrações foram muito superiores aos valores responsáveis por efeitos subletais nos organismos testados considerando-se que a toxicidade da amônia é devida a sua fração tóxica representada pela amônia não ionizada (NH_3). Para a bactéria *V. fisheri* a

concentração de amônia não ionizada responsável por causar diminuição da luminescência em 50% das bactérias expostas é de cerca de 1,49 mg/L (SCHIFF et al., 1992). Para *M. juniae* uma concentração de 0,87 mg/L de amônia não ionizada (NH₃), equivalente a 15,6 mg/L de amônia total, foi responsável pela diminuição significativa do crescimento desse misidáceo em testes de toxicidade crônica de curta duração, em um estudo conduzido por BADARÓ-PEDROSO (1993). ZAMBONI (1993) obteve valores das CE50; 80min. e CE50; 24h de 1,89mg/L e 0,12 mg/L de amônia não ionizada nos testes de fecundação e embriolarval com o ouriço *L. variegatus*, respectivamente. Para os testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata* foram obtidos valores das CE50; 60min e CE50; 48h de 19,58 e 1,48 mg/L de amônia total e de 0,6 e 0,058 mg/L de amônia não ionizada, respectivamente (CARR, com. pes. 1997)⁹.

Os estudos de identificação da toxicidade, apresentados no segundo capítulo do presente projeto, mostraram que a adição da alga *Ulva* sp às amostras de água de produção foram responsáveis pela remoção de grande parte da amônia presente. Nos testes de toxicidade conduzidos com essas amostras houve redução significativa da toxicidade, indicando que a amônia é responsável por parte da toxicidade apresentada pela água de produção.

As concentrações de sulfeto nas amostras brutas de água de produção foram elevadas e variaram de 4,38 a 80 mg/L. Embora o tratamento químico com peróxido de hidrogênio tenha sido muito eficiente na redução desse composto, os testes de toxicidade realizados com amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2) não mostraram redução da toxicidade na mesma proporção indicando que o sulfeto apesar de estar presente em altas concentrações, provavelmente não contribui para a toxicidade apresentada pelas amostras (Figura 19).

Em alguns estudos realizados sobre a toxicidade da água de produção, os compostos orgânicos foram considerados como uma das classes de compostos responsáveis por parte da toxicidade apresentada a vários organismos (SCHIFF et al., 1992; STRØMGREN et al., 1995; FLYNN et al., 1996).

⁹CARR, R. S. (1997). (USGS, BRD, CERC, Marine Ecotoxicology Research Station, TAMU-CC, Center for Coastal Studies, Corpus Christi, TX, USA). *Comunicação pessoal*.

No presente estudo foram realizadas análises de óleos e graxas, fenol e BTEX. Segundo BROWN et al. (1988, 1992) a medida de óleos e graxas expressa o conteúdo de hidrocarbonetos de petróleo (compostos não polares) e ácidos orgânicos (compostos polares) presentes na água de produção. Os hidrocarbonetos de petróleo são constituídos pelos compostos alifáticos, aromáticos mononucleares e polinucleares. Análises químicas realizadas em amostras de água de produção de diferentes plataformas do Mar do Norte mostraram que entre os hidrocarbonetos aromáticos mononucleares, os mais abundantes são o benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e C-3 e C-4 benzenos. Eles estão presentes em concentrações variando de 10 a cerca de 40mg/L. Entre os aromáticos polinucleares, o naftaleno é o hidrocarboneto mais abundante e em conjunto com os outros aromáticos polinucleares são encontrados em concentrações variando de 0,5 a 7mg/L. Em relação aos ácidos orgânicos, os ácidos graxos voláteis foram a principal classe de orgânicos presentes na água de produção e o ácido acético foi o mais abundante (FLYNN et al., 1996).

As análises de óleos e graxas, nas amostras brutas e diluídas de água de produção do presente estudo, mostraram concentrações muito elevadas desse parâmetro. As concentrações nas amostras brutas variaram de 32 a 100 mg/L, enquanto nas amostras diluídas foram obtidos valores variando de 12 até 264 mg/L. O limite máximo permitido de acordo com a Legislação Federal é de 20 mg/L, enquanto a Legislação Internacional recomenda o valor de 40mg/L como o limite máximo permitido em efluentes provenientes de plataformas de petróleo (BRASIL, 1986; NIHOUL & DUCROTOY, 1994).

Nas amostras diluídas de água de produção bruta as concentrações de benzeno variaram de <0,008 a 3,83 mg/L, tolueno de <0,008 a 6,61mg/L, de etilbenzeno de <0,006 a 1,43 mg/L e de xileno de <0,010 a 9,71 mg/L.

Para *V. fisheri* e *M. juniae* valores das CE50 e CL50 para o benzeno responsáveis por efeitos letais foram de 27,5mg/L e 17,36 mg/L, respectivamente. Para o teste de fecundação com o ouriço *S. purpuratus* o valor de CE50; 80 min. para essa espécie foi de 9,8 mg/L (BADARÓ-PEDROSO & SANTOS, dados não publicados; SCHIFF et al., 1992). Para o tolueno, o único dado encontrado foi referente a *V. fisheri* que apresentou um valor de CE50; 15 min. de 19,7 mg/L (Anexo 1).

Os poucos dados disponíveis sobre a toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos mononucleares (BTEX) para as espécies utilizadas no presente estudo indicaram que as



concentrações desses compostos, provavelmente, não foram responsáveis pelos efeitos tóxicos apresentados pelas amostras de água de produção. No entanto, existe a possibilidade de outros hidrocarbonetos de petróleo como os aromáticos policíclicos, não analisados no presente estudo, terem contribuído com a toxicidade observada.

Dados da literatura mostram que os hidrocarbonetos de petróleo podem contribuir com a toxicidade da água de produção, mas não constituem a principal classe de compostos responsáveis pelos efeitos observados.

Estudos realizados por SCHIFF et al. (1992) mostraram uma forte correlação entre a concentração dos hidrocarbonetos de petróleo totais (14 mg/L) e a toxicidade apresentada por uma das amostras de água de produção no teste agudo com *M. bahia*. Para essa amostra a CL50; 96h foi de 4,9% de água de produção. Os autores concluíram que parte da toxicidade foi devida aos hidrocarbonetos de petróleo.

JOHNSEN et al. (1993) realizaram um estudo sobre a toxicidade da água de produção artificial preparada em laboratório. Eles simularam a composição da água de produção através da mistura dos principais constituintes considerados suspeitos de ocasionar toxicidade. Os componentes selecionados foram: óleo (representado por hidrocarbonetos aromáticos dissolvidos), fenóis e alquil-fenóis, produtos químicos de produção (inibidores de corrosão e floculantes) e metais pesados (Cu, Cr, Zn, Hg, Pb, Sr e Ba). A toxicidade da mistura foi medida pelo teste Microtox e os efeitos dos componentes isolados e de suas interações foram identificados. Os resultados mostraram que os aromáticos contribuíram com a maior parte da toxicidade e entre eles, os naftalenos foram o grupo mais tóxico, enquanto os voláteis benzeno, tolueno e xileno e a fração com 3 a 6 anéis aromáticos contribuíram em menor proporção. Os resultados também mostraram que os alquil-fenóis contribuíram significativamente para a toxicidade total da água de produção, sendo os C₃-fenóis os compostos mais tóxicos. Os metais pesados e os produtos químicos de produção foram os que menos contribuíram para a toxicidade total.

STRØMGREN et al. (1995) realizaram diferentes testes de toxicidade com quatro organismos e amostras de água de produção provenientes de três plataformas de petróleo. Os hidrocarbonetos de petróleo foram parcialmente responsáveis pela toxicidade de somente uma das amostras nos testes com a alga *S. costatum* e a ostra *C. gigas*. Os autores concluíram

que o restante da toxicidade poderia ser relacionada a presença de fenóis, metais pesados e aos principais íons responsáveis pela salinidade e propriedades osmóticas da água.

No estudo conduzido por FLYNN et al. (1996) com amostras de água de produção provenientes de quatro plataformas do Mar do Norte foram realizados testes de toxicidade aguda com a bactéria *V. fisheri* (Microtox) e o copépodo *Acartia tonsa*. Os resultados indicaram não haver correlação significativa entre as concentrações de BTEX e a toxicidade para *V. fisheri* e *A. tonsa*, enquanto para os fenóis foram obtidas boas correlações para os dois testes de toxicidade. Os resultados sugeriram que os fenóis podem ser considerados como uma das principais fontes de toxicidade das amostras testadas.

De acordo com as análises de fenóis, realizadas nas amostras brutas e diluídas de água de produção no presente estudo, as concentrações variaram de <0,31 a 3,0 mg/l nas amostras brutas e de 0,063 a 0,96 mg/L, nas amostras diluídas não tratadas. A comparação desses valores com as concentrações responsáveis por causar efeitos letais e subletais sobre *V. fisheri*, *M. bahia* e *A. punctulata*, na faixa de 10 a >100mg/L de fenol, mostram que para essas espécies é pouco provável que o fenol nas concentrações medidas tenha contribuído com a toxicidade observada.

O tratamento das amostras de água de produção através da oxidação química de fenóis com peróxido de hidrogênio, embora seja eficiente para a redução de fenóis da amostra, não apresentou redução da toxicidade na mesma proporção quando foram comparados os resultados dos testes de toxicidade realizados com as amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2). Esta é uma indicação de que o fenol não estaria contribuindo, de forma significativa, para a toxicidade total das amostras de água de produção utilizadas no presente estudo (Figura 19).

No entanto, a simulação do tratamento completo da água de produção que inclui a flotação seguida da oxidação química mostrou redução da toxicidade em algumas das amostras indicando que a classe de compostos removidos através do processo de flotação, ou seja os óleos e graxas e parte dos sólidos presentes, podem ser responsáveis por parte da toxicidade observada (Figura 19).

É importante ressaltar, mais uma vez, que a medida química do parâmetro óleos e graxas não abrange somente os hidrocarbonetos de petróleo, mas também os ácidos

orgânicos. Segundo BRENDEHAUG et al. (1992) os ácidos orgânicos são encontrados em altas concentrações na água de produção, mas não apresentam risco ambiental devido a sua baixa toxicidade. Dessa forma, na redução de óleos e graxas após o tratamento completo da água de produção estão incluídos os hidrocarbonetos de petróleo e os ácidos orgânicos. A redução de óleos e graxas foi de cerca de 81,8% para a amostra de agosto/97, de 47,6% para a amostra de outubro de 97, de 12,5% para a amostra de fevereiro/98 e de 33% para a amostra de abril/98 (Tabelas 29,30,31,32), mas nem sempre essa redução foi acompanhada da redução da toxicidade.

Embora o processo de flotação também tenha sido responsável pela redução significativa de sólidos, como os sólidos suspensos totais e voláteis, a redução das concentrações do nitrogênio amoniacal também foi observada e, provavelmente, foi devida à volatilização desse composto.

Embora tenha ocorrido redução da toxicidade nas amostras submetidas ao tratamento completo da água de produção, essa redução variou entre as amostras e testes de toxicidade. Essa variação pode ter ocorrido devido à alta complexidade da água de produção e às diferenças de sensibilidade entre os métodos utilizados.

Em uma amostra complexa como a água de produção, as diferentes substâncias presentes podem interagir produzindo efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos e essa interação é governada por uma série de fatores físicos e químicos como pH, salinidade, matéria orgânica e especiação que interferem na complexação e biodisponibilidade dos compostos presentes.

Em um estudo conduzido por BUIKEMA et al. (1981) utilizando um efluente artificial de refinaria de petróleo e testes de toxicidade aguda e crônica com *M. bahia* foi possível observar que a mistura dos principais componentes do efluente representados por nitrogênio amoniacal, cromo, óleos e graxas, fenol, sulfeto, sólidos em suspensão e zinco resultou em efeito sinérgico dos constituintes, ou seja, a toxicidade final da mistura artificial foi maior do que a soma das toxicidades individuais de cada componente.

Uma outra classe de substâncias, os aditivos químicos adicionados durante o processo de produção de petróleo, não foram quimicamente analisados no presente estudo, mas também podem estar contribuindo com a toxicidade das amostras testadas. De acordo

com informações da PETROBRÁS os aditivos usualmente utilizados nas plataformas de petróleo são representados por inibidores de corrosão (bissulfito de amônio) e de incrustação (poliacrilatos), desemulsificantes (compostos a base de óxido de etileno e propileno), antiespumantes (óleo de silicone), floculantes (polieletrólitos) e biocidas (glutaraldeído associado com amônio quaternário).

Devido à toxicidade apresentada pelo biocida à base de glutaraldeído e o inibidor de corrosão à base de bissulfito de amônio, esses produtos estão sendo gradativamente substituídos por compostos menos tóxicos, como o bissulfito de sódio em substituição ao bissulfito de amônio.

Em relação aos antiespumantes à base de óleo de silicone PADRÓS et al. (1999) não observaram efeitos deletérios sobre uma comunidade microbiológica natural, em um estudo de mesocosmos. BRENDEHAUG et al. (1992) encontraram valores de CE50 em testes de toxicidade aguda com *S. costatum*, *Artemia* sp e *V. fisheri* (Microtox) de 120mg/L, 150mg/L e 9 mg/L para cada uma das espécies testadas. No entanto, não podemos afirmar se esses antiespumantes são do mesmo tipo dos utilizados pela PETROBRÁS.

Dados sobre a toxicidade de floculantes e inibidores de incrustação indicam valores de CE50 para *S. costatum*, *Artemia* sp e *V. fisheri* maiores que 1000 mg/L para o floculante e entre 60 a >1000 mg/L para o inibidor, de corrosão (BRENDEHAUG et al., 1992).

Os resultados do presente estudo indicaram várias classes de contaminantes como sendo contribuintes potenciais para a toxicidade da água de produção, mas não foi possível identificar e quantificar a contribuição de cada grupo de compostos na toxicidade total do efluente. Nesse sentido, o assunto abordado no segundo capítulo complementarará essas informações e auxiliará na interpretação dos resultados obtidos.

4. CAPÍTULO II
IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DO USO DE
FRACIONAMENTOS FÍSICOS E QUÍMICOS

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

Os estudos de avaliação e identificação da toxicidade de efluentes surgiram em decorrência da dificuldade em se atingir níveis aceitáveis de toxicidade, estabelecidos na legislação, em diversos tipos de efluentes nos Estados Unidos. Na realidade eles são um componente de um trabalho mais amplo direcionado à avaliação e redução da toxicidade de efluentes. Apresentam como objetivo principal a determinação das medidas necessárias à remoção da toxicidade de efluentes ou de sua manutenção em níveis aceitáveis (MOUNT & ANDERSON-CARNAHAN, 1988; FAVA et al., 1989; BOTTS et al., 1989). O conceito de avaliação e redução da toxicidade de efluentes foi criado em meados da década de 80 e desde então tem sido aplicado com sucesso (MCCULLOCH et al., 1998)

Para o estabelecimento das medidas necessárias, que incluem a modificação ou implantação de sistemas de tratamento do efluente, à diminuição da toxicidade em níveis aceitáveis é necessário o conhecimento das fontes responsáveis pela toxicidade, através da realização de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade (AIT).

Um estudo de AIT é dividido tradicionalmente em três fases. A primeira fase é a caracterização de propriedades físicas e químicas dos contaminantes presentes no efluente, através de manipulações ou fracionamentos, seguidos de testes de toxicidade. Cada fracionamento realizado é direcionado a alterar as propriedades dos compostos ou retê-los tornando-os biologicamente indisponíveis. Os grupos de contaminantes que podem ser indisponibilizados nessa fase são os voláteis, material particulado, metais bivalentes, oxidantes, e orgânicos não polares. Os testes de toxicidade realizados antes e após cada fracionamento indicam a presença ou não desses grupos através da redução ou não da toxicidade. A descrição detalhada dos métodos para a realização dessa fase com efluentes lançados em ambientes de água doce é apresentada em MOUNT & ANDERSON-CARNAHAN (1988) e NORBERG-KING et al. (1991a).

A segunda fase é direcionada a identificação de compostos presentes nos grupos de contaminantes determinados na primeira fase. Nesta fase, métodos analíticos são utilizados após a recuperação, ou eluição, dos compostos retidos em colunas de resinas específicas, como a resina da coluna de C18 e resinas de troca iônica. Diferentes valores de pH são usados para revelar substâncias que apresentam biodisponibilidade dependente do pH. A descrição detalhada dos métodos para a realização dessa fase com efluentes lançados em água doce é apresentada em MOUNT & ANDERSON-CARNAHAN (1989).

A terceira fase, de confirmação de compostos identificados na segunda, apresenta métodos gerais como na primeira. A combinação de todos os resultados gerados ou soma de evidências possibilita confirmar os compostos sob suspeita. A descrição detalhada dos métodos para a realização dessa fase com efluentes lançados em ambientes de água doce é apresentada em MOUNT (1989).

Antes da publicação pela Agência de Proteção Ambiental Americana dos manuais citados anteriormente, contendo os métodos para a realização das três fases de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade, o primeiro trabalho onde foi demonstrada a utilidade do uso de fracionamentos para isolar a causa da toxicidade em efluentes de água doce e marinhos foi o de WALSH & GARNAS (1983).

Devido à reconhecida utilidade apresentada por esses métodos desde então eles têm sido utilizados com a maior variedade possível de efluentes, enquanto novos procedimentos têm sido desenvolvidos.

DURHAN et al. (1990) descreveram a metodologia para a extração e concentração de compostos orgânicos não polares, através da eluição de uma coluna de C18 com metanol, seguida da análise química das frações obtidas pelo método de cromatografia gasosa e espectrografia de massa. Eles demonstraram a eficiência do método e, através das frações obtidas, seguidas da realização de testes de toxicidade, identificaram os compostos responsáveis pela toxicidade.

HALL & MIRENDA (1990) apresentaram os diversos procedimentos de fracionamento disponíveis, bem como uma lista de organismos utilizados em estudos de identificação da toxicidade efluentes.

Os métodos de fracionamentos físicos e químicos com efluentes de água doce, caracterizados por exibir toxicidade crônica, foram descritos pela primeira vez por NORBERG-KING et al. (1991b).

JOP et al. (1991) realizaram uma série de fracionamentos, subfracionamentos e análises químicas refinadas (cromatografia líquida de alta pressão- HPLC) para identificar a fonte de toxicidade de um efluente tratado. Os resultados indicaram a amônia não ionizada, como a principal responsável pela toxicidade do efluente.

ANKLEY & BUKHARD (1992) conduziram um estudo parcial de avaliação e identificação da toxicidade (fases 1 e 2) com o efluente de uma estação de tratamento de esgotos que recebia apenas tratamento primário. A presença de surfactantes foi indicada como a principal classe de compostos responsáveis pela toxicidade.

MOUNT & MOUNT (1992) apresentaram um método para o controle do pH de amostras em testes de toxicidade, pela manipulação da concentração de CO₂ atmosférico em câmaras fechadas.

BOELTER et al. (1992) observaram a presença de efeitos letais e subletais de amostras ambientais sobre o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Essas amostras foram coletadas nas proximidades do local de descarte de um efluente salino de uma plataforma de petróleo. Após a realização de vários fracionamentos físico-químicos das amostras, não foi possível identificar a origem da toxicidade através dos procedimentos disponíveis. Somente com a realização de análises químicas das amostras e correlação com os testes de toxicidade foi possível sugerir o desequilíbrio iônico dos íons cloreto, sódio e potássio, como o responsável pela toxicidade observada.

CURTIS et al. (1995) identificaram os principais compostos responsáveis pela toxicidade de um efluente de uma indústria de circuitos de automóveis e computadores, através

da realização das fases 1 e 2 de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade. Os compostos identificados foram um éster de fosfato e a amônia não ionizada. Através desses resultados foi possível identificar quais etapas do processo de produção geravam esses produtos e dessa forma, algumas modificações operacionais foram implementadas bem como a substituição de alguns insumos utilizados. Todas essas medidas em conjunto resultaram na diminuição da carga tóxica do efluente lançado no corpo receptor.

HOCKETT & MOUNT (1996) determinaram a eficiência do EDTA e do tiosulfato de sódio, na remoção da toxicidade de 16 metais ao microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Os resultados indicaram diferenças na remoção de metais pelos dois agentes quelantes testados. Essas diferenças podem ser úteis na identificação da toxicidade devido à presença de diferentes metais em amostras ambientais e de efluentes industriais e domésticos.

MORRIS et al. (1998) sugeriram a presença de desequilíbrio iônico do sódio e a presença de picos de cobre, como as possíveis causas da toxicidade de um efluente de uma refinaria de metais.

BESSER et al. (1998) propuseram o uso de zeólitas para reduzir a toxicidade de sedimentos de ambientes de água doce com altas concentrações de amônia. Avaliaram a eficiência de zeólitas na redução da amônia e metais presentes na água intersticial desses sedimentos. Os resultados indicaram que na presença de amônia e metais na mesma amostra, as zeólitas preferencialmente removiam amônia.

HO et al. (1997) conduziram um estudo com sedimentos marinhos de um local altamente contaminado com metais, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e bifenilas policloradas. Uma primeira série de fracionamentos realizados indicou a classe de orgânicos como os responsáveis pela toxicidade. Fracionamentos e análises cromatográficas subsequentes indicaram as bifenilas, os aromáticos polinucleares e compostos desconhecidos, como os principais responsáveis pela toxicidade observada.

Em amostras salinas, a descrição da metodologia para a realização da primeira fase de um estudo de avaliação e identificação de toxicidade foi feita por BURGESS et al. (1993a, 1996).

Outros estudos de caracterização e identificação da toxicidade de efluentes salinos ou de água doce, descartados em ambientes marinhos e estuarinos, foram conduzidos por BAYLEY et al. (1995), BURGESS et al. (1995); API (1996); SAUER et al. (1997) e THOMAS et al. (1999).

Todos mostraram-se eficientes para a identificação dos principais grupos de compostos, ou de compostos específicos, responsáveis pela toxicidade dos mais variados tipos de efluentes estudados.

BURGESS et al. (1997) desenvolveram uma metodologia com uma resina de troca de cátions, para amostras salinas em estudos de AIT. Essa pesquisa se mostrou de grande utilidade, já que o único procedimento disponível para o fracionamento de metais em amostras salinas era através da adição de EDTA. A quelação dos metais pelo EDTA é considerado um processo irreversível, pois impossibilita qualquer tentativa de recuperação e retorno do metal à amostra para verificar a presença de toxicidade. A possibilidade de retorno de metal à amostra é de grande vantagem pois possibilitaria análises químicas e fracionamentos adicionais.

HO et al. (1999) demonstraram a capacidade da alga *Ulva* sp em remover amônia e compostos orgânicos não polares de amostras salinas, bem como sua baixa eficiência na remoção de metais, em presença de amônia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos dessa etapa do projeto foram realizados nos laboratórios de ecotoxicologia marinha pertencentes ao U.S. Geological Survey/ Biological Resources Division localizados no Instituto de Ciências Marinhas da Universidade do Texas na cidade de Port Aransas e no Centro de Estudos Costeiros da Texas A&M University na cidade de Corpus Christi, Texas, Estados Unidos e no laboratório do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da Universidade de São Paulo localizado em São Sebastião, São Paulo.

O experimento com o ouriço *S. purpuratus* foi realizado no laboratório da empresa privada Mec Analytical Systems localizada em Tiburon, California.

4.2.1 Utilização de *Ulva* sp para redução de amônia

Experimentos com a alga *Ulva* sp foram realizados para verificar a sua eficiência na remoção de amônia das amostras de água de produção, visando a sua utilização como um dos métodos de fracionamento a ser utilizado no estudo de identificação da toxicidade do efluente.

Na data de realização do primeiro experimento, os procedimentos relativos a execução desse fracionamento ainda não haviam sido publicados e a única informação disponível era sobre a quantidade de alga utilizada por volume de amostra, 20g de alga por 80 ml de solução (CARR, com. pes. 1996)¹⁰.

¹⁰CARR, R. S. (1996). (USGS, BRD, CERC, Marine Ecotoxicology Research Station, TAMU-CC, Center for Coastal Studies, Corpus Christi, TX, USA). *Comunicação pessoal*.

Dessa forma, a alga *Ulva* sp foi utilizada em dois experimentos realizados em 4/12/96 e 5/2/97. O primeiro experimento foi planejado visando-se a obtenção de informações relativas à eficiência do procedimento em relação a quantidade de alga adicionada, tempo de permanência, salinidade e concentração do efluente. Através desse experimento foi possível estabelecer as condições experimentais mais adequadas. O segundo experimento foi feito seguindo-se as condições estabelecidas previamente e teve como objetivo verificar a eficiência do tratamento na redução da toxicidade da amostra, através do uso dos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata*.

As algas *Ulva lactuca* ou *Ulva fasciata* (Divisão Chlorophyta) foram coletadas na porção sul do quebra-mar localizado em Port Aransas, Texas (27° 50' N, 97° 40' W) nos dias 2/12/96 e 31/1/97 (Figura 29). Somente as algas apresentando coloração uniforme foram coletadas e colocadas em um balde sem água. No laboratório, localizado a poucos metros do local de coleta, as algas foram transferidas para um balde com água do mar e aeração suave. Elas foram mantidas à temperatura de 20±1°C, salinidade de 30±1‰ e fotoperíodo de 16 horas de luz até serem utilizadas nos experimentos.

Antes de cada experimento e quando as soluções já estavam preparadas, as algas foram lavadas com água do mar filtrada para a retirada de pequenos organismos e areia. A seguir elas foram secas com papel toalha e pesadas.

No primeiro experimento foram preparadas três concentrações de efluente não tratado com 21,3; 42,7 e 100% de água de produção. Nas concentrações de 21,3 e 42,7 a salinidade era de 30‰ e na concentração de 100% de água de produção a salinidade era de 70‰. Um volume de 80 ml de cada solução foi transferido para béqueres de 100 ml em duplicatas e a seguir, 10 e 20g de algas foram adicionadas. Três béqueres com 80 ml de efluente nas concentrações de 21,3; 42,7 e 100% de água de produção foram preparados sem adição de alga.

Medidas iniciais de oxigênio dissolvido, pH, amônia e temperatura foram realizadas em cada amostra de água de produção antes da adição das algas. O experimento teve duração de 6 horas e a cada 2 horas foram feitas medidas de pH e amônia.

No segundo experimento, com duração de 4 horas, foi utilizada a proporção de 20g de alga por 80 ml de amostra. Foram utilizadas amostras de água de produção bruta e tratada com peróxido de hidrogênio, diluídas com água destilada para obtenção de 30‰ de salinidade. A concentração das duas amostras foi de 44% de água de produção. Foram feitas medidas de pH e amônia antes da adição das algas e após 4h. No final do experimento, devido à presença de pequenos pedaços de alga em suspensão, as amostras foram centrifugadas a 2000X g durante 20 minutos e novas medidas de pH e amônia foram realizadas. A seguir, as amostras foram colocadas em frascos âmbar completamente cheios e mantidas a 4°C até sua utilização nos testes de toxicidade no dia 7/2/97.

Os testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata* foram realizados com amostras de água de produção não tratadas e tratadas com *Ulva* sp, para verificar a eficiência da adição das algas na remoção da toxicidade. As soluções-teste foram preparadas através de diluições seriadas feitas a partir das concentrações de 44% de água de produção bruta, bruta + *Ulva*, tratada com peróxido e tratada com peróxido + *Ulva*. As concentrações-teste foram de 0,08; 0,17; 0,34 e 0,68% de água de produção, com quatro réplicas cada. A água de diluição utilizada nos controles e no preparo das soluções-teste foi água do mar filtrada através de filtro millipore com 0,45µm. Os testes foram conduzidos à temperatura de 20±1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

No Brasil, foram realizados experimentos com *Ulva* sp para verificar sua eficiência na remoção de amônia de amostras de água de produção e de soluções de cloreto de amônia. Nesses experimentos a quantidade de alga por volume de amostra foi menor do que a proporção utilizada nos experimentos realizados nos Estados Unidos. Foram utilizadas 5g de *Ulva* sp por 60 ml de amostra de acordo com as recomendações de BURGESS et al. (1996) e as algas permaneceram imersas nas amostras por um período de 4 horas. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de 24±1°C em amostras com salinidade de 34±1‰.

As algas utilizadas nos experimentos foram coletadas na praia do Araçá em São Sebastião e na praia do Lázaro em Ubatuba e mantidas em uma balde com água do local, até sua chegada ao laboratório. No laboratório elas foram lavadas e transferidas para um frasco com água do mar filtrada e aeração suave. Foram mantidas à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo natural, por períodos de 1 e 4 dias, até sua utilização nos experimentos.

Foram realizadas duas coletas de água de produção em 5/2/98 e 1/4/98. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C por um e dois dias, respectivamente. No dia do experimento foi feito ajuste da salinidade até 34‰ através da adição de água destilada. Quando as amostras atingiram a temperatura de 25°C foram feitas medidas iniciais de pH, através de eletrodo específico, e de amônia com o uso de um Kit colorimétrico com capacidade de leitura na faixa de 0,25 a 5,0 mg/L. As mesmas medidas foram repetidas após 4h de imersão das algas.

A amostra de água de produção coletada em abril de 1998 foi utilizada em um teste de fecundação com *L. variegatus*, para verificar o efeito da adição da alga na remoção da toxicidade. Foram preparadas oito soluções-teste, com quatro réplicas cada, através de diluições seriadas feitas a partir das concentrações de 38,6% de água de produção bruta e tratada com *Ulva*. Os dois testes foram realizados à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e seguiram a metodologia descrita no capítulo 1 do presente estudo.

Nos experimentos com cloreto de amônio foram utilizadas concentrações de 5 e 10 mg/L de amônia. As soluções foram preparadas em balões volumétricos com água do mar filtrada. Controles com água do mar filtrada foram feitos para verificar o efeito da adição da alga sobre o pH. Medidas de pH e amônia foram realizadas antes e após 4h da adição de 5g de alga por 60 ml de amostra.

Dois testes de fecundação com *L. variegatus* foram realizados utilizando cloreto de amônio como substância-teste. Uma solução estoque de 10mg/L de amônia foi preparada em água do mar filtrada e as concentrações-teste foram feitas por diluição seriada a partir dessa solução. No teste realizado em 3/4/98 foram preparadas cinco concentrações-teste (0,312; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg/L) e no teste de 4/12/98 foram utilizadas as mesmas concentrações e a concentração de 10mg/L foi incluída. Quatro réplicas foram preparadas para cada concentração-

teste. Medidas de pH e oxigênio dissolvido foram realizadas em uma réplica de cada concentração e posteriormente, foi feito o cálculo de amônia não ionizada.

Cálculo de amônia não ionizada

Em soluções aquosas a amônia está presente sob as formas ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3). A presença de amônia não ionizada, que é a fração tóxica, em uma solução depende principalmente da temperatura e pH, e em menor proporção da salinidade. Concentrações de NH_3 aumentam com o aumento da temperatura e pH e diminuem em altas salinidades.

O cálculo da fração tóxica de amônia presente nas amostras de água de produção e soluções de cloreto de amônia foi feito utilizando-se as tabelas de BOWER & BIDWELL (1978) onde a porcentagem de NH_3 é obtida em função da temperatura, pH e salinidade das amostras no momento da medida de amônia total. O cálculo de NH_3 nas amostras brutas não diluídas de água de produção não foi possível, pois nas tabelas utilizadas, o valor máximo de salinidade apresentado é de 40‰.

4. 2. 2 Testes com *S. purpuratus* e amostras fracionadas através de ajuste de pH, filtração e coluna de C18

A amostra de água de produção coletada em outubro de 1998 foi tratada através de flotação e oxidação química com peróxido de hidrogênio, diluída com água destilada para ajuste da salinidade até 34‰ e, a seguir as três amostras geradas (AP1, AP2 e AP3) foram congeladas para realização de experimentos nos Estados Unidos.

Essas amostras foram utilizadas com três diferentes fracionamentos: ajuste de pH (6,5; 7,5 e 8,5), filtração e coluna de C18, seguidos do teste de fecundação com o ouriço *Strongylocentrotus purpuratus*.

A diminuição e o aumento do pH das amostras foi feito através da adição de HCl 0,12N e NaOH 0,1N, respectivamente. A metodologia para o fracionamento através da filtração e coluna de C18 foi de acordo com BURGESS et al. (1996).

Para cada um dos fracionamentos realizados foi utilizada somente uma solução teste, representada pela maior concentração da água de produção após ajuste de salinidade. O teste de fecundação com o ouriço *S. purpuratus* seguiu a metodologia da USEPA (1995) e consistiu na exposição de espermatozoides durante vinte minutos, seguida da adição da solução de óvulos e encerramento do teste após mais vinte minutos. O resultado foi expresso como valor de CE50; 40min.

4. 2. 3 Testes com peróxido de hidrogênio, EDTA e tiosulfato de sódio

Um teste de fecundação com *A. punctulata* foi realizado utilizando-se o peróxido de hidrogênio como substância-teste. Testes de fecundação com *L. variegatus* foram feitos com peróxido, EDTA e tiosulfato de sódio. Esses testes foram realizados para determinar qual faixa de concentrações é responsável por causar efeito tóxico sobre esses organismos.

4. 2. 4 Identificação da toxicidade da água de produção

O estudo de identificação da toxicidade da água de produção foi baseado nos procedimentos descritos em MOUNT & ANDERSON-CARNAHAN (1988, 1989) e BURGESS et al. (1993a, 1996).

Parte desse estudo foi realizado nos Estados Unidos com três amostras de água de produção coletadas em 25/02, 26/03 e 26/04 de 1997. Foram utilizadas amostras de água de produção bruta (AP1) e tratada com peróxido de hidrogênio (AP2) nos dois primeiros experimentos e no terceiro experimento foi incluída a amostra submetida ao tratamento completo, flotação seguida de oxidação química (AP3). Cada uma das amostras brutas e tratadas foi fracionada através de seis tipos de fracionamentos físico-químicos e a seguir foram utilizadas nos testes de fecundação com *A. punctulata*.

Cada estudo teve a duração de três dias. No primeiro dia, as amostras foram tratadas através de oxidação química e flotação. No segundo dia, parte das amostras foi fracionada através dos procedimentos com *Ulva* sp e coluna de C18. No terceiro dia, o restante dos fracionamentos foi realizado com cada uma das amostras e os testes de fecundação com a substância de referência (DSS), amostras não fracionadas e fracionadas foram realizados.

No Brasil, o estudo de identificação da toxicidade foi repetido com quatro amostras de água de produção coletadas em agosto e outubro de 1997, e fevereiro e abril de 1998. As amostras foram tratadas através dos processos flotação e da oxidação química com peróxido de hidrogênio, fracionadas através de seis procedimentos físico-químicos e a seguir utilizadas nos testes de fecundação com *L. variegatus*. O teste de desenvolvimento embrio-larval foi realizado apenas com a amostra coletada em abril de 1998.

Foram necessários quatro dias para a realização de cada estudo. No primeiro dia, as amostras foram coletadas e tratadas. No segundo dia, os frascos-teste foram etiquetados e organizados nas bandejas. No terceiro dia, as amostras de efluente bruto e tratado (AP1, AP2 e AP3) foram fracionadas através dos procedimentos de filtração, coluna de C₁₈ e adição de *Ulva* sp. No quarto dia, as amostras AP1, AP2 e AP3 foram fracionadas através dos procedimentos de aeração, e adições de EDTA e de tiosulfato de sódio. O fracionamento através do procedimento com zeólitas foi realizado apenas com a amostra de água de produção coletada em abril de 1998. Após o término dos fracionamentos das amostras AP1, AP2 e AP3, os testes de fecundação com a substância de referência (zinco), amostras não fracionadas e fracionadas foram realizados.

Os procedimentos adotados para a identificação da classe de compostos responsáveis pela toxicidade das amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) do efluente consistiram dos seguintes componentes:

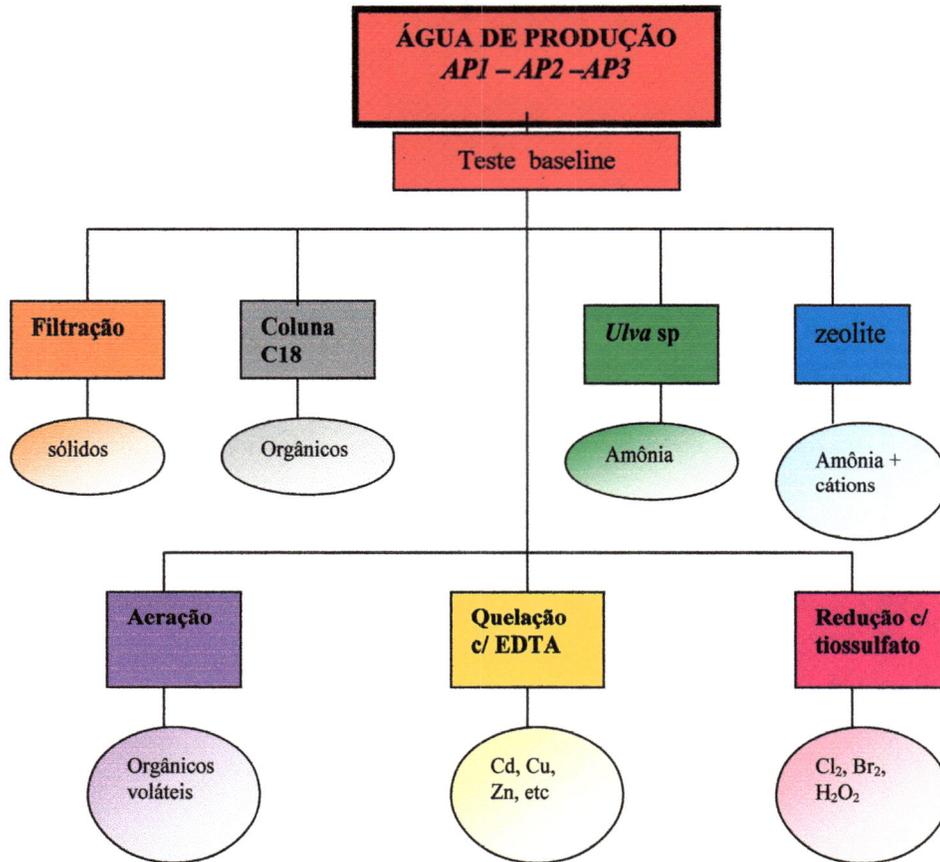
A- Teste de toxicidade "baseline" ou de referência

B- Fracionamentos físico-químicos do efluente, através de procedimentos:

- (1) Aeração
- (2) Filtração
- (3) Adição de EDTA
- (4) Adição de tiosulfato de sódio
- (5) Coluna de C₁₈
- (6) Adição da alga *Ulva* sp
- (7) Adição de zeólitas

No fluxograma a seguir são apresentados os fracionamentos utilizados no presente estudo.

Fluxograma para identificação da toxicidade
(Modificado de Lankford & Eckenfelder, 1990)



A- Teste "baseline" ou de referência

O teste de toxicidade de referência foi realizado com amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) de água de produção não submetidas aos fracionamentos físico-químicos. Os resultados gerados após a realização desse teste foram comparados com os resultados dos testes de toxicidade referentes a cada amostra fracionada. Dessa forma foi possível identificar através da comparação dos resultados qual fracionamento foi responsável pela redução ou remoção da toxicidade.

Diluições seriadas feitas a partir das maiores concentrações do efluente bruto e tratado, com salinidade ajustada, foram preparadas diretamente nos frascos-teste. Foram utilizadas no mínimo sete e no máximo nove concentrações-teste com quatro réplicas por concentração. A água de diluição utilizada nos controles e no preparo das soluções-teste foi constituída de água do mar filtrada com salinidade de 30‰ nos experimentos realizados nos Estados Unidos e com 34‰ nos experimentos realizados no Brasil.

B- Fracionamentos físico-químicos do efluente

Os fracionamentos foram feitos utilizando-se as amostras brutas e tratadas de água de produção com salinidade já ajustada. As amostras fracionadas anteriormente ao dia dos testes de toxicidade, foram acondicionadas em frascos completamente cheios, fechados e guardados em geladeira à temperatura de 4°C. Para cada amostra fracionada foram preparadas 7 a 9 concentrações-teste feitas a partir de diluições seriadas da maior concentração obtida do efluente após o ajuste da salinidade. Nos Estados Unidos foram preparadas três réplicas por concentração e no Brasil duas réplicas. Para cada amostra fracionada foi preparado um controle constituído de água do mar filtrada tratada através do mesmo procedimento utilizado para o fracionamento das amostras do efluente.

A seguir são descritos os procedimentos adotados durante cada fracionamento:

(1) Aeração

Esse fracionamento tem como objetivo verificar se a toxicidade da amostra é devida a presença de compostos voláteis, como H₂S e hidrocarbonetos voláteis.

Um volume de 200ml de cada uma das amostras de efluente (AP1, AP2 e AP3) e do controle constituído de água do mar filtrada (AMF) foi colocado em erlenmeyers de 250 ml com uma pipeta "Pasteur". Cada pipeta foi conectada a um distribuidor de ar ligado a uma bombinha de aeração. O procedimento foi conduzido em uma capela e após 1 hora de aeração, o sistema foi desligado. As amostras foram utilizadas nos testes de toxicidade.

(2) Filtração

A filtração é utilizada para determinar se a toxicidade da amostra é devida à presença de material filtrável ou associado a partículas.

Um volume de 300 ml de cada uma das amostras (AP1, AP2, AP3) e do controle com água do mar foi filtrado através de filtro "millipore" com 0,45 μ m de porosidade. O sistema de filtração foi constituído de uma bomba a vácuo e um conjunto "millipore" de filtragem (kitasato, filtro de pedra porosa e funil).

Dois sistemas de filtração foram utilizados, um para a água do mar e o outro para as amostras AP3, AP2 e AP1. Para cada amostra de efluente foi utilizado um filtro novo e a cada filtragem o conjunto era lavado com água destilada.

As amostras filtradas foram utilizadas nos testes de toxicidade.

(3) EDTA

O EDTA é um quelante orgânico que faz ligações, preferencialmente, com metais bivalentes como cobre, níquel, chumbo, zinco, cádmio, mercúrio e outros metais de transição. Neste procedimento o objetivo é determinar se a toxicidade da amostra é devida à presença de metais.

Uma solução estoque foi preparada adicionando-se 2,78g de EDTA em 100ml de água destilada e a seguir, foi homogeneizada até a completa mistura do EDTA. A solução foi preparada no dia anterior a realização dos testes de toxicidade e foi mantida em geladeira.

Um volume de 15 μ l da solução de EDTA foi adicionado em cada uma das réplicas das concentrações-teste das amostras de efluente (AP1, AP2 e AP3) e do controle com água

do mar filtrada. Todas as réplicas foram misturadas e o EDTA permaneceu interagindo com as amostras durante um tempo mínimo de três horas. Somente após esse período os organismos foram adicionados.

(4) Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

O tiosulfato é um agente redutor e a sua adição à uma amostra contendo oxidantes (Cl_2 , Br_2 , H_2O_2) resulta em uma reação de redução, que pode diminuir a toxicidade da amostra. Além de ser um agente redutor, o tiosulfato também apresenta a capacidade de quelar alguns metais.

Neste procedimento, o objetivo é determinar se a toxicidade da amostra é devida à presença de oxidantes, mas também a de alguns metais.

Devido à instabilidade da solução de tiosulfato, ela foi preparada no dia do teste. A solução estoque foi feita adicionando-se 2,35 g de tiosulfato em 100ml de água deionizada. A seguir a solução foi homogeneizada até sua completa mistura. Volumes de 17 μl e 25 μl foram adicionados em cada réplica das concentrações do efluente (AP1, AP2 e AP3) e dos controles com água do mar filtrada nos testes de fecundação com *A. punctulata* e *L. variegatus*, respectivamente. Todas as soluções das réplicas foram homogeneizadas e o tiosulfato permaneceu interagindo com as amostras durante 1 hora. Somente após esse período os organismos foram adicionados.

(5) Coluna de extração da fase sólida de C_{18}

A coluna de C_{18} é utilizada para determinar se a toxicidade da amostra é devida à presença de compostos orgânicos apolares. Neste procedimento, a coluna de C_{18} é utilizada para extrair compostos orgânicos não iônicos da solução aquosa.

O efluente obtido após a extração pela coluna é testado para verificar a presença de toxicidade. A ausência de toxicidade sugere a presença de compostos orgânicos como responsáveis pela toxicidade da amostra.

Para isso, as amostras de efluente (AP1, AP2, AP3) e do controle com água do mar foram previamente filtradas através de filtro "millipore" com $0,45\mu\text{m}$ de porosidade e a seguir 150 ml de cada amostra passaram por uma coluna de C_{18} descartável.

Nos Estados Unidos, foi utilizada uma bomba peristáltica para forçar a passagem das amostras através da coluna a uma velocidade de 10ml/min. No Brasil, utilizou-se a força da gravidade para a passagem das amostras através da coluna e a velocidade não foi calculada.

Antes da passagem do efluente, a coluna foi preparada seguindo-se as seguintes etapas:

- 1) Ativação da coluna com 20 ml de metanol
- 2) Passagem de 15 ml de água destilada
- 3) Passagem de 150ml de água do mar filtrada (AMF), a ser utilizada como controle, descartando-se os primeiros 20 ml,

Antes da quarta etapa a coluna pode secar e a seguir ela foi novamente preparada,

- 4) Reativação da coluna com 20 ml de metanol
- 5) Passagem de 15 ml de água destilada
- 6) Passagem de 150 ml de efluente.

Para cada amostra filtrada de efluente (AP1, AP2 e AP3) foi utilizada uma coluna de C_{18} .

(6) *Ulva* sp

O objetivo desse procedimento é o de remover amônia das amostras de efluente através da adição de *Ulva* sp. A alga *Ulva* sp apresenta a habilidade de absorver e utilizar grandes quantidades de amônia.

Após a lavagem das algas com água do mar filtrada, elas foram secas com papel toalha e pesadas, sendo a seguir adicionadas às amostras de efluente (AP1, AP2 e AP3) e de água do mar filtrada nas proporções de 20g de *Ulva* por 80 ml de amostra, no experimento realizado com a amostra de efluente coletada em 25/2/97, e de 5g *Ulva*/60ml, em todos os outros experimentos. O tempo de imersão das algas nas amostras do efluente e do controle com água do mar, sem aeração, foi de 4 horas.

Medidas de amônia e pH foram feitas antes e após 4h da adição das algas nas amostras utilizadas nos Estados Unidos.

Nos Estados Unidos, após a retirada das algas, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos à velocidade de 2000X g e no Brasil, foram peneiradas através de uma rede com malha fina. A seguir, as amostras foram transferidas para frascos âmbar completamente cheios e fechados, e guardadas em geladeira à temperatura de 4°C até sua utilização nos testes de toxicidade.

(7) Zeólita

As zeólitas são silicatos de origem natural ou sintética e apresentam a habilidade de troca iônica com o íon NH_4^+ e outros cátions, como os metais pesados. A inclusão de zeólitas foi feita para verificar a eficiência da sua adição na redução ou remoção da toxicidade das amostras de efluente e comparar com os resultados obtidos após adição de *Ulva* sp e EDTA.

A quantidade de zeólita utilizada foi de 30g para 300 ml de cada amostra de efluente (AP1, AP2, AP3) e água do mar filtrada. As pedras de zeólita foram lavadas com água destilada permanecendo imersas durante 30 minutos. A seguir foi adicionada água do mar filtrada por mais trinta minutos e por último as amostras de efluente que permaneceram imersas durante 30 minutos. Essas amostras foram utilizadas nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus*.

4. 2. 5 Análise estatística

Os resultados dos testes de toxicidade foram analisados através do método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) com correção de Abbott (MORGAN, 1992) para o cálculo dos valores de CE50 de todos os testes.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Utilização de *Ulva* sp para redução de amônia

A utilização de *Ulva* sp se mostrou um procedimento eficiente para a redução das concentrações de amônia em amostras de água de produção e soluções de cloreto de amônio.

Na Tabela 34 e Figuras 30 e 31 são apresentados os resultados do experimento com diferentes quantidades da alga *Ulva* sp, concentrações de água de produção e duração de imersão da alga.

Os resultados obtidos indicaram uma maior eficiência na absorção de amônia pelas algas nas condições de menor concentração do efluente (21,3%), salinidade ajustada para 30‰ e após 4 horas da adição de 20 g de alga por 80 ml de amostra. Nessas condições, a concentração inicial de amônia foi reduzida em cerca de 79,5%, após 4h de imersão da alga.

Nas condições de 42,7% de água de produção, com salinidade de 30‰ e 20g de alga/80ml de amostra, houve uma redução de 62,3% da concentração inicial de amônia após 4 h; na concentração de 100% de efluente, com salinidade de 70‰, a redução foi de 50%.

Após 6 horas da adição da alga, os valores de amônia mostraram-se superiores aos valores obtidos após 4h podendo indicar uma saturação da capacidade de assimilação de amônia pelas algas e conseqüente liberação da amônia.

As amostras controle, sem alga, apresentaram valores superiores de amônia quando comparados com os valores iniciais. Isto pode ter ocorrido devido a falhas na análise de amônia pelo eletrodo específico.

No segundo experimento, realizado com 44% de água de produção bruta e tratada com peróxido de hidrogênio, os resultados foram similares aos resultados do experimento anterior, para as condições do efluente com salinidade de 30‰ e 4h de imersão de 20g de alga por 80 ml de amostra. Nessas condições, para as amostras brutas e tratadas, a redução de amônia total foi de 49,4% e 69,2%, respectivamente. Para a amônia não ionizada, a redução foi de 83% e de 89,6%. Esses resultados mostraram a maior eficiência da absorção de amônia pelas algas nas amostras tratadas com peróxido de hidrogênio, para redução de sulfetos e fenóis (Tabela 35 e Figura 32).

Os resultados apresentados nas Figuras 33 e 34 referentes aos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata* mostraram que a maior eficiência na redução da toxicidade foi obtida para as amostras de efluente tratadas com *Ulva*. As amostras não tratadas com *Ulva* sp, mas tratadas quimicamente, para redução de sulfetos e fenóis, também apresentaram diminuição da sua toxicidade.

Na Tabela 37 são apresentados os resultados dos experimentos com *Ulva* sp conduzidos no Brasil. Nos experimentos realizados com água de produção não foi possível precisar as concentrações iniciais de amônia devido às limitações do método de análise. Foi utilizado um Kit colorimétrico que possibilitava leitura na faixa entre 0,25 a 5mg/L de amônia. Devido as altas concentrações de amônia das amostras brutas (Tabela 36) com salinidade original, provavelmente as concentrações de amônia nas amostras com salinidade ajustada para 34‰ eram maiores que 5mg/L, não sendo possível quantificar a redução de amônia nos experimentos de 6/2/98 e de 3/4/98.

Nos experimentos realizados com cloreto de amônio foi possível quantificar a redução das concentrações de amônia, para as condições de 5g de alga por 60ml de amostra, que foram de 80% e 50%. Em todos experimentos também foi observado que a adição de *Ulva* sp reduziu o pH das amostras de água de produção, soluções de cloreto de amônia e água do mar (Tabela 37 e Figura 35).

Os resultados dos testes de fecundação com *L. variegatus* indicaram redução da toxicidade nas amostras de água de produção tratadas com *Ulva* sp. Os valores de CE50; 80 min. mostraram uma redução da toxicidade de cerca de 4,4 vezes (Figura 36).

Os testes de fecundação com *L. variegatus* realizados com soluções de cloreto de amônio indicaram que concentrações de até 10mg/L não causaram efeito tóxico sobre a capacidade de fecundação dessa espécie. Em todas as concentrações testadas, a porcentagem de fecundação foi sempre maior que 70% que é o valor mínimo aceitável de fecundação para esse teste. Em relação aos valores de amônia não ionizada, o valor máximo obtido foi de 162µg/L e também não causou efeito tóxico (Tabela 38 e Figura 37).

4.3.2 Testes com *S. purpuratus* e amostras fracionadas através de ajuste de pH, filtração e coluna de C18

Na Tabela 39 são apresentados os resultados dos testes de fecundação com o ouriço *S. purpuratus* (Figura 38) realizados com amostras brutas e tratadas de água de produção submetidas aos procedimentos de filtração, coluna de C18 e pH 6,5; 7,5 e 8,5. As amostras com concentração de 43,6% de água produção não submetidas a fracionamento (teste baseline) apresentaram elevada toxicidade. Nas amostras AP1, AP2 e AP3 submetidas a filtração e na amostra AP1 após a coluna de C18 ocorreu redução da toxicidade. Nas amostras mantidas com pH 6,5 e 7,5 houve redução da toxicidade nas amostras AP2 e AP3, enquanto no pH 8,5 as amostras AP2 e AP3 foram tóxicas.

4.3.3 Testes com peróxido de hidrogênio, EDTA e tiosulfato de sódio

Na Tabela 40 são apresentados os resultados dos testes de fecundação com *A. punctulata* e *L. variegatus* realizados com peróxido de hidrogênio, EDTA e tiosulfato de sódio. O valor de CE50; 60min. para peróxido de hidrogênio no teste com *A. punctulata* foi de 10,67mg/L(8,01-14,22) e o valor da CE50; 80min. no teste com *L. variegatus* foi <3,12 mg/L. De acordo com o resultado da substância de referência, o lote de organismos de *L. variegatus* utilizado estava mais sensível, pois o valor da CE50 para o zinco foi < 0,0137mg/L.

Os valores da CE50 para o EDTA e tiosulfato de sódio nos testes de fecundação com *L. variegatus* estiveram na faixa de 199,6 a 334,7 mg/L e de 298,19 a >800mg/L, respectivamente.

4.3.4 Identificação da toxicidade da água de produção

Os resultados dos estudos de identificação da toxicidade da água de produção indicaram quatro classes de contaminantes, como sendo os principais responsáveis pela toxicidade observada. Os contaminantes que mais contribuíram com a toxicidade do efluente foram a amônia, compostos orgânicos não polares, material particulado ou associado a ele e metais (Tabelas 41 a 48 e Figuras 39 a 45).

Em cada tabela apresentada, a quinta coluna representa o valor médio da porcentagem de fecundação obtida na maior concentração teste utilizada. Somente para a Tabela 41, a concentração de 6,2% de água de produção não representa a maior concentração teste.

Nas Tabelas 41, 42 e 43, e nas Figuras 39, 40 e 41 são apresentados os resultados referentes aos seis fracionamentos das amostras bruta e tratadas de água de produção submetidas aos testes de fecundação com *A. punctulata*.

A redução da toxicidade das amostras de água de produção esteve associada com três fracionamentos físico-químicos: adição de *Ulva* sp, coluna de C18 e filtração. Esses fracionamentos foram responsáveis, em diferentes proporções, pela redução de amônia, de compostos orgânicos não polares e de sólidos em suspensão.

A redução da toxicidade nas amostras tratadas com peróxido e submetidas ao procedimento de filtração foi maior do que nas amostras não tratadas quimicamente nas três amostras de água de produção (Figuras 39, 40 e 41). Um padrão semelhante de resposta foi observado para a amostra coletada em abril de 1997 submetida ao procedimento da coluna de C18 (Figura 41).

Com a amostra de abril de 1997 a eficiência dos procedimentos de filtração e coluna de C18 aumentou de acordo com o nível de tratamento a que as amostras de água de produção foram submetidas, ou seja, níveis melhores de redução de toxicidade foram obtidos no tratamento completo (AP3). Nessa mesma amostra, a adição de EDTA reduziu a

toxicidade da amostra não tratada (AP1) e da amostra submetida ao tratamento completo (AP3) (Figura 41).

Alguns dos controles com água do mar submetidos aos fracionamentos exibiram toxicidade. Isso ocorreu para os controles dos procedimentos de aeração e coluna de C18 nos experimentos realizados em 3 e 29/4/97 (Tabelas 42 e 43).

Nas Tabelas 44, 45, 46 e 47, e nas Figuras 42, 43, 44 e 45 são apresentados os resultados referentes aos fracionamentos das amostras bruta e tratadas de água de produção submetidas aos testes de fecundação com *L. variegatus*. Na Tabela 48, estão os resultados referentes ao teste de desenvolvimento embrio-larval realizado com a amostra de abril de 1998.

A redução da toxicidade das amostras de água de produção desses experimentos esteve, em geral, associada com quatro fracionamentos físico-químicos: adição de *Ulva* sp, coluna de C18, filtração e adição de EDTA. Esses resultados sugerem a presença de quatro classes de contaminantes: amônia, compostos orgânicos não polares, sólidos em suspensão e metais, em diferentes proporções, como os principais responsáveis pela toxicidade das amostras.

Na Tabela 44 e Figura 42 são apresentados os resultados referentes a amostra de água de produção coletada em agosto de 97. A comparação dos resultados dos testes das amostras AP1 fracionadas com o teste "baseline" indicou os fracionamentos de filtração, EDTA e C18 como os principais responsáveis pela redução da toxicidade da AP1, e o procedimento com o tiosulfato foi responsável pelo aumento da toxicidade. A comparação dos resultados dos testes realizados com a amostra AP2 indicaram ausência de toxicidade em todas as concentrações testadas do teste "baseline" e dos procedimentos de aeração e filtração. Todos os outros procedimentos (EDTA, tiosulfato, C18 e *Ulva* sp) foram responsáveis pelo aumento da toxicidade. A comparação dos resultados da amostra AP3 mostrou que todos os procedimentos, com exceção feita a coluna de C18, foram responsáveis pelo aumento da toxicidade das amostras em relação ao teste "baseline". O controle com água do mar submetido ao procedimento da coluna de C18 da amostra AP2 foi o único que exibiu

toxicidade. Os controles do fracionamento com *Ulva* sp foram perdidos e dessa forma não foi possível saber se esse procedimento foi tóxico.

Na Tabela 45 e Figura 43 são apresentados os resultados referentes a amostra de água de produção coletada em outubro de 97. Neste experimento, os principais procedimentos de fracionamento responsáveis pela redução da toxicidade das amostras AP1 e AP2 foram a filtração, EDTA, C18 e *Ulva* sp. Para a amostra AP3 houve redução da toxicidade em todos fracionamentos realizados. Os controles com água do mar que exibiram toxicidade devido ao fracionamento utilizado foram os controles da filtração, *Ulva* sp e coluna de C18 somente para a amostra AP2.

Na Tabela 46 e Figura 44 são apresentados os resultados referentes a amostra de água de produção coletada em fevereiro de 98. Para a amostra AP1 os principais fracionamentos responsáveis pela redução da toxicidade foram a filtração, EDTA, C18 e *Ulva* sp, embora a aeração também tenha reduzido a toxicidade, mas em menor proporção. Para as amostras AP2 e AP3, os fracionamentos responsáveis pela redução da toxicidade foram a filtração, EDTA, C18 e *Ulva* sp. Os controles com água do mar que exibiram toxicidade devido ao fracionamento utilizado foram os controles da aeração, tiosulfato e *Ulva* sp.

Na Tabela 47 e Figura 45 são apresentados os resultados referentes a amostra de água de produção coletada em abril de 98. Para a amostra AP1 os principais fracionamentos responsáveis pela redução da toxicidade foram a filtração, EDTA, C18 e *Ulva* sp, embora a aeração e zeólitas também tenham reduzido a toxicidade mas em menor proporção. Para a amostra AP2, a coluna de C18 foi o principal fracionamento responsável pela redução da toxicidade, seguido em menor proporção pela filtração, EDTA, C18, *Ulva* sp e zeólitas. Para a amostra AP3, o principal fracionamento responsável pela redução da toxicidade foi a *Ulva* sp, seguida em menores proporções pelos fracionamentos com EDTA, C18, zeólitas, filtração e aeração.

Na Tabela 48 são apresentados os resultados referentes aos testes de desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus* realizados com as amostras de água de produção coletadas em abril de 1998 e submetidas a cinco fracionamentos físico-químicos. A redução da toxicidade foi atribuída principalmente aos fracionamentos de EDTA, *Ulva* sp e

zeolite para a amostra AP1. Para as amostras AP2 e AP3 todos os fracionamentos, em diferentes proporções, foram responsáveis pela redução da toxicidade, mas entre os dois, a maior redução foi obtida após o fracionamento com a coluna de C18. O controle com água do mar submetido ao fracionamento com *Ulva* sp foi o único que exibiu toxicidade.

4. 4 DISCUSSÃO

Os estudos de avaliação e identificação da toxicidade de efluentes têm sido utilizados com sucesso nos Estados Unidos desde meados da década de 80. Esses estudos possibilitam a identificação da causa ou causas da toxicidade de um efluente e apresentam como resultado final, a escolha de uma ou mais tecnologias adequadas para a redução ou até mesmo eliminação da toxicidade (LANKFORD, 1990).

O componente mais importante desse tipo de estudo está baseado nos métodos ou procedimentos para o fracionamento do efluente que possibilitam a separação das classes de contaminantes presentes em uma mistura complexa (HALL & MIRENDA, 1990). Dependendo dos recursos disponíveis é possível identificar o composto pertencente a uma determinada categoria de contaminantes, responsável pela toxicidade observada e com isso aumentar ainda mais a confiança na escolha da tecnologia de tratamento apropriada para a redução da toxicidade.

Vários métodos para o fracionamento de efluentes têm sido desenvolvidos e aplicados com os mais diversos tipos de efluentes domésticos e industriais lançados em ambientes de água doce. No entanto, apenas recentemente esses métodos foram adaptados para utilização com efluentes lançados em ambientes marinhos e estuarinos. A primeira publicação de um guia direcionado para condução de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade marinha, data de setembro de 1996 (BURGESS et al., 1996). Neste guia são apresentados os procedimentos gerais para a realização de fracionamentos físicos e químicos de efluentes e são recomendadas as espécies de organismos marinhos a serem utilizadas. São apresentados nove procedimentos de fracionamento que podem ser aplicados com efluentes, amostras ambientais e com água intersticial de sedimento. Entre as metodologias de testes de toxicidade recomendadas estão incluídos testes agudos e crônicos de curta duração com espécies das costas do Atlântico, Golfo do México e do Pacífico.

Os procedimentos de fracionamento incluem a filtração, aeração, adição de EDTA e tiosulfato de sódio, coluna de C18, eluição da coluna com metanol, gradação de pH, coluna de troca de cátions, eluição da coluna com ácido e adição de *Ulva lactuca*.

As espécies recomendadas para as costas do Atlântico e Golfo incluem a macroalga *Champia parvula*, o ouriço *Arbacia punctulata*, o bivalve *Mulinia lateralis*, o misidáceo *Mysidopsis bahia*, o anfípoda *Ampelisca abdita* e os peixes *Menidia beryllina* e *Cyprinodon variegatus*. Para a costa do Pacífico são recomendadas a macroalga *Macrocystis pyrifera*, os equinodermos *Strongylocentrotus purpuratus* e *Dendraster excentricus*, os bivalves *Crassostrea gigas*, *Mytilus californianus* e *Mytilus galloprovincialis*, o gastrópodo *Haliotis rufescens* e o peixe *Atherinops affinis*.

O primeiro passo para a realização de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade é verificar sua viabilidade através da determinação do nível de toxicidade do efluente a ser estudado. Segundo MOUNT & ANDERSON-CARNAHAN (1988) a toxicidade do efluente deve ser testada ao longo do tempo utilizando-se uma espécie de reconhecida sensibilidade para que seja comprovada a existência de toxicidade em níveis elevados e consistentes.

BURGESS et al. (1993a) recomendam a realização desses estudos quando testes de toxicidade realizados com a espécie mais sensível apresentarem valores de CE50 e CL50 menores que 50%.

Esse pré requisito foi cumprido durante a realização dos testes de toxicidade conduzidos no presente estudo. Esses testes demonstraram a elevada toxicidade do efluente e justificaram a realização de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade.

No Brasil, até a presente data, ainda não haviam sido desenvolvidos estudos de avaliação e identificação da toxicidade através de métodos de fracionamentos físicos e químicos de efluentes salinos. Tradicionalmente, a implantação de qualquer sistema de tratamento de efluentes sempre foi baseada em análises químicas, para a determinação das concentrações dos contaminantes presentes e comparação com os limites máximos

permitidos na legislação. Dessa forma, os contaminantes presentes acima dos limites permitidos são considerados como o problema a ser solucionado, através da implantação de um sistema de tratamento que reduza suas concentrações.

Apesar do uso de testes de toxicidade não ser exigido pela nossa legislação, cada vez mais eles têm sido utilizados em conjunto com as análises químicas para verificar se os efluentes finais brutos ou tratados apresentam toxicidade. Em alguns casos, diferentes etapas do processo de produção e tratamento tem sido avaliadas quanto a presença de toxicidade (BERTOLETTI, 1990; BRANDELLI et al., 1992; PRÓSPERI, 1993; DAMATO, 1997; BARBOSA et al., 1998; LIMA & VIEGAS, 1998).

Embora as análises químicas sejam uma ferramenta complementar em estudos de avaliação e identificação da toxicidade, seu uso isolado pode levar a conclusões equivocadas no momento da escolha da melhor tecnologia disponível para o tratamento de um determinado efluente. Uma escolha equivocada pode resultar em gastos elevados que poderiam ser evitados com a adoção de um estudo prévio de avaliação e identificação da toxicidade. A implantação de um sistema de tratamento de efluentes é um processo que geralmente apresenta um alto custo, pois pode requerer a substituição de insumos utilizados durante a produção, mudanças nas etapas do processo de produção e construção de estações de tratamento.

Uma pesquisa realizada nos Estados Unidos sobre a eficiência das estações de tratamento de efluentes na redução da toxicidade indicou maior eficácia dos sistemas de tratamento implantados nas indústrias que realizaram estudos prévios de avaliação e identificação da toxicidade (DORN & COMPERNOLLE, 1995).

No presente estudo, os resultados dos experimentos conduzidos com a alga *Ulva* sp comprovaram a eficiência desse método de fracionamento na redução das concentrações de amônia das amostras de água de produção e das soluções de cloreto de amônia.

A alga *Ulva lactuca* apresenta a habilidade de absorver, estocar e usar grandes quantidades de amônia e é utilizada como filtro biológico para a remoção de amônia de

efluentes gerados durante a criação de peixes em Israel (COHEN & NEORI, 1991; NEORI et al., 1991).

Estudos conduzidos por HAYASHI et al. (1998) demonstraram que a alga *Ulva lactuca*, seca e triturada, apresenta a capacidade de bioadsorção de cromo hexavalente presente em solução.

A recomendação do uso de *Ulva lactuca* para caracterizar a toxicidade devido à presença de amônia em misturas complexas foi feita pela primeira vez por BURGESS et al. (1996) e a aplicação do método, por HO et al. (1999).

No estudo de HO et al. (1999) ficou demonstrado que além de reduzir as concentrações de amônia em cerca de 70% em soluções de cloreto de amônia, a alga *Ulva lactuca* também exibe a capacidade de absorver metais e compostos orgânicos apolares. Os experimentos foram realizados para verificar a capacidade de acumulação de cinco metais (Cd, Cu, Ni, Zn e Pb), na presença e ausência de amônia, e de dois compostos orgânicos (lindano e fluoranteno) pela alga durante 5 horas de exposição. A acumulação dos metais pela alga variou de 15 a 18% e a presença da amônia no meio, reduziu a capacidade de acumulação para menos que 10%. No entanto, a acumulação dos orgânicos foi de 77% para o lindano e de 95% para o fluoranteno, independente da presença ou não de amônia. A alga *Ulva* sp apresentou alta eficiência na remoção de orgânicos das amostras d'água, mas segundo os autores, é bem provável que essa capacidade esteja mais relacionada com um processo de adsorção dos compostos à superfície da alga do que com uma acumulação ativa.

No presente estudo, os teores de amônia não ionizada presentes nas amostras de água de produção, do experimento do dia 5/2/97, após a adição de *Ulva* sp apresentaram-se abaixo do valor de CE50, de 600µg/L de NH₃, responsável por causar efeitos tóxicos sobre o teste de fecundação com *A. punctulata* (Tabela 35, Figura 33 e Anexo 1) e acima do valor de CE50, de 58µg/L de NH₃, responsável por causar efeito tóxico sobre os embriões de *A. punctulata* (Tabela 35, Figura 34 e Anexo 1).

Os resultados relativos ao teste de fecundação com *A. punctulata* apresentados na Figura 33 também indicam que além da amônia outros contaminantes contribuíram, em

menor proporção, com a toxicidade da amostra, pois mesmo após a redução das concentrações de amônia para níveis não tóxicos, a porcentagem de fecundação permaneceu aproximadamente, entre 50 e 60%, enquanto os valores do controle foram próximos de 80%.

No entanto, em relação ao teste embrio-larval, a redução das concentrações de amônia das amostras parece ter sido suficiente para a remoção da toxicidade, pois a porcentagem de pluteus normais foi entre 70 e 80% para as amostras tratadas com *Ulva* sp (Figura 34). Em todas as amostras de água de produção utilizadas no presente estudo, o teste embrio-larval com *A. punctulata* apresentou menor sensibilidade do que o teste de fecundação. Esses resultados, em conjunto com o exposto anteriormente, sugerem que o teste embrio-larval é menos sensível aos outros contaminantes presentes que contribuíram com a toxicidade para o teste de fecundação. BAY et al. (1993) reportam que os embriões de *A. punctulata* exibem pouca sensibilidade a uma série de compostos orgânicos frequentemente associados com a toxicidade de efluentes, e em relação aos metais, geralmente apresentam sensibilidade similar ou menor do que o teste de fecundação.

No presente estudo, os valores de amônia não ionizada das soluções de cloreto de amônia, após a adição da alga *Ulva* sp, apresentaram-se abaixo dos valores de CE50, de 1890µg/L de NH₃ para o teste de fecundação e de 120µg/L de NH₃ para o teste embrio-larval, responsáveis por causarem efeitos tóxicos sobre *L. variegatus* (Tabela 37 e Anexo 1). Embora não tenha sido possível determinar as concentrações de amônia não ionizada, na amostra de água de produção utilizada no teste de fecundação com *L. variegatus* realizado em 3/4/98, os resultados indicam redução da toxicidade na amostra bruta de água de produção, após a adição de *Ulva* sp. No entanto, a partir de concentrações maiores que 4,8% de água de produção tratada com *Ulva*, as amostras exibiram toxicidade, o que poderia indicar a presença de outros compostos contribuindo com a toxicidade total da amostra (Figura 36).

Nos experimentos realizados com *Ulva* sp, o pH de todas amostras de água do mar, água de produção e soluções de amônia diminuiu, após 4 horas de imersão da alga. Essa diminuição do pH pode ter ocorrido em consequência da decomposição das algas, pois no momento da sua retirada, após 4h de imersão, elas apresentavam cheiro forte. HO et al. (1999) obtiveram o mesmo resultado quando os experimentos com *Ulva* sp foram realizados em temperaturas maiores que 20°C. A temperatura utilizada nos experimentos realizados no

Brasil foi de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e pode ter ocasionado a decomposição das algas, seguida de diminuição do pH. Nos experimentos conduzidos nos Estados Unidos, ocorreu diminuição do pH das amostras após adição da *Ulva* sp, mas esta diminuição foi muito menos acentuada devido, provavelmente, à temperatura utilizada de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (Tabela 35).

A. punctulata exibe boa tolerância a variações de pH na faixa de 7,2 a 9,1 (BURGESS et al., 1996). A porcentagem de fecundação de *A. punctulata* no controle com água do mar do fracionamento com *Ulva* sp foi de 96% (Tabela 43), enquanto nos controles dos testes com *L. variegatus* as porcentagens de fecundação foram de 12 e 28% (Tabelas 45 e 46). Nos controles, com água do mar e *Ulva* sp, dos testes realizados em maio de 98 (Tabela 47) a porcentagem de fecundação foi de 91%.

A observada diminuição do pH das amostras não afetou a capacidade de assimilação de amônia pelas algas, durante o período de 4 horas de exposição.

Antes da inclusão da alga *Ulva* sp como um método de fracionamento, o único procedimento disponível para caracterizar a toxicidade devido a presença de amônia em misturas complexas era através da manipulação do pH das amostras. Embora seja um procedimento eficiente, apresenta desvantagens relacionadas ao efeito tamponante da água do mar (MOUNT & MOUNT, 1992) e a outras classes de compostos, como os metais e orgânicos polares que também apresentam toxicidade dependente do pH (SPEHAR et al., 1984; SCHUBAUER-BERIGAN et al., 1993).

A manipulação do pH pode ser feita ou através de adição direta de ácidos e bases (USEPA, 1991) ou através do uso controlado da concentração de CO_2 atmosférico. Quando a concentração de CO_2 é aumentada, o ácido carbônico (H_2CO_3) se dissocia aumentando a concentração de íons hidrogênio (H^+) que diminuem o pH da amostra. Quando o CO_2 é reduzido ou está ausente, os íons hidrogênio se apresentam na forma associada e o pH da amostra aumenta (MOUNT & MOUNT, 1992; BURGESS et al., 1996).

Experimentos utilizando o teste de fecundação com o ouriço *Strongylocentrotus purpuratus* e amostra de água de produção bruta e tratada, coletada em 21/10/97, indicaram que a diminuição do pH para 6,5 unidades, através da adição de ácido clorídrico, diminuiu a

toxicidade das amostras tratadas e o aumento do pH até 8,5 unidades, através da adição de hidróxido de sódio, aumentou a toxicidade das amostras.

No planejamento desses experimentos havia sido previsto o uso da câmara de atmosfera controlada para a manipulação do pH das amostras, mas devido a dificuldades na obtenção do CO₂ pelo laboratório, optou-se pela utilização da adição de ácido e base que se mostrou um procedimento adequado.

Os resultados dos testes de fecundação com *S. purpuratus* e água de produção submetida a ajuste de pH (6,5), filtração e coluna de C18 indicaram redução da toxicidade. Nas amostras com pH básico (8,5) houve aumento da toxicidade. Esses resultados sugeriram o material particulado, orgânicos não polares e amônia como os principais responsáveis pela toxicidade apresentada pelas amostras de água de produção. A amônia é uma forte candidata, pois em pH baixo a fração tóxica da amônia (NH₃) diminui e como consequência a toxicidade também diminui. Quando o pH da amostra aumenta, a fração tóxica aumenta e a amostra apresenta maior toxicidade. No entanto, em relação ao aumento da toxicidade na amostra com pH de 8,5 outro fator também deve ser considerado. Segundo BAY et al. (1993) o teste de fecundação com *S. purpuratus* é sensível a mudanças de pH. Valores de pH maiores que 8,4 produziram efeito tóxico sobre os gametas de *S. purpuratus* e reduziram a porcentagem de fecundação para valores menores que 20% em pH 8,6 e maiores.

Dessa forma, o resultado do teste de fecundação com *S. purpuratus* conduzido com água de produção e pH 8,5 deve ser considerado com cautela devido a comprovada sensibilidade desse organismo a valores de pH maiores que 8,4.

O uso do peróxido de hidrogênio no presente estudo, teve como principal objetivo a simulação do tratamento proposto pela PETROBRÁS para redução de sulfetos e fenóis e verificação da toxicidade das amostras. Esses resultados foram apresentados e discutidos no primeiro capítulo do presente estudo. Indicaram que embora seja um tratamento eficiente para redução desses compostos, não apresenta a mesma eficiência em relação à redução da toxicidade das amostras, mostrando que os sulfetos e fenóis não são os principais responsáveis pela toxicidade final apresentada pela água de produção.

Essas conclusões foram baseadas principalmente na incapacidade apresentada pelo tratamento com peróxido de reduzir a toxicidade das amostras. No entanto, a hipótese do peróxido apresentar toxicidade, por si só, deve ser considerada. Para analisar essa hipótese, foram realizados os testes de fecundação com *A. punctulata* e *L. variegatus* utilizando-se o peróxido como substância teste.

No teste com *A. punctulata*, o valor da CE50;1h foi de 10,67mg/L (8,01-14,22) e no teste com *L. variegatus*, o valor da CE50; 80 min. foi < 3,12 mg/L. Neste, o lote de organismos utilizados apresentou maior sensibilidade, como pode ser observado pelo valor de CE50 para o zinco, que foi < 0,0137mg/L (Tabela 40).

As concentrações iniciais de peróxido de hidrogênio utilizadas nas simulações do tratamento variaram de 15,6 a 43,2 mg H₂O₂/L de água de produção. Se considerássemos os valores das CE50 do peróxido obtidos para os testes de fecundação, em conjunto com os valores iniciais de peróxido utilizados, concluiríamos que o peróxido poderia apresentar toxicidade aos organismos utilizados. Para a determinação segura das concentrações responsáveis por efeitos tóxicos sobre os dois organismos, mais testes devem ser realizados.

Durante as simulações do tratamento químico da água de produção com peróxido, houve redução das concentrações de sulfeto e fenóis e isso indica sua utilização durante as reações de oxidação. Na hipótese dele ter sido utilizado em excesso, durante a segunda etapa do processo de tratamento para remoção de fenóis, sua presença no final do processo seria em níveis residuais. Caso tenha ocorrido a presença de peróxido em níveis residuais, em algumas das simulações do tratamento realizadas, essa presença seria detectada através do fracionamento das amostras com o tiosulfato de sódio.

O tiosulfato de sódio é um agente redutor e exibe a capacidade de reduzir compostos oxidantes como o peróxido de hidrogênio (HALL & MIRENDA, 1990), mas também exibe a capacidade de quelar alguns metais. Segundo HOCKETT & MOUNT (1996) o tiosulfato de sódio remove a toxicidade devido a presença de cobre, cádmio e mercúrio e também pode remover, mas de forma menos acentuada, a toxicidade devido a presença de zinco, chumbo e níquel.

Os experimentos nos quais o tiosulfato reduziu a toxicidade das amostras foram os de abril de 97, com a amostra AP3 (Figura 41) e de outubro de 97 com as amostras AP2 e AP3 (Figura 43). Dessa forma podemos sugerir, considerando-se a ausência de outros compostos oxidantes e desconsiderando-se a capacidade exibida pelo tiosulfato de quelar alguns metais, que nessas amostras o peróxido de hidrogênio pode ter contribuído com a toxicidade final do efluente, mas em pequena proporção, quando comparamos os resultados desse fracionamento com os de outros.

Embora o peróxido tenha sido utilizado como uma das etapas do tratamento da água de produção, futuramente pode ser incluído como um método de fracionamento de efluentes contendo sulfeto e orgânicos polares como o fenol, seguido da adição de tiosulfato para a remoção de resíduos de peróxido.

Nos testes de fecundação com *L. variegatus* realizados com EDTA e tiosulfato de sódio, no presente estudo, foram obtidos valores de CE50 variando de 199,6mg/L a 334,7mg/L para o EDTA e de 298,2mg/L a >800mg/L para o tiosulfato (Tabela 40). Segundo BURGESS et al. (1996) os valores de CE50 dos testes de fecundação realizados com *A. punctulata* são de 300mg/L para o EDTA e > 15000mg/L para o tiosulfato.

As concentrações de EDTA e tiosulfato utilizadas para o fracionamento das amostras de água de produção nos testes com *L. variegatus* foram de 83mg EDTA/L e de 117mg Na₂S₂O₃/L e nos testes com *A. punctulata* foram de 83mg/L e 79mg/L para EDTA e tiosulfato, respectivamente. Essas concentrações foram abaixo dos valores de CE50 responsáveis por efeitos tóxicos sobre os organismos utilizados. Os controles com água do mar realizados através da adição dessas concentrações de EDTA e de tiosulfato nos testes com *A. punctulata* e *L. variegatus*, respectivamente, confirmaram que as concentrações utilizadas não produziram efeitos tóxicos, pois as porcentagens de fecundação foram iguais ou maiores que 80%.

No presente projeto, os resultados do estudo de avaliação e identificação da toxicidade de amostras brutas e tratadas de água de produção indicaram que o sistema de tratamento implantado é muito eficiente para a redução das concentrações de sulfetos e fenóis, mas a mesma eficiência não é atingida em relação à redução da toxicidade. A escolha

do sistema de tratamento foi baseada nos resultados de análises químicas que indicaram os sulfetos e fenóis como os compostos presentes em maiores concentrações. No entanto, a realização de testes de toxicidade com amostras brutas e tratadas mostrou numa primeira etapa, a pouca eficiência da oxidação química na redução da toxicidade. Na segunda etapa, quando foi feita a simulação do tratamento completo, composta do processo de flotação e oxidação química, as amostras apresentaram-se menos tóxicas aos organismos testados.

Esses resultados foram confirmados através dos fracionamentos realizados que mostraram a *Ulva* sp, coluna de C18, filtração e EDTA como os principais responsáveis pela redução da toxicidade das amostras de água de produção. A princípio, esses fracionamentos sugerem a presença de amônia, compostos orgânicos não polares, material particulado e metais, como as classes de contaminantes contribuindo em conjunto para a toxicidade final observada.

A adição da alga *Ulva* sp além de ser muito eficiente na remoção de amônia também apresenta grande capacidade para a remoção de compostos orgânicos não polares, como foi demonstrado no trabalho de HO et al. (1999). No presente estudo, essas duas classes de compostos estavam presentes em altas concentrações em todas as amostras de água de produção analisadas. Nas amostras brutas e não diluídas de água de produção as concentrações de amônia total variaram de 61,8 a 600mg/L e de óleos e graxas de 32 a 100mg/L (Tabelas 5 e 28). Nas amostras brutas e tratadas com salinidade ajustada essas concentrações variaram de 46 a 610 mg de amônia total/L e de 8 a 264mg O&G/L (Tabelas 29 a 32). As altas concentrações dessas duas classes de compostos ajudam a confirmar a contribuição da amônia e orgânicos não polares como os principais responsáveis pela toxicidade do efluente.

A toxicidade parcial das amostras devido à presença da amônia foi confirmada através do uso de outros fracionamentos. A diminuição do pH para 6,5 na amostra de outubro de 1997 e uso do teste com *S. purpuratus* resultou na redução da toxicidade da água de produção e isto, como foi explicado anteriormente, é uma indicação da presença de amônia, pois em valores baixos de pH a amônia está presente sob a forma de NH_4^+ que é a fração não tóxica. As concentrações de amônia total, na amostra utilizada no teste com *S. purpuratus*, foram de 110mg/L nas amostras diluídas de AP1 e AP2, e de 90mg/L na amostra AP3.

O fracionamento com zeólitas, realizado com os testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *L. variegatus*, reduziu a toxicidade das amostras apesar de ter sido menos eficiente que o procedimento com *Ulva* sp (Tabelas 47 e 48). Nessas amostras, AP1, AP2 e AP3 com 28,3% de água de produção, as concentrações de amônia foram de 610mg/L, 78mg/L e 74mg/L, respectivamente (Tabela 32). Embora não tenham sido realizados experimentos adicionais para verificar a eficiência das zeólitas na remoção da amônia e redução da toxicidade, estudos conduzidos por BESSER et al. (1998) indicaram a alta eficiência da adição de zeolite na remoção da amônia e redução da toxicidade da água intersticial de sedimentos misturados com amônia. A remoção da amônia foi igual ou maior que 70% e a redução da toxicidade para os organismos utilizados também foi observada. No entanto, os sedimentos contendo altas concentrações de cádmio ou cobre e tratados com zeolite não exibiram diminuição das concentrações dos metais e nem tão pouco da toxicidade. Embora o uso do zeolite para a remoção de metais presentes em efluentes seja conhecido (BLANCHARD et al., 1984), BESSER et al. (1998) concluíram que as zeólitas removem preferencialmente a amônia de soluções contendo amônia e metais pesados.

API (1996) e SAUER et al. (1997) após a realização de um estudo de avaliação e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo com salinidade de 230‰, 162mg amônia/L e CL50; 24h de 6% para *Mysidopsis bahia*, responsabilizaram as altas concentrações de amônia e salinidade, como as causas mais prováveis da toxicidade observada. Nesse estudo foram realizados 6 fracionamentos da água de produção e o único procedimento que resultou na redução da toxicidade, foi o de ajuste de pH. No pH 6 houve redução significativa da toxicidade e no pH 8, aumento. Os outros fracionamentos consistiram de aeração com nitrogênio e oxigênio, filtração e extração de compostos orgânicos neutros, básicos e ácidos. Esse último tipo de fracionamento de compostos orgânicos foi especialmente desenvolvido para utilização com amostras de água de produção. Entre eles, somente a extração de orgânicos neutros reduziu um pouco a toxicidade da amostra.

O procedimento com a coluna de C18 é responsável pela remoção de compostos orgânicos não polares presentes em efluentes, mas também pode remover metais (BURGESS et al., 1996). A redução da toxicidade das amostras de água de produção no presente estudo,

após a extração através da coluna de C18 sugere os orgânicos não polares como um dos principais responsáveis pela toxicidade observada do efluente. Outros fracionamentos realizados juntamente com as análises de óleos e graxas auxiliam na confirmação desse resultado.

O procedimento com a alga *Ulva* sp, como exposto anteriormente, além de remover amônia exibe a capacidade de remover compostos orgânicos não polares, como os hidrocarbonetos de petróleo.

Na interpretação dos resultados referentes à redução da toxicidade da água de produção, após a passagem pela coluna de C18, o pré-tratamento dado às amostras é um fator importante e deve ser considerado.

O pré-tratamento consiste na filtração das amostras através de filtro millipore de 0,45 μ m de porosidade, visando-se com isso evitar o entupimento das colunas e colapso do sistema.

Os hidrocarbonetos de petróleo, que constituem parte dos orgânicos não polares, podem estar presentes dissolvidos ou sob a forma de colóides (< 2 μ m) e partículas. Uma das características de algumas águas de produção é conter altas concentrações de matéria orgânica dissolvida (MOD). Os colóides fazem parte da MOD e frequentemente, estão presentes em maior proporção em locais com altas concentrações de MOD (FARRINGTON, 1988).

Os baixos valores de oxigênio dissolvido obtidos para as diferentes amostras de água de produção, juntamente com os altos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) são indicações da presença de elevadas concentrações de matéria orgânica nas amostras de água de produção utilizadas no presente estudo.

Como a matéria orgânica coloidal apresenta grande capacidade de adsorver compostos hidrofóbicos, muitos dos hidrocarbonetos de petróleo estarão presentes associados a colóides (FARRINGTON, 1988).

No entanto, os hidrocarbonetos de petróleo apresentam diferentes capacidades de serem adsorvidos e isto está relacionado com seus coeficientes de partição, solubilidade e adsorção. Aqueles com coeficientes de partição ($\log K_{ow}$) maiores que 4, como a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, estarão presentes adsorvidos às partículas sólidas, e aqueles com coeficientes de partição menores que 4, entre eles o naftaleno ($\log K_{ow}=3,33$), apresentam a tendência de estarem dissolvidos em solução (DORN & COMPERNOLLE, 1995).

De acordo com o exposto, é bem provável que os aromáticos polinucleares com coeficientes maiores que 4 tenham sido adsorvidos às partículas e em consequência, removidos durante o processo de filtração. Dessa forma a redução da toxicidade apresentada após a manipulação com a coluna de C18 teria sido resultado, na realidade, da combinação de dois procedimentos: filtração e C18.

A filtração teria sido responsável pela remoção dos hidrocarbonetos particulados e dos aromáticos polinucleares com $\log K_{ow} >4$ adsorvidos às partículas, enquanto a coluna de C18 teria removido os hidrocarbonetos com $\log K_{ow} <4$.

A classe de compostos orgânicos não polares estaria representada no efluente em questão, principalmente, pelos hidrocarbonetos aromáticos mono e polinucleares. Os surfactantes que apresentam na sua estrutura tanto uma parte polar como uma não polar também poderiam ter sido removidos pela coluna de C18, mas as análises químicas realizadas indicam suas concentrações em níveis muito baixos, tornando-os candidatos pouco prováveis para a toxicidade observada.

Nas amostras de água de produção utilizadas no presente estudo, não foram realizadas análises químicas que permitissem a determinação e quantificação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes, exceção feita somente para as análises de BTEX. As informações disponíveis são referentes principalmente à análises de óleos e graxas (O&G), bem como dados da literatura relativos à composição da água de produção em geral.

É importante esclarecer que a análise de óleos e graxas abrange os hidrocarbonetos de petróleo (não polares) e ácidos graxos ou orgânicos (polares) como o ácido acético, e estes segundo BRENDEHAUG et al. (1992) não são considerados perigosos ao ambiente devido a sua baixa toxicidade.

Dados gerais sobre a presença de hidrocarbonetos de petróleo em águas de produção de diferentes origens indicam os hidrocarbonetos aromáticos mononucleares BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) como os mais abundantes. No entanto, os hidrocarbonetos polinucleares são considerados os hidrocarbonetos de maior interesse ambiental, devido a sua toxicidade e persistência. Podem estar presentes em concentrações que variam de 0,08 a 3mg/L de água de produção, mas grande parte das águas de produção, em geral, contém concentrações menores que 1mg/L (NEFF & SAUER, 1996).

Em um estudo realizado por RABALAIS et al. (1991) com 12 diferentes efluentes, caracterizados como água de produção e descartados em águas costeiras da Louisiana, nos Estados Unidos, os principais componentes orgânicos presentes foram os ácidos graxos alifáticos e aromáticos seguidos pelos hidrocarbonetos saturados (fração menos tóxica do óleo cru e muito suscetível à degradação microbiológica), hidrocarbonetos voláteis (75-95% compostos por benzeno e tolueno) e fenóis (altamente solúveis na água e apresentam toxicidade aguda em altas concentrações).

Entre os hidrocarbonetos, os componentes presentes em menor proporção foram os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, mas nessa fração, principalmente os alquil-naftalenos e fenantrenos, são considerados os mais tóxicos no óleo cru (BOESCH & RABALAIS, 1987). Nas 12 amostras estudadas os naftalenos foram os mais abundantes (RABALAIS et al, 1991).

No trabalho de STRØMGREN et al (1995) com amostras de água de produção provenientes de diferentes campos de produção do Mar do Norte, as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, nas frações particuladas e dissolvidas, variaram de 6 a 30mg/L. MORALES-LOO & GOUTX (1990) registraram concentrações de 15 a 30mg/L para o Golfo do México, e para o Mar do Norte, BRENDEHAUG et al. (1992) e

SOMERVILLE et al. (1987) registraram valores de 10mg/L e entre 20 a 40mg/L, respectivamente.

Além dos dados bibliográficos que registram altas concentrações de hidrocarbonetos de petróleo nas amostras de água de produção, muitos autores como BROWN et al. (1992), SAUER et al (1992) e STRØMGREN et al. (1995) obtiveram boas correlações entre a toxicidade apresentada pela água de produção e as concentrações de hidrocarbonetos de petróleo presentes nas amostras.

Estas informações são reforçadas pelo trabalho de JOHNSEN et al. (1993) que estudaram a toxicidade de água de produção sintética, isto é, simularam a sua composição através da adição dos principais componentes suspeitos de ocasionar toxicidade, seguindo-se suas concentrações originais. A toxicidade dessa mistura foi medida pelo teste "Microtox" e os resultados mostraram que os aromáticos contribuíram com a maior parte da toxicidade. Entre os aromáticos, os naftalenos foram o grupo mais tóxico, enquanto os voláteis (benzeno, tolueno e xileno) e a fração com 3-6 anéis aromáticos contribuíram, em menor proporção.

O trabalho de STRØMGREN et al. (1995) com a microalga *Skeletonema costatum* reforça o exposto acima e fornece fortes evidências da relação entre toxicidade de água de produção filtrada, e a presença de hidrocarbonetos de petróleo.

A diminuição da toxicidade após o procedimento de filtração das amostras também pode ter sido devido a um efeito físico, através da remoção de partículas em suspensão. As análises da série de sólidos na água de produção realizadas com as amostras coletadas em agosto, outubro de 97 e fevereiro, abril de 98 confirmam a presença de altas concentrações de sólidos. Segundo CARR & CHAPMAN (1995) o material particulado em suspensão exibe efeito deletério, especialmente, sobre o teste de fecundação com *A.punctulata*, pois diminui a capacidade dos espermatozoides localizarem e fertilizarem os óvulos. Testes de fecundação realizados com amostras de água intersticial centrifugadas para retirada de material em suspensão e não centrifugadas, contendo altas concentrações de material em suspensão, mostraram redução significativa da toxicidade nas amostras centrifugadas.

No presente estudo, além dos procedimentos da coluna de C18, adição de *Ulva* sp e filtração responsáveis respectivamente pela remoção de orgânicos não polares, amônia e material particulado, a adição de EDTA, responsável principalmente pela remoção de metais bivalentes, também contribuiu para a redução da toxicidade das amostras de água de produção.

No entanto, foram observadas diferenças em relação à redução da toxicidade tanto entre as amostras enviadas aos Estados Unidos como entre as amostras utilizadas no Brasil. Nos experimentos realizados com as amostras de fevereiro e março de 97, a adição do EDTA não reduziu a toxicidade (Figuras 39 e 40), enquanto em outros experimentos foi observada redução da toxicidade após o fracionamento das amostras com EDTA (Figuras 41 a 45).

Diferenças nas concentrações de metais presentes nas amostras poderiam explicar os resultados obtidos, mas análises químicas não foram feitas em todas as amostras. Outra possibilidade estaria relacionada com a diferença de sensibilidade entre as espécies utilizadas. No entanto, com a amostra de abril de 97, onde foi utilizado o teste com *A. punctulata*, houve redução da toxicidade na amostra AP1 e em menor proporção na amostra AP3 após a adição do EDTA.

Outros fracionamentos exibem a capacidade de remoção de metais, como a *Ulva*, coluna de C18, filtração, zeólitas e tiosulfato. Em relação a *Ulva* e zeólitas, existem evidências de que a remoção de metais na presença da amônia é insignificante através desses dois procedimentos. Durante o procedimento de filtração o uso de filtros orgânicos ao invés de filtros de fibra de vidro, supostamente evitou a retenção de metais (BURGESS et al., 1996).

Segundo HOCKETT & MOUNT (1996) e BAY (1996) o EDTA remove a toxicidade devido à presença de Cd, Cu, Hg, Zn, Mn, Pb e Ni, enquanto o tiosulfato remove a toxicidade devida ao Cd, Cu, Hg, Ag e Se. Ambos não removem a toxicidade devido ao Fe, Cr (III), Cr (IV), As, Se e Al. Além desses elementos, o tiosulfato também não remove a toxicidade devido ao Pb e Zn.

Nas amostras de agosto/ outubro de 97 e fevereiro/ abril de 98, as reduções da toxicidade pelo EDTA poderiam ser explicadas pelas presenças de 2,1mgZn/L, 1,1mgZn/L, 0,16 mgZn/L e 0,57 mgZn/L, respectivamente. Essas concentrações podem ter causado um efeito tóxico sobre o teste de fecundação com *L. variegatus* que apresenta CE50 de 0,068mg/L para o zinco.

Segundo BURGESS et al. (1996) o EDTA remove preferencialmente metais bivalentes. Os teores de bário nas amostras diluídas de água de produção foram elevados e na faixa de 10,6 a 45,2 mg/L. Acredita-se que o bário não apresenta efeito tóxico sobre os organismos marinhos, pois na água do mar é precipitado e dessa forma não estaria biodisponível. No entanto, conforme já exposto no primeiro capítulo, baixas concentrações de bário causaram efeito tóxico sobre o desenvolvimento larval do mexilhão *M. californianus*. A CE50 do bário para essa espécie foi de 0,189 mg/L. Os valores de CE50 de água de produção para o teste embrio-larval com *L. variegatus* nas amostras de agosto de 97 e fevereiro/ abril de 98 foram de 1,09%, 1,64% e 0,65%, respectivamente. As concentrações nominais de bário nessas concentrações de água de produção foram de 0,52mg/L, 0,29mg/L e 0,65mg/L. Essas concentrações são bem próximas aos valores de bário responsáveis pelos efeitos tóxicos sobre *M. californianus*.

HIGASHI et al. (1992) realizaram uma série de fracionamentos químicos de água de produção constituídos por extrações sequenciais com solventes, análises cromatográficas das frações extraídas e eluídas e realização de testes de toxicidade com embriões de *M. californianus* com cada uma delas. Os resultados obtidos indicaram a fração contendo cátions divalentes, como responsável pela toxicidade observada. Fracionamentos subsequentes da fração de cátions, indicaram o bário como o principal suspeito pela toxicidade aos embriões dos mexilhões.

A afirmação de que o bário pode apresentar efeito tóxico sobre a capacidade de fecundação e desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus* e de que essa toxicidade foi reduzida após a adição do EDTA ainda é prematura, embora existam indicações nessa direção.

5. CONCLUSÕES

- 1- A toxicidade da água de produção bruta (AP1), expressa através dos valores médios das CL50 e CE50 para todos os testes utilizados, variou de <0,39 a 24,3% de água de produção, caracterizando um efluente variável e tóxico em sua composição.
- 2- As amostras de água de produção bruta apresentaram salinidade elevada entre 59 a 157‰, teores de amônia total entre 61,8 a 600mg/L, fenol entre 0,1 a 3,0 mg/L, baixos valores de oxigênio dissolvido entre 0,64 a 3,9mg/L, óleos e graxas entre 32 a 100mg/L, pH entre 5,97 a 8,72 e sulfeto entre 5,0 a 80mg/L.
- 3- O tratamento da água de produção através da oxidação química com peróxido de hidrogênio mostrou-se eficiente para a redução dos teores de sulfetos e fenóis presentes nas amostras, mas, não diminuiu a toxicidade das mesmas como pode ser observado pelos resultados de todos testes realizados.
- 4- O tratamento completo da água de produção, através do processo de flotação seguido de oxidação química, apresentou-se mais eficiente para a redução da toxicidade das amostras.
- 5- Dentre os parâmetros definidos por legislação, apenas pH esteve dentro de limites permitidos. Os teores dos metais na água de produção bruta que apresentam limites definidos na legislação foram ultrapassados pelo bário, boro, chumbo e ferro. As análises de metais nas amostras diluídas de água de produção indicaram desequilíbrio iônico causado por um excesso ou deficiência dos íons cálcio, estrôncio, magnésio e potássio.
- 6- O uso do peróxido de hidrogênio seguido da adição de tiosulfato de sódio é proposto como um procedimento de fracionamento de efluentes contendo sulfeto e orgânicos polares como o fenol.

- 7- Os procedimentos de fracionamento do efluente constituídos por aeração, filtração, adições de EDTA e tiosulfato de sódio, coluna de C18, *Ulva* sp e zeólitas, utilizados em conjunto com o teste de fecundação com *L. variegatus* se mostraram adequados para utilização em estudos de avaliação e identificação da toxicidade de efluentes salinos.
- 8- Os dois fracionamentos responsáveis pelas maiores reduções da toxicidade das amostras brutas e tratadas de água de produção foram a coluna de C18, onde as amostras foram previamente filtradas, e a adição de *Ulva* sp, tanto nos testes com *A. punctulata*, como nos testes com *L. variegatus*.
- 9- A toxicidade das amostras brutas e tratadas da água de produção foi associada à presença combinada de orgânicos não polares, amônia, material particulado e metais. O posicionamento dos fracionamentos quanto à eficiência na redução da toxicidade das amostras de água de produção foi em sequência: C18 > *Ulva* > Filtração > EDTA.
- 10- A eficiência dos procedimentos com a coluna de C18 e *Ulva* sp sugere a presença de duas classes de compostos como as principais responsáveis pela toxicidade das amostras de água de produção: orgânicos não polares e amônia. O procedimento de filtração foi responsável por parte da redução da toxicidade e sugere a presença de material particulado. A adição do EDTA sugere a presença de metais como uma das classes de compostos contribuindo em menor proporção com a toxicidade final das amostras de água de produção.
- 11- A sensibilidade dos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval diferiu de acordo com a espécie utilizada. Nas amostras testadas no Brasil, o teste embrio-larval foi mais sensível que o teste de fecundação com *L. variegatus* e nas amostras testadas nos Estados Unidos, o teste de fecundação foi mais sensível que o teste embrio-larval com *A. punctulata*.
- 12- A sensibilidade dos diferentes métodos de teste utilizados no Brasil não diferiu entre as amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2 e AP3). O posicionamento dos testes quanto à sensibilidade foi: Embrio *L. variegatus* > *M. juniae* > *V. fisheri* > Fecundação *L. variegatus*.

- 13- Para o monitoramento de rotina da água de produção lançada no canal de São Sebastião recomenda-se o uso conjunto dos testes de toxicidade aguda com *M. juniae* e *V. fisheri* (Sistema Microtox) e do teste de toxicidade crônica de curta duração com *L. variegatus* (desenvolvimento embrio-larval).



6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA ESTADO (1996). Perfil da Economia Brasileira.

http://www.agemado.com.br/proj_com/cbmm96/6_2.htm (maio, 97)

AIDAR, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S; BÍCEGO, M.C.; BRAGA, E.S. (1994). Effect of the aqueous effluent from an oil maritime terminal on the diatom *Skeletonema costatum*: preliminary results. *I Simpósio Latino Americano da Saúde de Ecossistemas Aquáticos e Significados Ecológicos de Bioensaios*, CRHEA, USP, São Carlos, SP, 1994. Resumos. São Paulo, USP, p.81

AMARAL, C.Z.; STEINER, T. M.; MORGADO, E. H. (1996). *Coletânea bibliográfica: artigos, livros, teses, resumos e relatórios referentes ao Canal de São Sebastião (São Sebastião, SP)*, Campinas, SP. CNPq, CAPES, FAEP/UNICAMP, CEBIMar/USP.

AMBIENTAL (1991). *Estudo de tratabilidade e elaboração de projeto básico para o sistema de tratamento de efluentes do TEBAR.. Projeto Básico. / Relatório N° 5 PETROBRÁS /*

ANDERSON, B.S.; HUNT, J.W.; MARTIN, M.; TURPEN, S.L.; PALMER, F.H. (1988). *Marine Bioassay Project third report, Protocol Development: Reference toxicant and initial complex effluent testing*. Division of Water Quality, California. (report 88-7)

ANKLEY, G.; BURKHARD, L. P. (1992). Identification of surfactants as toxicants in primary effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.11, p.1235-1248.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE- API (1995). *Barium in produced water: fate and effects in the marine environment*. American Petroleum Institute Publication number 4633.

- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE- API (1996). *Summary of produced water toxicity identification evaluation research*. American Petroleum Institute Publication Number 4641.
- ARSCOTT, R. L. (1987) New directions in Environmental Protection in Oil and Gas Operations. *Journal of Petroleum Technology*, p.336- 342, April.
- APHA/AWWA/WPCF (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18ª edição, New York.
- APHA/AWWA/WPCF (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19ª edição, New York.
- BADARÓ-PEDROSO, C. (1993). *Toxicidade crônica de amostras ambientais do canal de São Sebastião e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (Crustacea: Mysidacea)*. São Carlos: 171p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- BALDWIN, J. D.; PILLAI, M. C.; CHERR, G. N. (1992). Response of embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* to aqueous petroleum waste includes the expression of a high molecular weight glycoprotein. *Marine Biology*, n.14, p.21-30.
- BAY, S.; BURGESS, R.; NACCI, D. (1993). Status and applications of echinoid (Phylum Echinodermata) toxicity test methods. Environmental toxicology and risk assesment, ASTM STP 1179, LANDIS, W. G. ; HUGHES, J.S. and LEWIS, M. A. eds. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, p.281-302.
- BAY, S. (1996). *Use and interpretation of marine invertebrate toxicity tests*. Apostila do Mini-curso oferecido durante o III Simpósio de Oceanografia, IOUSP, São Paulo, 1996.
- BAYLEY, C. H.; MILLER, J. L.; MILLER, J. M.; DHALIWAL, B. S. (1995). Application of toxicity identification procedures to the echinoderm fertilization assay to identify toxicity in a municipal effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.14, n.12, p. 2181-2186.

- BARBOSA, R.M.; POVINELLI, J.; ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (1998). Avaliação da toxicidade aguda e crônica de efluentes de estações de tratamento de água a diferentes organismos-aquáticos. In: 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, Itajaí, 1998. *Anais*. Santa Catarina, UNIVALI/CTTMar. p.42.
- BERTOLETTI, E. (1990). Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. *Ciência e Cultura*, v.42, n.3/4, p.271-277.
- BESSER, J. M.; INGERSOLL, C. G.; LEONARD, E.; MOUNT, D. (1998). Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: implications for toxicity identification evaluation procedures. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.17, n.11, p.2310-2317.
- BÍCEGO, M. C. (1988). *Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho*. São Paulo. 147p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- BÍCEGO, M. C.; WEBER, R.R.; EHRHARDT, M.; ZANARDI, E. (1996). Avaliação dos hidrocarbonetos do petróleo em amostras de água do mar e material particulado do canal de São Sebastião. In: III SIMPÓSIO SOBRE OCEANOGRAFIA, Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, 1996. *Resumos*. São Paulo, USP, p. 315.
- BLANCHARD, G.; MAUNAYE, M.; MARTIN, G. (1984). Removal of heavy metals from water by means of natural zeolites. *Water Res.*, v.18, p1501-1507.
- BOESCH, D.F.; RABALAIS, N.N. (1987). *Long-term environmental effects of offshore oil and gas development*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London.
- BOELTER, A. M.; LAMMING, F.N.; FARAG, A. M.; BERGMAN, H. (1992). Environmental effects of saline oil-field discharges on surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.11, p.1187-1195.

- BOTTS, J. A.; BRASWELL, J. W.; ZYMAN, J.; GOODFELLOW, L.; MOORE, S. B.; BISHOP, D. F. (1989). *Toxicity reduction evaluation protocol for municipal wastewater treatment plants*. USEPA/600/2-88/062. Cincinnati, Ohio.
- BOWERS, A. R. (1990) Chemical oxidation of toxic, inhibitory, and refractory organics. In: LANKFORD, P. W.; ECKENFELDER, W. W. eds. *Toxicity reduction in industrial effluents*. New York, Van Nostrand Reinhold. p.247-272.
- BOWER, C.; BIDWELL, J. P. (1978). Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. *J. Fish. Res. Board Can.*, n. 35, p.1012-1016.
- BRANDELLI, A.; BALDASSO, M. L.; GOETTEMS, E.P. (1992). Toxicity identification and reduction evaluation in petrochemical effluents – SITEL case. *Wat. Sci. Tech.*, v.25, n.3, p.73-84.
- BRASIL, LEIS, DECRETOS, etc. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 20 de 18/6/1986. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 de julho de 1986. p.11356.
- BRAILE, P.M. ; CAVALCANTI, J. E. W. A. (1978). *Manual de águas residuárias*. São Paulo, CETESB.
- BRENDEHAUG, J.; JOHNSEN, S.; BRYNE, K.H.; GJOSE, A.L.; EIDI, T.H.; AAMOT, E. (1992). Toxicity testing and chemical characterization of produced water - a preliminary study. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/ Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p. 245-256.
- BROWN, J.S., WADE, M.I.; SAUER, T.C. (1988). *Produced water chemical characterization study*. Report to the Offshore Operators Committee, Environmental Sub committee, Houston, Texas. 15p.

- BROWN, J.S., SAUER, T.C., WADE, M.J.; NEFF, J.M. (1992). Chemical and toxicological characterization of produced water freon extracts. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/ Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p. 113-132.
- BUIKEMA, A. L.; NIEDERLEHNER, B. R.; CAIRNS, J., Jr. (1981). The effects of simulated refinery effluent and its components on the estuarine crustacean, *Mysidopsis bahia*. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, v.10, p.231-240
- BURGESS, R.M.; HO, K.T.; MORRISON, G.E. (1993a). *Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Guidance Document Phase I (Draft)*. United States Environmental Protection Agency. Narragansett, Rhode Island.
- BURGESS, R. M.; SCHWEITZER, K. A.; MCKINNEY, R. A.; PHELPS, D. K. (1993b). Contaminated marine sediments: water column and interstitial toxic effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.12, p.127-138.
- BURGESS, R.; HO, K. T.; TAGLIABUE, M. D.; KUHN, A.; COMELEO, R.; COMELEO, P.; MODICA, G.; MORRISON, G. (1995). Toxicity characterization of an industrial and a municipal effluent discharging to the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v.30, n.8, p.524-535.
- BURGESS, R.M.; HO, K.T.; MORRISON, G.E.; CHAPMAN, G.; DENTON, D.L. (1996). *Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phase I Guidance Document*. EPA/600/R-96/054. U.S. Environmental Protection Agency. Narragansett, Rhode Island.
- BURGESS, R. M.; CHARLES, J. B.; KUHN, A.; HO, K. T.; PATTON, L.; MCGOVERN, D. (1997). Development of a cation-exchange methodology for marine toxicity identification evaluation applications. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.16, n.6, p.1203-1211.
- CARR, R.S.; CHAPMAN, D.C. (1992). Comparison of solid phase and pore-water approaches for assessing the quality of marine and estuarine sediments. *Chem. Ecol.*, v.7, p.19-30.

- CARR, R.S. (1993). *Sediment quality assesment survey of the Galveston Bay System*. Galveston Bay National Estuary Program. / Report. GBNEP-30/
- CARR, R.S.; CHAPMAN, D.C. (1995). Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests - extraction, storage, and handling techniques. *Archs. environ. Contamin. Toxicol.*, v.28, p.69-77.
- CARR, R.S.; CHAPMAN, D.C.; HOWARD, C.L.; BIEDENBACH, J. M. (1996a). Sediment quality triad assesment survey of the Galveston Bay, Texas System. *Ecotoxicology*, v.5, p.341-364.
- CARR, R. S.; CHAPMAN, D. C.; PRESLEY, B. J.; BIEDENBACH, J. M.; ROBERTSON, L.; BOOTHE, P.; KILADA, R.; WADE, T.; MONTAGNA, P. (1996b). Sediment porewater toxicity assesment studies in the vicinity of offshore oil and gas production platforms in the Gulf of Mexico. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, n.53, p.2618-2628.
- CHAPMAN, G. A. (1995). Sea urchin sperm cell test. In: Rand, G.M. ed. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assesment* (2nd ed.). Taylor & Francis.p.189-205
- CETESB (1980). *Aquatic toxicity seminar*. CETESB/UNILEVER RESEARCH, São Paulo. P.1-313
- CETESB (1987). *Método de ensaio L5.227 - Bioensaio de toxicidade aguda com Photobacterium phosphoreum - Sistema Microtox*. São Paulo, CETESB.
- CETESB (1988). *Guia de coleta e preservação de amostras de água*. São Paulo, CETESB.
- CETESB (1992a). *Método de ensaio L5.250 - Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com Lytechinus variegatus Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)*. São Paulo, CETESB.

- CETESB (1992b). *Método de ensaio L5.251 - Água do mar - Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae Silva, 1979*. São Paulo, CETESB.
- COHEN, I.; NEORI, A. (1991). *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. I. Ammonia uptake kinetics and nitrogen content. *Botanica Marina*, v.34, p.475-482.
- CURTIS, M. D.; KLEI, H. E.; COONEY, J.; ERTL, R. (1995). Reduction of effluent toxicity for a printed circuit board facility. *Environmental Progress*, v.14, n.2, p.80-83.
- DAMATO, M. (1997). *Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo na sua toxicidade empregando diferentes espécies indicadoras*. São Paulo. 614p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- DANIELS, C.B.; MEANS, J.C. (1989) . Assesment of the genotoxicity of produced water discharges associated with oil and gas production using a fish embryo and larval test. *Marine Environmental Research*, v. 28, p. 303-307.
- DELISLIE, P. F.; ROBERTS, M. H. (1988). The effect of salinity on cadmium toxicity to the estuarine mysid *Mysidopsis bahia*: role of chemical speciation. *Aquatic Toxicology*, v.12, p. 357-370.
- DORN, P.B.; COMPERNOLLE, R.V. (1995). Effluents. In: Rand, G.M. ed. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assesment* (2nd ed.). Taylor & Francis. p.903-936.
- DOUGLAS, W. S.; HORNE, M. T. (1997). The interactive effects of essential ions and salinity on the survival of *Mysidopsis bahia* in 96 -H acute toxicity tests of effluents discharged to marine and estuarine receiving waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.16, n.10, p.1996-2001.
- D'UNGER, C; CHAPMAN, D.; CARR, R.S. (1996). Discharge of oilfield-produced water in Nueces Bay, Texas: a case study. *Environmental Management* , v.20, n.1, p.143-150

- DURHAN, E. J.; LUKASEWYCZ, M.; AMATO, J. R. (1990). Extraction and concentration of nonpolar organic toxicants from effluents using solid phase extraction. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.9, p.463-466.
- EDZWALD, J.K. ; WALSH, J.P. (1992). *Dissolved air flotation: laboratory and pilot plant investigations*, AWWA Research Foundation and American Water Works Association. 107p.
- ENVIRONMENT CANADA (1992). *Fertilization assay with echinoids (sea urchins and sand dollars)*. IV. Series (Report EPS 1/RM/27)
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- EPA (1991). *Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control*. Office of Water, Washington, DC. EPA/505/2-90-001 PB91-127415.
- ELNABARAWY, M.T.; ROBIDEAU, R.R.; BEACH, S. A. (1988). Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox®, Polytox®, and activated sludge respiration inhibition. *Toxicity Assesment: An International Journal*, v.3, p.361-370.
- FAVA, J. A.; LINDSAY, D.; CLEMENT, W. H.; CLARK, R.; DEGRAEVE, G. M.; COONEY, J. D.; HANSEN, S.; RUE, W.; MOORE, S.; LANKFORD, P. (1989). *Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations (TRES)*. USEPA/600/2-88/070. Cincinnati, Ohio.
- FARRINGTON, J.W. (1988). Bioaccumulation of hydrofobic organic pollutants compounds. In: LEVIN, S.A; HARWELL, M.A; KELLY, J. R.; KIMBALL, K. D. eds. *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag. p.279-313.
- FLYNN, S. A.; BUTLER, ED. J.; VANCE, I. (1996). Produced water composition, toxicity and fate: a review of recent BP North Sea studies. In: REED, M. and JOHNSEN, S. eds. *Produced Water 2: Environmental Issues and Mitigation Technologies*, Environmental Science Research, v. 52., New York and London, Plenum Press. p. 69-80

- FUNDESPA (1992). *Monitorização ambiental para a instalação de emissário submarino no Canal de São Sebastião*. Relatório Final, v.2.
- GARCIA, E. M.; JUNQUEIRA, A. O. R.; SILVA, S. H. G. (1996). Gametogênese em diferentes classes de tamanho de *Lytechinus variegatus* (LAMARCK) da Baía de Sepetiba, Angra dos Reis, Rio de Janeiro. In: III SIMPÓSIO SOBRE OCEANOGRAFIA, Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, 1996. *Resumos*. São Paulo, USP. p.257
- GAYLE, D. G.; PILLAI, M. C.; CHERR, G. N. (1994). Inhibition of cellular events during early algal gametophyte development: effects of select metals and aqueous petroleum waste. *Aquatic Toxicology*, n.28, p.127-144.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific aspects of Marine Pollution) (1993). *Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment*. GESAMP Reports and Studies, v.50.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P.A.; RAMOS, M. L. L. C. (1990) *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo, CETESB.
- GIRLING, A.E. (1989). Acute and chronic toxicity of produced water from a north sea oil production platform to the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 43, p. 280-286.
- GULLEY, D. D.; BOELTER, A. M.; BERGMAN, H. L. (1991). *Toxstat 3.3*
- GULLEY, D. D.; MOUNT, D. R.; HOCKETT, J. R.; BERGMAN, H. L. (1992). A statistical model to predict toxicity of saline produced waters to freshwater organisms. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.89-96.

- HALL, W. S.; MIRENDA, R. J. (1990). Toxicity identifications evaluations. In: LANKFORD, P. W.; ECKENFELDER, W. W. eds. *Toxicity reduction in industrial effluents*. New York, Van Nostrand Reinhold. p.35-59.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. (1977). Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.11, n.7, p.714-719. Correction: v.12, n.4, p.417, 1978.
- HAMMER, M.J.; HAMMER, JR M.J. (1996). *Water and wastewater technology*. 3rd ed. New Jersey and Ohio, Prentice Hall.
- HARPER, D. E., JR. A review and synthesis of unpublished and obscure published literature concerning produced water fate and effects. / Apresentado ao "Offshore Operators Committee", Galveston, Texas, 1986/
- HAYASHI, A. M.; PIMENTA, R. R.; DUEK, E. A. R. ; DA SILVA, M. G. C. (1998). Bioadsorção de cromo hexavalente em *Ulva lactuca*. In: XIII SIMPÓSIO de BIOLOGIA MARINHA, Centro de Biologia Marinha, USP, São Sebastião, SP, 1998. *Resumos*. São Sebastião, USP. p. 41
- HIGASHI, R. M.; CHERR, G. N.; BERGENS, C. A.; FAN, T. W. M. (1992). An approach to toxicant isolation from a produced water source in the Santa Barbara Channel. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.223-234.
- HO, K. T. Y.; QUINN, J. G. (1993). Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox®. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.12, p.615-625.
- HO, K. T.; MCKINNEY, R. A.; KUHN, A.; PELLETIER, M. C.; BURGESS, R. M. (1997). Identification of acute toxicants in New Bedford Harbor sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.16, n.3, p.551-558.

- HO, K. T.; KUHN, A.; PELLETIER, M. C.; BURGESS, R. M.; HELMSTETTER, A. (1999). Use of *Ulva lactuca* to distinguish pH-dependent toxicants in marine waters and sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, n.2, p.207-212.
- HOCKETT, J.; MOUNT, D.R. (1996). Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.15, n.10, p.1687-1693.
- JACOBS, R.P.W.M.; GRANT, R.O.H.; KWANT, J.; MARQUENIE, J.M.; MENTZER, E. (1992). The composition of produced water from shell operated oil and gas production in the north sea. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46 New York, Plenum Press. p.13-21.
- JOHNSEN, S., SMITH, AT.; BRENDENHAUG, J. (1993). Environmental effects of produced water from offshore petroleum industry II: Identification of acute toxicity. *Abstract book 14th SETAC Annual Meeting*, Houston, Texas. p.129.
- JOP, K. M.; KENDALL, T. Z.; ASKEW, A.; FOSTER, R. (1991). Use of fractionation procedures and extensive chemical analysis for toxicity identification of a chemical plant effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.10, p.981-990.
- KOBAYASHI, N. (1980). Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals. *Marine Biology*, v.58, p.163-171.
- KRAUSE, P. R.; OSENBURG, C. W.; SCHMITT, R. J. (1992). Effects of produced water on early life stages of a sea urchin: stage-specific responses and delayed expression. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.431-444.
- KRAUSE, P. R. (1994). Effects of an oil production effluent on gametogenesis and gamete performance in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus* Stimpson). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.13, n.7, p.1153-1161.

- KRAUSE, P. R. (1995). Spatial and temporal variability in receiving water toxicity near an oil effluent discharge site. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.29, p.523-529.
- LANKFORD, P. W.; ECKENFELDER, W. W. eds (1990). *Toxicity reduction in industrial effluents*. Van Nostrand, Reinhold.
- LIMA, J. M. C.; VIEGAS, J. (1998). Avaliação das indústrias do Estado do Rio Grande do Sul, quanto a toxicidade de efluentes, utilizando teste agudo com *V. fisheri* (bactéria marinha luminescente). In: 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, Itajaí, 1998. *Anais*. Santa Catarina, UNIVALI/CTTMar . p. 48.
- MANAHAN, S.E. (1994) *Environmental chemistry*. 6th ed. Lewis Publishers. Cap. 20, p.577-618: Reduction, treatment, and disposal of hazardous waste.
- MATIS, K. A.; ZOUBOULIS, A. I. (1995a) An overview of the process. In: MATIS, K.A., ed. *Flotation science and engineering*. New York, Marcel Dekker. Cap. 1, p.1-44.
- MATIS, K. A.; ZOUBOULIS, A. I. (1995b) Eletrolytic flotation: an unconventional technique. In: MATIS, K.A., ed. *Flotation science and engineering*. New York, Marcel Dekker. Cap. 14, p.385-413.
- MCCULLOCH, W. L.; GOODFELLOW, W. L.; SOHN, V. A.; HARTZELL, L. A. (1998). Minimal toxicity necessary for an effective TIE. *Abstract book 18th SETAC Annual Meeting*, Charlotte, North Carolina.
- MELO, S. L. R. (1993). *Testes de toxicidade com sedimentos marinhos: adequação de metodologia para o anfípodo escavador Tiburonella viscana*. São Carlos. 163p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- MOFFITT, C. M.; RHEA, M. R.; DORN, P. B.; HALL, J. F.; BRUNEY, J. M.; EVANS, S. H. (1992). Short-term chronic toxicity of produced water and its variability as a function of sample time and discharge rate. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced*

water: Technological/Environmental Issues and Solutions. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.235-244.

MORALES-LOO, M.R.; GOUTX, M. (1990). Effects of water-soluble fraction of the Mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of chlorofyll a and lipid composition of planktonic microalgae. *Mar. Biol.*, n.104, p.503-509.

MOREIRA, G.S. (1975). Studies on the salinity resistance of the copepod *Euterpina acutifrons* (Dana). In: VERNBERG, F. J. ed. *Physiological ecology of estuarine organisms*. Belle W. Baruch Libr. Mar. Sci. 3, Univ. S. C. Press, Columbia. P.73-79.

MOREIRA, G. S.; YAMASHITA, C. (1975). Influencia de la salinidad en la reproduction y desarrollo de *Euterpina acutifrons* (Dana). In *Memorias I Simposio Latino-americano sobre Oceanografía Biológica*, México. P. 236-245

MOREIRA, G. S.; VERNBERG, W. B. (1978). Synergistic effects of environmental variables on the metabolism of the copepod *Euterpina acutifrons* from two different areas of the coast of the State of São Paulo, Brazil. *Fishery Bulletin*, v.76, n.2, p.449-455.

MOREIRA, R. M.; AUN, P. E.; PINTO, A. M. F.; COSTA, D. A.; COSTA, V. L. M. D. (1989). *Monitoração dos efluentes dos TEBAR e do Canal de São Sebastião*. /NUCLEBRÁS, DERL - 013-89/

MORENO, L. K. (1995). Na Bacia de Campos, um Oceano de Petróleo. *Jornal da USP*. São Paulo. 21 a 27 de agosto. Nº 324, p.10-11.

MORGAN, B.J.T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*, London, England: Chapman and Hall, 511p.

MORRIS, J. R.; NOVAK, L. J.; HOLTZE, K. E.; WREN, C.D.; HUNT, C. E.; BELLANTINO, M.; REED, D. (1998) Toxicity identification evaluation of effluent from a canadian metal refinery. *Abstract book 19th SETAC Annual Meeting*, Charlotte, North Carolina.

MOUNT, D.I.; ANDERSON-CARNAHAN, L. (1988). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations- Phase I Toxicity Characterization Procedures*. EPA/600/3-88/034. U.S.Environmental Protection Agency, Duluth, Mn.

(1989). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations- Phase II Toxicity Identification Procedures*. EPA/600/3-88/035. U.S.Environmental Protection Agency, Duluth, Mn.

MOUNT, D. I. (1989) *Methods for aquatic toxicity identification evaluations- phase III toxicity confirmation procedures*. USEPA/600/3-88/036

MOUNT, D. R.; MOUNT, D. I. (1992). A simple method of pH control for static and static-renewal aquatic toxicity tests. *Environ. Toxicol.Chem.*, v.11, p.609-614.

NACCI, D.; JACKIM, E.; WALSH, R. (1986). Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and Microtox. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.5, p.521-525.

NEFF, J. M.; SAUER, T. C.; MACIOLEK, N. (1992). Composition, fate and effects of produced water discharges to nearshore marine waters. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.371-386.

NEFF, J.M.; SAUER, T.C. (1996). Aromatic hydrocarbons in produced water- bioaccumulation and trophic transfer in marine food webs. In: REED, M.; JOHNSEN, S. eds. *Produced Water 2: Environmental Issues and Mitigation Technologies*, Environmental Science Research, v. 52,. New York and London, Plenum Press. p.163-175.

NEFF, J. M.; SMITH, J. P. (1998). High volume discharges of oil well produced water to the West Java Sea. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC 19th ANNUAL MEETING, Charlotte, NC, 1998. *ABSTRAT BOOK*. NC, p.13.

- NEORI, A.; COHEN, I.; GORDIN, H. (1991). *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. II. Growth Rate, Yield and C:N ratio. *Botanica Marina*, v.34, p.483-489.
- NIHOUL, C.; DUCROTOY, J-P. (1994). Impact of oil on the marine environment: policy of the Paris commission on operational discharges from the offshore industry. *Marine Pollution Bulletin*, v.29, n.6-12, p.323-329.
- NIPPER, M. G.; PRÓSPERI, V. A.; PEDROSO, C. B.; ZAMBONI, A. J.; MELO, S. L. R. (1991). *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos-Vol. III-testes de toxicidade com organismos marinhos*. São Paulo, CETESB./Relatório Técnico/
- NIPPER, M. G. N.; PRÓSPERI, V. A. P. (1993). *Desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos marinhos*. São Paulo, CETESB. /Relatório técnico/
- NIPPER, M. G.; BADARÓ-PEDROSO, C.; JOSÉ, V. F.; Melo, S. L. R. (1993a). Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Mysids and copepods. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol*, v.51, p.99-106.
- NIPPER, M. G.; PRÓSPERI, V. A.; ZAMBONI, A. J. (1993b). Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, v.50, p.646-652.
- NORBERG-KING, T. et al. (1991a). *Methods for aquatic toxicity identification evaluations-phase I toxicity characterization procedures*. 2nd ed. USEPA/600/6-91/003.
- NORBERG-KING, T. et al. (1991b). *Toxicity identification evaluation: characterization of chronically toxic effluents, phase I*. USEPA-600/6-91/005. Duluth, Mn.
- OSENBERG, C. W.; SCHMITT, R. J.; HOLBROOK, S. J.; CANESTRO, D. (1992) Spatial scale of ecological effects associated with an open coast discharge of produced water. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental*

Issues and Solutions. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.387-401.

PADRÓS, J.; PELLETIER, E.; SIRON, R.; DELILLE, D. (1999). Fate of a new silicone-based oil-treating agent and its effects on marine microbial communities. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, n.5, p.819-827.

PALANCH, M. F.; SANTOS, M.C. F. (1996). Efeitos do cobre sobre o consumo de oxigênio em *Ucides cordatus*. In: III SIMPÓSIO SOBRE OCEANOGRAFIA, Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, 1996. *Resumos*. São Paulo, USP. p. 141

PHAN, V. N.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. (1994). Avaliação prévia da toxicidade de um efluente simulado derivado de petróleo sobre *Promysis atlantica* (CRUSTACEA, MYSIDACEA). *Bolm. Inst. Oceanogr.*, S Paulo, v.42, n.1/2, p.129-141.

PHILLIPS, B. M.; ANDERSON, B. A.; HUNT, J. W. (1998). Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.17, n.3, p.453-459.

PILLARD, D. A.; TIETGE, J. E.; EVANS, J. M. (1996). Estimating the acute toxicity of produced waters to marine organisms using predictive toxicity models. In: REED, M. and JOHNSEN, S. eds. *Produced Water 2: Environmental Issues and Mitigation Technologies*, Environmental Science Research, v. 52,. New York and London, Plenum Press. p.49-60.

PILLARD, D. A.; DUFRESNE, D. L.; TIETGE, J. E.; EVANS, J. M. (1999). Response of mysid shrimp (*Mysidopsis bahia*), sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), and inland silverside minnow (*Menidia beryllina*) to changes in artificial seawater salinity. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, n.3, p.430-435.

PRÓSPERI, V. A.; NIPPER, M. G.; BERTOLETTI, E.; LORENZETTI, M. L. (1992). *Escolha de métodos apropriados para avaliação da toxicidade de efluentes lançados em ambientes estuarinos*. São Paulo, CETESB. / Relatório técnico/

- PRÓSPERI, V. A. (1993). *Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas*. São Carlos. 120p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- RABALAIS, N.; MCKEE, B.A.; REED, D.J.; MEANS, J.C. (1991) *Fate and effects of nearshore discharges of OCS produced waters*. Volume I: executive summary. U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service and Gulf of Mexico OCS regional Office. New Orleans, Louisiana.
- RABALAIS, N. N.; MCKEE, B. A.; REED, D. J.; MEANS, J. C. (1992). Fate and effects of produced water discharges in coastal Louisiana, Gulf of Mexico, USA. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.355-370.
- RAIMONDI, P. T.; SCHMITT, R. J. (1992). Effects of produced water on settlement of larvae: Field tests using red abalone. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.415-430.
- RAND, G.M., ed. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment* (2nd ed.). Taylor & Francis.
- RAY, J.P.; ENGELHARDT, F.R. J.P., eds. (1992) *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46 New York, Plenum Press.
- RAYLE, M. F.; MULINO, M. M. (1992). Produced water impacts in Louisiana coastal waters. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.343-354.

- REED, D. C.; LEWIS, R. J. (1994). Effects of an oil and gas-production effluent on the colonization potential of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) zoospores. *Marine Biology*, n.119, p.277-283.
- REED, D. C.; LEWIS, R. J.; ANGHERRA, M. (1994). Effects of an open-coast oil-production outfall on patterns of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) recruitment. *Marine Biology*, n.120, p.25-31.
- REED, M.; JOHNSEN, S. eds. (1996). *Produced water 2. Environmental Issues and Mitigation Technologies*. Environmental Science Research, v.52. New York and London, Plenum Press.
- REYNIER, M. V.; BADARÓ-PEDROSO, C.; MELO, S. L. R.; ZAMBONI, A. J. (1993). Testes de toxicidade com os microcrustáceos *Temora stillyfera* e *Mysidopsis juniae* expostos a diferentes efluentes derivados da atividade de produção de petróleo. *PUBLICAÇÃO ACIESP Nº87*, v. I, p.425-429. / Apresentado ao III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira - Subsídios a um Gerenciamento Ambiental Local, Serra Negra, 1993/
- RIVIERE, L. ; GARLAND, E. (1995). Experience of produced water treatment in the north sea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 29, n 6, p.312-316.
- ROACH, R. W.; CARR, R. S.; HOWARD, C. L.; CAIN, B. W. (1993). *An assesment of produced water impacts in the Galveston Bay system*. /US Fish and Wildlife Service Report, Houston, Texas/
- RODRIGUES, P. F.; BORRELY, S.; SAMPA, M. H.; SATO, M.I.Z.; VALENT, G. U. (1998). Estudo interlaboratorial utilizando o teste de toxicidade com *Vibrio fisheri* – sistema Microtox. In: 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, Itajaí, 1998. *Anais*. Santa Catarina, UNIVALI/CTTMar . p.36
- RØE, T. I.; JOHNSEN, S; THE NORWEGIAN OIL INDUSTRY ASSOCIATION (OLF). (1996). Discharges of produced water to the North Sea: effects in the water column. In: REED, M. and JOHNSEN, S. eds. *Produced Water 2: Environmental Issues and Mitigation*

Technologies, Environmental Science Research, v. 52,. New York and London, Plenum Press. p. 13-26.

SANTORO, E. D.; FIKSLIN, T. J. (1987). Chemical and toxicological characteristics of sewage sludge ocean dumped in the New York Bight. *Mar. Poll. Bull.*, n.7, p.394-399.

SAUER, T. D.; WARD, T. J.; BROWN, J. S.; O'NEIL, S.; WADE, M. J. (1992). Identification of toxicity in low-TDS produced waters. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/ Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.209-222

SAUER, T. D.; HELDER, J. C.; BROWN, J. S.; WARD, T. (1997). Toxicity identification evaluations of produced water effluents. *Environ. Toxicol.Chem.*, v.16, n.10, p.2020-2028.

SCHUBAUER-BERIGAN, M. K.; DIERKES, J. R.; MONSON, P. D.; ANKLEY, G. T. (1993). pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.12, p.1261-1266.

SCHULER, L. J.; HEAGLER, M. G. (1998). A comparison of the effects of salinity and chloride ion on the bioaccumulation of cadmium in *Menidia beryllina*. *Abstract book 19th SETAC Annual Meeting*, Charlotte, North Carolina. p.197.

SEABRA, P. N. C.; SANTIAGO, V. M. J. (1984). As atividades de perfuração e produção de petróleo e o meio ambiente. *B. téc. PETROBRÁS, Rio de Janeiro*, v.27, n.1, p.42-49, jan./mar.

SEABRA, P. N. C.; VITAL, N. A. A.; RIBEIRO, C. M. S.; GOMES, N. T.; OLIVEIRA, F. F. (1992). *Toxicidade do efluente do tratamento por oxidação química (peróxido) do DTCS (ex-TEBAR) – relatório parcial*. Comunicação técnica, n.042. / Relatório DITER-SEBIO-CENPES- PETROBRÁS, RJ/

- SHIFF, K. C.; REISH, D. J.; ANDERSON, J. W. ; BAY, S. M. (1992). A comparative evaluation of produced water toxicity. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.199-207
- SHIMMELL, S. C.; MORRISON, G. E.; HEBER, M. A. (1989). Marine complex effluent toxicity program: test sensitivity, repeatability and relevance to receiving water toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.8, n.8, p.739-746.
- SIQUEIRA, J. L. D. (1998). Uso do peróxido de hidrogênio para tratamento de efluentes. *Revista Gerenciamento Ambiental*, n. 2, p.54-58.
- SOMERVILLE, H.J.; BENNET, D.; DAVENPORT, J.N.; HOLT, M.S.; LYNES, A.; MAHIEU, A.; MCCOURT, B.; PARKER, J.G.; STEPHENSON, R.R.; WATKINSON, R.J.; WILKINSON, T.G. (1987). Environmental effect of produced water from north sea oil operations. *Mar. pollut. Bull.*, v.18, n.10, p.549-558.
- SOUSA, E. C. P. M.; TOMMASI, L. R. (1997). Toxicidade do efluente derivado do terminal marítimo da PETROBRÁS sobre o gastropoda *Costoanachis sertulariarum*. *Rev. bras. oceanogr.*, v.45, n.1/2, p.95-99.
- SPANGENBERG, J. V.; CHERR, G. (1996). Developmental effects of barium exposure in a marine bivalve (*Mytilus californianus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.15, n.10, p.1769-1774.
- SPEHAR, R. L.; NELSON, H. P.; SWANSON, M. J.; RENOOS, J. W. (1984). Pentachlorophenol toxicity to amphipods and fathead minnows at different test pH values. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.4, p.389-398.
- STEPHENSON, M.T. (1992). A survey of produced water studies. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.1-11.

- STRØMGREN, T.; SØRSTRØM, S.E.; SCHOU, L.; KAARSTAD, I.; AUNAAS, T.; BRAKSTAD, O. G.; JOHANSEN, Ø. (1995). Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Marine environmental Research*, v.40, n.2, p.147-169.
- THOMAS, K. V.; THAIN, J. E.; WALDOCK, M. J. (1999). Identification of toxic substances in United Kingdom estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.18, n.3, p.401-411.
- TIBBETTS, P. J. C.; BUCHANAN, I. T.; GAWEL, L. J.; LARGE, R. (1992). A comprehensive determination of produced water composition. In: RAY, J.P. and ENGELHARDT, F.R. eds. *Produced water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Environmental Science Research, v.46. New York, Plenum Press. p.97-112.
- TOLEDO, A. C. C.; SANTOS, M. C. F. (1996). Efeito do benzeno e da mudança da salinidade no consumo de oxigênio em *Ucides cordatus*. In: III SIMPÓSIO SOBRE OCEANOGRAFIA, Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, 1996. *Resumos*. São Paulo, USP. p. 280.
- USEPA (1991). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4.ed. Cincinnati, Ohio. (EPA/600/4-90/027)
- USEPA (1993). *A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach (Version 2.0)*. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Duluth, Mn.
- USEPA (1994). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to marine and estuarine organisms*. 2.ed. Cincinnati, Ohio. (EPA/600/4-91/003)
- USEPA (1995). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to West coast marine and estuarine organisms*. 1st ed. Cincinnati, Ohio. (EPA/600/R-95/136)

- WALSH, G. E.; GARNAS, R. L. (1983). Determination of bioactivity of chemical fractions of liquid wastes using freshwater and saltwater algae and crustaceans. *Env. Sci. Technol.*, n.17, p. 180-182.
- WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (1994). *Pretreatment of industrial wastes. Manual of practice FD 3*. USA
- WEBER, C.I.; HORNING II, W.B.; KLEMM, D.J.; NEIHEISEL, T.W.; LEWIS, P.A.; ROBINSON, E.L.; MENKEDICK, J. & KESSLER, F. (1988). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. EPA 600/4-87/028. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- WEBER, R.R.; BÍCEGO, M. C. (1991). Survey of petroleum aromatic hydrocarbons in the São Sebastião Channel, SP, Brazil, November 1985 to August 1986. *Bolm Inst. Oceanogr., S Paulo*, v.39, n.2, p.117-121.
- ZABEL, T. (1985). The advantages of dissolved air flotation for water treatment. *Journal AWWA*, v.77, n.5, p.42-46.
- ZAMBONI, A. J. (1993). *Avaliação da qualidade de água e sedimentos do canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea)*. São Carlos. 143p. Dissertação (Mestrado) -Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

7. TABELAS

Tabela 5- Características gerais das amostras brutas não diluídas de água de produção.

Nº amostra	Data da coleta	Temperatura (°C)	Amônia total (mg/L)	Cloretos (mg/L)	Densidade	Fenol (mg/L)	OD (mg/L)	O&G (mg/L)	pH ^a	pH ^b	Salidade (%)	Sulfeto ^a (mg/L)	Sulfeto ^b (mg/L)
1	16/4/96	30	-	-	-	-	0,79	-	6,87	-	76	-	-
2	18/6/96	26	-	-	1050	-	3,4	-	7,1	-	68	-	-
3	25/7/96	22	-	42455	1050	-	3,9	58,8	6,8	-	68	12	-
4*	22/10/96	24,6	-	72400	-	-	-	-	6,63	-	71	15	11,7
5*	3/12/96	24,8	72,1	63900	1050	-	1,61	-	5,97	6,62	68	6	0,77 ^c
6*	10/1/97	28	67,9	65800	1049	-	1,37	-	6,78	7,00	68	20	21,6
7*	20/2/97	29	80,4	68400	1045	-	0,82	-	6,95	7,34	60	16	13,6
8*	20/3/97	28	85,6	44900	1052	-	0,73	-	7,03	6,91	71	10	4,38
9*	18/4/97	27	61,8	42000	1046	-	0,64	-	8,72	6,93	62	26	19,7
10	20/8/97	25	-	52700	-	-	-	85	-	-	74	7	-
11	21/10/97	24	-	50000	1056	-	-	-	7,5	-	78	6	-
12	5/2/98	-	150	-	-	0,6	-	-	7,0	-	67	40	-
13	10/2/98	31	250	42000	-	3	-	-	8,0	-	59	30	-
14	1/4/98	-	500	-	-	2,0	-	-	6,6	-	88	20	-
15	17/4/98	-	350	49200	-	3,0	-	-	7,0	-	120	80	-
16	29/4/98	28	600	68200	-	2,0	-	-	6,4	-	120	18	-
17	18/5/98	-	450	56600	-	0,1	-	-	6,5	-	120	25	-
18	10/8/98	25,5	600	73000	-	0,15	-	-	6,5	-	157	5,0	-

(*) amostras enviadas aos Estados Unidos; (a) análises realizadas no dia da coleta na PETROBRÁS; (b) análises realizadas em Corpus Christi entre 4 a 10 dias após a coleta; (c) amostra semi congelada; (OD) oxigênio dissolvido; (O&G) óleos e graxas.

Tabela 6- Resumo dos parâmetros físico-químicos analisados na água de produção bruta e valores máximos permitidos (VMP) para descarte de efluentes.

Parâmetros	Valor médio	Valor mínimo	Valor máximo	Total analisado	VMP*
Temperatura (°C)	26,6	22	30	14	40
Amônia total (mg/L)	272,3	61,8	600	12	5
Cloretos (mg/L)	56539	42000	73000	14	-
Densidade	1049	1045	1056	8	-
Fenol (mg/L)	1,55	0,1	3,0	7	0,5
OD (mg/L)	1,66	0,64	3,9	8	-
O&G (mg/L)	71,9	58,8	85	2	20
pH	6,96	5,97	8,72	22	5-9
Salinidade (‰)	83	59	157	18	-
Sulfeto (mg/L)	19,4	4,38	80	21	1,0

*VMP segundo Legislação Federal: Resolução CONAMA n° 20, 1986 e Legislação Estadual: Lei 997, 1976.

(-) não definido na legislação

Tabela 7- Efeito do tempo de estocagem a 4°C sobre alguns parâmetros físico-químicos da água de produção.

Data da coleta	Estocagem (dias)	pH	redução/aumento (%)	Sulfeto (mg/L)	redução/aumento (%)	Amônia (mg/L)	redução/aumento (%)	Fenol (mg/L)
22/10/96	9	6,63	-	15		-	-	-
		-		11,7	↓ 22%	-	-	-
3/12/96	6*	5,97		6		-	-	-
		6,62	↑ 9,8%	0,77	↓ 87%	-	-	-
10/1/97	4	6,78		20		-	-	-
		7	↑ 3,1%	21,6	↑ 7,4%	-	-	-
20/2/97	5	6,95		16		-	-	-
		7,34	↑ 5,3%	13,6	↓ 15%	-	-	-
20/3/97	11	7,03		10		-	-	-
		6,91	↓ 1,7%	4,38	↓ 56,2%	-	-	-
18/4/97	8	8,72		26		-	-	-
		6,93	↓ 20,5%	19,7	↓ 24,2	-	-	-
1/4/98	7	6,6		20		500		2
		6,6		18	↓ 10%	350	↓ 30%	2

(*) amostra semi-congelada

Tabela 8- Efeito da decantação e centrifugação de amostras não tratadas (AP1) e tratadas (AP2) de água de produção sobre a toxicidade através do uso dos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *A. punctulata*.

Data Coleta de AP	N° experimento	Teste de fecundação (CE50; 60min em %)				
		AP1		AP2		
		NT	NTC	T	TD	TC
22/10/96	1	0,32	-	0,43	>10	-
10/1/97	2	0,54	-	0,49	1,59	-
	3	< 0,17	0,28	0,43	0,86	1,14
20/2/97	4	< 0,17	0,56	<0,39	-	0,76
Teste embrio-larval (CE50; 48h em %)						
10/1/97	2	4,67	-	3,23	5,86	-
	3	1,63	3,51	-	-	-
20/2/97	4	0,56	<0,39	0,42	-	0,45

NT- não tratada; NTC- não tratada centrifugada; T- tratada; TD- tratada decantada; TC- tratada centrifugada

Tabela 9- Porcentagem de redução de sulfeto e amônia de amostra não tratada e tratada com peróxido de hidrogênio.

ÁGUA DE PRODUÇÃO	Réplica	pH	Sulfeto (mg/L)	Redução de sulfeto (%)	Amônia total (mg/L)	Redução de amônia (%)
NÃO TRATADA Inicial	1	6,785	6,06		76,7	
	2	6,773	6,01		72,3	
	3	6,822	5,79		68,1	
	X	6,793	5,95		72,4	
Final	4	6,859	4,61		50,0	
	5	6,859	4,51		47,7	
	6	6,820	4,57		44,9	
	X	6,846	4,56	23,4	47,5	34,4
TRATADA	7	6,824	1,13		62,7	
	8	6,871	1,05		56,7	
	9	6,864	0,98		53,5	
	X	6,853	1,05	82,3	57,6	20,4

Tabela 10- Porcentagem de redução de sulfeto e fenol de amostra não tratada e tratada com peróxido de hidrogênio.

ÁGUA DE PRODUÇÃO	Réplica	Sulfeto (mg/L)	Redução de sulfeto (%)	Fenol (mg/L)	Redução de fenol (%)
NÃO TRATADA Inicial	1	8,8		2,5	
	Final	2	6,43	27	-
TRATADA	3	0,442			
	4	0,471			
	X	0,456	94,8	1,5	40

Tabela 11- Porcentagem de redução de sulfeto e fenol de amostra não tratada e tratada com peróxido de hidrogênio.

ÁGUA DE PRODUÇÃO	Réplica	pH	Sulfeto (mg/L)	Redução de sulfeto (%)	Fenol (mg/L)	Redução de fenol (%)
NÃO TRATADA Inicial	1	6,73	2,82		2,0	
Final	2	-	1,36	51,8	-	
TRATADA	3	8,5	0,0403	98,6	1,0	50

Tabela 12- Porcentagem de redução de sulfeto e fenol de amostra não tratada e tratada com peróxido de hidrogênio.

ÁGUA DE PRODUÇÃO	Réplica	pH	Sulfeto (mg/L)	Redução de sulfeto (%)	Fenol (mg/L)	Redução de fenol (%)
NÃO TRATADA Inicial	1	7,3	9,28		3,0	
Final	2	-	6,85	26,2	-	-
TRATADA	3	7,1	0,610	93,4	-	-

Tabela 13- Porcentagem de redução de sulfeto e amônia de amostra não tratada e tratada com peróxido de hidrogênio.

ÁGUA DE PRODUÇÃO	Réplica	pH	Sulfeto (mg/L)	Redução de sulfeto (%)	Amônia (mg/L)	Redução de amônia (%)
NÃO TRATADA Inicial	1	7,36	10,6		68,4	
Final	2	7,37	10,8	-	66,1	3,4
TRATADA	3	7,80	0,302	97,1	64,0	6,4

Tabela 14- Porcentagem de redução de sulfeto e amônia de amostra não tratada e tratada com peróxido de hidrogênio.

ÁGUA DE PRODUÇÃO	Réplica	pH	Sulfeto (mg/L)	Redução de sulfeto (%)	Amônia (mg/L)	Redução de amônia (%)
NÃO TRATADA Inicial	1	7,2	7,58		61,2	
Final	2	7,2	8,45	-	-	-
TRATADA	3	7,7	0,234	96,9	43,3	29,2

Tabela 15- Toxicidade da água de produção bruta (API) em % para diferentes organismos marinhos.

Data De Coleta	TESTES DE TOXICIDADE (intervalo de confiança)							
	Microtox® (CE50;15min) %		<i>M. juniae</i> (CL50;96h) %		<i>L. variegatus</i>		<i>A. punctulata</i>	
	Fecundação % (CE50;80min)	E.-larval % (CE50;24-28h)	Fecundação % (CE50;80min)	E.-larval % (CE50;24-28h)	Fecundação % (CE50;60min)	E.-larval % (CE50;48h)		
16/04/96	5,4 (5,3-5,4)	1,29 (0,99-1,7)	**	0,71(0,68-0,73)	-	-	-	
18/06/96	1,4 (0,9-1,96)	2,1 (1,72-2,59)	3,2 (3,13-3,25)	0,37(0,34-0,41)	-	-	-	
25/07/96	-	1,29(1,04-1,63)	5,23 (NC)	1,10(0,99-1,23)	-	-	-	
10/01/97	-	-	-	1,57(1,12-2,20)	0,54(0,50-0,58)	4,67(4,27-5,12)	-	
20/02/97	-	-	-	-	0,56(0,55-0,57)	<0,39	-	
20/03/97	-	-	-	-	0,24(0,18-0,43)	3,03(2,54-3,60)	-	
18/04/97	-	-	-	-	0,43(0,35-0,52)	-	-	
20/08/97	1,96(1,9-2,1)	1,94(1,46-2,58)	24,3(22,7-25,9)	1,09(1,03-1,14)	-	-	-	
21/10/97	1,9(1,6-2,2)	2,66	7,59(7,43-7,76)	*	-	-	-	
10/02/98	3,5(3,2-3,9)	-	1,82(1,57-2,11)	1,64(1,44-1,86)	-	-	-	
01/04/98	-	-	1,34(1,23-1,46)	-	-	-	-	
29/04/98	2,8(2,6-3,1)	-	10,6(10,1-11,1)	0,65(0,61-0,69)	-	-	-	
18/05/98	0,33(0,31-0,34)	-	1,55(1,53-1,57)	0,54(0,50-0,59)	-	-	-	
10/08/98	3,2(2,9-3,4)	-	-	-	-	-	-	

(**) 23% de fecundados no controle; (-) não realizado; (*) não analisado

Tabela 16- Toxicidade da água de produção tratada através de oxidação química (AP2) em % para diferentes organismos marinhos.

Data De Coleta	TESTES DE TOXICIDADE (intervalo de confiança)							
	Microtox® (CE50;15min)	<i>M. juniae</i> (CL50;96h)	<i>L. variegatus</i>		<i>A. punctulata</i>			
	%	%	Fecundação % (CE50;80min)	E.-larval % (CE50;24-28h)	Fecundação % (CE50;60min)	E.-larval % (CE50;48h)		
16/04/96	-	-	-	-	-	-	-	-
18/06/96	-	-	-	-	-	-	-	-
25/07/96	-	-	-	-	-	-	-	-
03/12/96	-	-	-	-	-	-	-	-
10/01/97	-	-	-	-	0,49(0,46-0,52)	3,23(2,9-3,58)	-	-
20/02/97	-	-	-	-	0,76(0,71-0,82)	0,45(0,30-0,68)	-	-
20/03/97	-	-	-	-	0,33(0,25-0,43)	4,29(3,60-5,10)	-	-
18/04/97	-	-	-	-	0,15(0,13-0,17)	-	-	-
20/08/97	0,44(0,38-0,5)	0,92(0,65-1,30)	>45,9	1,04(0,95-1,14)	-	-	-	-
21/10/97	2,0(1,6-2,5)	-	7,29(7,43-7,76)	*	-	-	-	-
10/02/98	9,8(9,2-10,4)	-	4,75(4,53-4,98)	0,40(0,35-0,45)	-	-	-	-
29/04/98	2,3(1,9-2,8)	-	10,1(9,97-10,2)	0,54(0,50-0,58)	-	-	-	-

(-) não realizado; (*) não analisado

Tabela 17- Toxicidade da água de produção tratada através de flotação e oxidação química (AP3) em % para diferentes organismos marinhos.

Data De Coleta	TESTES DE TOXICIDADE (intervalo de confiança)							
	Microtox®		<i>M. juniaae</i>		<i>L. variegatus</i>		<i>A. punctulata</i>	
	(CE50;15min) %	(CL50;96h) %	Fecundação % (CE50;80min)	E.-larval % (CE50;24-28h)	Fecundação % (CE50;60min)	E.-larval % (CE50;48h)		
16/04/96	-	-	-	-	-	-	-	-
18/06/96	-	-	-	-	-	-	-	-
25/07/96	-	-	-	-	-	-	-	-
22/10/96	-	-	-	-	-	-	-	-
03/12/96	-	-	-	-	-	-	-	-
10/01/97	-	-	-	-	-	-	-	-
20/02/97	-	-	-	-	-	-	-	-
20/03/97	-	-	-	-	-	-	-	-
18/04/97	-	-	-	-	3,27(2,91-3,68)	-	-	-
20/08/97	0,25(0,19-0,32)	2,23(1,66-3,01)	10,0(9,42-10,7)	2,03(1,98-2,09)	-	-	-	-
21/10/97	1,5(1,2-1,9)	2,20	3,84	*	-	-	-	-
10/02/98	10,2(8,8-11,8)	-	5,31(5,06-5,58)	1,08(0,92-1,26)	-	-	-	-
29/04/98	3,8(3,3-4,3)	-	11,9(11,1-12,6)	0,38(0,33-0,43)	-	-	-	-

(-) não realizado; (*) não analisado

Tabela 18- Valores médios de CL50 e CE50 (% AP) determinados para cada um dos testes de toxicidade realizados com amostras bruta (AP1) e tratadas (AP2 e AP3) de água de produção.

Água de produção	TESTES DE TOXICIDADE					
	Microtox	<i>M. juniae</i>	<i>L. variegatus</i>		<i>A. punctula</i>	
			fecundação	embrio	fecundação	embrio
AP1	2,56 (1,56) n=8	1,85 (0,58) n=5	6,95 (7,73) n=8	0,96 (0,47) n=8	0,44 (0,14) n=4	3,85 (1,15) n=2
AP2	3,6 (4,19) n=4	0,92 n=1	7,38 (2,67) n=3	0,66 (0,33) n=3	0,43 (0,25) n=4	2,65 (1,98) n=3
AP3	3,93 (4,4) n=4	2,21 (0,02) n=2	7,76 (3,8) n=4	1,16 (0,82) n=3	3,27 n=1	-

(-) não realizado

Tabela 19- Valores de concentrações de efeito obtidos através de diferentes métodos estatísticos para o teste de fecundação com *A. punctulata* e água de produção.

Data da coleta AP	% AP1					
	CE50	CI50	CI25	CENO	CEO	CEL
10/1/97	0,54	0,51	0,41	0,3	0,6	0,42
20/2/97	0,56	0,59	0,48	0,39	0,78	0,55
20/3/97	0,24	0,39	0,10	< 0,024	0,024	-
18/4/97	0,43	0,77	0,074	0,047	0,09	0,065
Média:	0,44	0,56	0,27	0,24	0,37	0,345
CV (%):	33,2	28,4	77	-	-	-
n:	4	4	4	3	4	3
% AP2						
10/1/97	0,49	0,49	0,39	0,3	0,6	0,42
20/2/97	0,76	0,73	0,55	0,39	0,78	0,55
20/3/97	0,33	0,48	0,10	<0,024	0,024	-
18/4/97	0,15	0,15	0,09	0,012	0,023	0,017
Média:	0,43	0,46	0,28	0,23	0,36	0,33
CV (%):	60	51,7	80,7	-	-	-
n:	4	4	4	3	4	3

Tabela 20- Valores de concentrações de efeito obtidos através de diferentes métodos estatísticos para o teste embrio-larval com *A. punctulata* e água de produção.

Data da Coleta AP	% AP1					
	CE50	CI50	CI25	CENO	CEO	CEL
10/1/97	4,67	6,22	2,79	0,6	1,3	0,88
20/2/97	<0,39	0,34	0,17	<0,39	0,39	-
20/3/97	3,03	3,47	2,05	0,8	4,6	1,9
Média:	3,85	3,34	1,67	0,7	2,09	1,39
CV(%):	29,9	86,8	80,8	-	-	-
n:	2	3	3	2	3	2
% AP2						
10/1/97	3,23	3,82	1,94	0,6	1,3	0,88
20/2/97	0,45	0,48	0,21	<0,39	0,39	-
20/3/97	4,29	4,16	2,48	0,8	4,6	1,9
Média:	2,65	2,82	1,54	0,7	2,09	1,39
CV(%):	74,7	71,9	76,6	-	-	-
n:	3	3	3	2	3	2

Tabela 22- Valores de concentrações de efeito obtidos através de diferentes métodos estatísticos para o teste embrio-larval com *L. variegatus* e água de produção.

Data da coleta AP	% AP1					
	CE50	CI50	CI25	CENO	CEO	CEL
16/4/96	0,71	0,76	0,61	0,5	1,0	0,71
18/6/96	0,37	0,39	0,27	0,18	0,56	0,32
25/7/96	1,10	1,48	0,78	0,31	0,96	0,54
20/8/97	1,09	1,12	0,91	0,7	1,4	0,99
21/10/97	*	*	*	*	*	-
10/2/98	1,64	1,95	1,14	0,9	1,8	1,27
29/4/98	0,65	0,67	0,52	0,44	0,88	0,62
18/5/98	0,54	0,62	0,34	0,27	0,54	0,38
Média:	0,94	0,99	0,65	0,47	1,02	0,69
CV (%):	53,2	55,5	47,69	-	-	-
n:	7	7	7	7	7	7
	% AP2					
20/8/97	1,04	1,05	0,68	0,7	1,4	0,99
21/10/97	*	*	*	*	*	-
10/2/98	0,40	0,35	0,28	0,23	0,46	0,32
29/4/98	0,54	0,59	0,45	<0,11	0,11	-
Média:	0,66	0,66	0,47	0,47	0,65	0,65
CV (%):	50,9	53	42,5	-	-	-
n:	3	3	3	2	3	2
	% AP3					
20/8/97	2,03	1,97	1,54	1,4	2,8	1,99
21/10/97	*	*	*	*	*	-
10/2/98	1,08	1,97	0,41	0,23	0,46	0,32
29/4/98	0,38	0,40	0,25	<0,11	0,11	-
Média:	1,16	1,45	0,73	0,82	1,12	1,15
CV (%):	70,7	62	95,8	-	-	-
n:	3	3	3	2	3	2

(*) não analisado

Tabela 23- Valores da CE50; 15min do teste Microtox® e da CL50;96h do teste agudo com *Mysidopsis juniae* realizados com sulfato de cobre e zinco em paralelo aos testes com água de produção. O intervalo de confiança é apresentado entre parênteses. (DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação).

Data de coleta de AP	Testes	Microtox® (Cobre) CE50;15min (mg/L)	<i>M. juniae</i> (Zinco) CL50;96h (mg/L)
16/04/96	1	0,61 (0,58-0,65)*	0,52 (0,43-0,62)
18/06/96	2	89.500 (69.000-117.000)**	0,34 (0,30-0,38)
25/07/96	3	-	0,39 (0,36-0,43)
20/08/97	4	0,18 (0,13-0,24)	>0,56
21/10/97	5	0,22 (0,14-0,34)	0,42 (0,38-0,47)
10/02/98	6	0,28 (0,14-0,58)	-
29/04/98	8	0,19 (0,14-0,25)	-
18/05/98	9	22,87(19,7-26,5)***	-
10/08/98	10	0,24(0,16-0,34)	-
	Média	0,22	0,417
	Valor mínimo (X - 2DP)	0,142	0,267
	Valor máximo (X + 2DP)	0,298	0,567
	DP	0,039	0,075
	CV (%)	17,7	17,98

* sulfato de zinco; ** DMSO; *** fenol; (-) não realizado

Tabela 24- Valores das CE50; 80min, CE50; 24-28h e qualidade dos controles obtidos nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *Lytechinus variegatus* realizados com sulfato de zinco, em paralelo aos testes com água de produção e outras substâncias. O intervalo de confiança é apresentado entre parênteses. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Data de coleta de AP	Testes	Fecundação CE50; 80min (mg/L)	% fecundação nos controles	Embrio-larval CE50; 24-28h (mg/L)	% pluteus normais nos controles
16/04/96	1	a	23	NR	73
18/06/96	2	-	93	<0,034	88
25/07/96	3	-	0	0,07(0,07-0,08)	91
	4	0,04(0,02-0,11)	50	0,05 (0,04-0,06)	83
17/08/97 ^b	5	>0,11	87	-	-
20/08/97	6	0,09 (0,08-0,09)	95	-	52
21/10/97	7	<0,027	98,5	*	*
05/02/98 ^b	8	< 0,0137	94	-	-
10/02/98	9	0,02 (0,01-0,02)	69	*	*
01/04/98	10*	>0,22	97,7	-	-
	11	0,01 (0,01-0,01)	72,2	-	-
	12	<0,006	66	-	-
29/04/98	13	0,02 (0,02-0,03)	88,2	0,09 (0,08-0,10)	86,5
18/05/98	14	0,01 (0,01-0,02)	85	0,08 (0,08-0,09)	80
04/12/98 ^b	15	0,052 (0,027-0,055)	91,2	*	*
Média		0,034		0,072	
Valor mínimo (X - 2DP)		-0,022		0,038	
Valor máximo (X + 2DP)		0,09		0,106	
DP		0,028		0,017	
CV (%)		82		23,6	

(a) 20% de fecundados na menor concentração testada; (b) realizados em paralelo com outras substâncias; (-) não realizado; (*) não analisado

Tabela 25- Valores das CE50; 60min , CE50; 48h e qualidade dos controles obtidos nos testes de fecundação e desenvolvimento embrio-larval com *Arbacia punctulata* realizados com dodecil sulfato de sódio (DSS) e sulfato de zinco em paralelo aos testes com água de produção. O intervalo de confiança é apresentado entre parênteses. DP = desvio padrão; CV= coeficiente de variação.

Data de Coleta de AP	Testes	Fecundação CE50; 60min (mg/L)		% fecundação nos controles	Embrio-larval CE50; 48h (mg/L)		% pluteus normais nos controles
		DSS	Zinco		DSS	Zinco	
22/10/96	1	3,84 (3,61-4,08)	0,16	98 (98±2,4)	-	-	-
03/12/96	2	5,70 (5,33-6,09)	0,68 (0,61-0,77)	99 (99±0,7)	-	-	-
10/01/97	3	-	0,28 (0,25-0,32)	97,6 (97,6±1,6)	-	0,17 (0,16-0,18)	95,8 (95,8±1,8)
	4	5,8 (5,34-6,31)	0,13 (0,11-0,16)	76,8 (76,8±2,8)	4,0 (3,62-4,41)	0,10 (0,10-0,12)	81,2 (81,2±2,5)
20/2/97	5	5,13 (4,67-5,62)	-	82,2 (82,2±6,1)	4,34 (3,81-4,95)	-	87,8 (87,8±5,6)
	6	4,34 (3,39-4,80)	-	86,6 (86,6±3,6)	-	-	-
20/03/97	7	5,57 (5,11-6,07)	-	92,4 (92,4±1,7)	-	-	-
	8	6,43 (5,96-6,94)	-	90,6 (90,6±6,3)	-	-	82,2 (82,2±4,6)
18/04/97	9	3,27 (2,91-3,68)	-	87,2 (87,2±0,8)	-	-	-
06/05/97*	10	6,65 (6,36-6,96)	-	96,6 (96,6±2,3)	-	-	-
Média		5,19	0,31		4,15	0,13	
Valor mínimo (X - 2DP)		2,89	-0,19		3,75	0,032	
Valor máximo (X + 2DP)		7,49	0,81		4,55	0,228	
DP		1,15	0,25		0,2	0,049	
CV (%)		22,1	80,6		4,8	37,7	

(-) não realizado; (*) teste realizado em paralelo aos testes com amostras coletadas em março e abril/97 eluídas em coluna de C18

Tabela 26- Parâmetros de qualidade da água referentes aos testes com *M. juniae* e *L. variegatus*.

Datas coleta AP e testes	Tratamento	Concentração (% ou mg/L)	OD (mg/L)	Salinidade (‰)	Temperatura (°C)	pH
20/8/97 e 30/8/97	AMF*	0	7,99	35	23	8,035
	AP1	0,7	7,13	35	23	8,018
		45,9	7,32	35	23	7,765
	AP2	0,7	7,38	35	23	8,015
		45,9	7,89	35	23	7,142
	AP3	0,7	6,68	35	23	8,004
45,9		7,67	35	23	6,801	
10/2/98 e 14/2/98	AMF	0	3,21	36	22	8,12
	Zinco	0,0067	3,28	36	22	8,09
		0,22	2,67	36	22	7,97
	AP1	0,23	2,94	36	22	8,09
		59,2	0,65	36	23	7,73
	AP2	0,23	3,02	36	23	8,14
		59,2	1,10	36	23	7,99
	AP3	0,23	2,93	36	22	8,08
59,2		0,79	36	22	7,87	
1/4/98 e 3/4/98	AMF	0	3,64	34	24	7,55
	Zinco	0,00675	4,72	34	24	7,89
		0,22	4,25	34	24	7,95
	AP1	0,3	4,31	34	24	7,89
38,6		4,87	34	24	7,33	
29/4/98 e 4/5/98	AMF	0	7,6	36	25	8,0
	Zinco	0,002	7,6	37	25	7,9
		0,256	7,6	37	25	8,0
	AP1	0,11	7,0	37	25	7,9
		28,3	6,9	34,5	25	7,2
	AP2	0,11	7,6	37	25	8,0
		28,3	8,3	37	25	7,6
	AP3	0,11	7,1	36	25	7,8
28,3		7,7	37	25	8,0	

(*) água do mar filtrada

Tabela 27- Parâmetros de qualidade das amostras de água de produção referentes aos testes com *A. punctulata* conduzidos a salinidade de 30‰ e temperatura de 21± 1°C.

Data da coleta de AP	Data do teste	OD(mg/L) (mín - máx)	pH (mín - máx)	Amônia total (mg/L) (mín - máx)	NH ₃ (µg/L) (mín - máx)	Sulfeto (mg/L) (mín - máx)
10/1/97	17/1/97	6,8	7,7	11,7-25,3	186-402	< 0,1-2,47
20/2/97	27/2/97	5,83-5,85	7,6-7,8	10,3-20,2	237,9-282,8	< 0,1
20/3/97	3/4/97	6,04-6,72	7,5-8,1	0,016-20,5	0,7-258,7	< 0,1
18/4/97	28/4/97	5,55-7,57	7,7-8,0	0,004-24,4	0,1-880	< 0,1

Tabela 28- Parâmetros físico-químicos de amostras brutas não diluídas de água de produção.

Parâmetros	Data da coleta da água de produção			VMP ^a (mg/L)	VRAM ^b (mg/L)	VRCSS ^c (mg/L)
	Abril/96	Junho/96	Julho/96			
Salinidade(‰)	76	68	68	ND	-	32,58
pH	6,97	7,16	6,9	5-9	7,6-8,3	8,12
DBO (mg/L)	1119	1171	404	60	-	3
DQO (mg/L)	2130	2990	1855	ND	-	-
Óleos e graxas (mg/L)	32	100	58,8	20	-	3
Benzeno (µg/L)	-	**	-	0,14 ^d	-	-
Tolueno (µg/L)	-	0,097	-	0,08 ^d	-	-
Xileno (µg/L)	-	**	-	ND	-	-
Fenol (mg/L)	<0,31	1,74	2,87	0,5 0,1 ^d	-	0,004
Nit. Amoniacal (mg/L)	265	705	70,7	5,0	-	0,05
Sulfeto (mg/L)	9,2	<4,0	4,8	1,0	-	-
Surfactantes (mg/L)	0,06	**	-	ND	-	-
Cloreto (mg/L)	37000	62500	42455	ND	20020- 20820	17700
Metais (mg/L)						
Alumínio	<0,10	-	-	ND	-	-
Bário	-	43,5	<0,10	5,0	0,05-0,08	-
Boro	45,0	-	-	5,0	3,4-4,9	-
Cádmio	*	<0,005	0,16	0,2	<0,005-0,1	<0,001
Cálcio	1800	-	-	ND	393-427	-
Cromo	<0,10	0,11	0,20	5,0	<0,02	<0,004
Cobre	<0,10	0,26	<0,10	1,0	0,01-0,03	<0,003
Chumbo	*	0,80	10,8	0,5	<0,03	<0,004
Ferro	3,50	37,9	30	15,0	<0,02-0,5	0,106
Manganês	<0,10	-	-	1,0	<0,002- 0,01	-
Níquel	<0,10	<0,01	<0,10	2,0	<0,02-0,01	<0,006
Vanádio	<0,10	<1,70	0,20	ND	<0,02	<0,1
Zinco	0,53	2,70	0,75	5,0	<0,005	0,017

(-) não realizado; (*) abaixo do limite de detecção; (**) presença de interferentes; (ND) não definido

(a) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes em águas costeiras segundo Legislações Federal e Estadual: Resolução CONAMA 20, art.21, 1986 e Lei 997, art.18, 1976.

(b) Valores de referência para água do mar segundo Tibbetts et al. (1992)

(c) Valores de referência para água do mar no Canal de São Sebastião segundo Moreira et al. (1989)

(d) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes ao mar no Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia (CRA, 1997)

Tabela 29- Parâmetros físico-químicos de amostra não tratada (AP1) e amostras tratadas (AP2 e AP3) de água de produção coletada em agosto de 1997 após diluição com água destilada.

Parâmetro (mg/L)	45,9% de Água de Produção			VMP ^a	MTP ^b
	AP1	AP2	AP3		
Cloreto(Cl)	20000	20000	20000	ND	65111
DBO (5d, 20°C)	533	-	-	60	ND
DQO	1220	-	-	ND	ND
Fenóis (C ₆ H ₅ OH)	0,96	<0,063	0,72	0,5 0,1 ^c	0,55
Nitrogênio amoniacal (N)	56	50	46	5,0	65,7
Óleos e Graxas	264	72	48	20	52,95
pH	7,16	-	-	5-9	ND
SÉRIE DE SÓLIDOS					
Totais	36690	37475	36355	ND	ND
Fixos totais	33.370	33140	33150	ND	ND
Voláteis totais	3320	4335	3205	ND	ND
Dissolvidos totais	33915	36963	36159	ND	84036
Suspensos totais	2775	512	196	ND	133,06
Sedimentáveis mL/L	2,5	1,5	<0,1	1,0	ND
Dissolvidos fixos	32285	32812	33008	ND	ND
Dissolvidos Voláteis	1630	4151	3151	ND	ND
Suspensos fixos	1085	328	142	ND	ND
Suspensos voláteis	1690	184	54	ND	ND
Sulfeto(S)	<0,8	<0,8	<0,8	1,0	ND
Benzeno	0,95	1,0	0,96	0,14 ^c	4,28
Etil benzeno	0,08	0,11	0,04	0,11 ^c	0,115
Tolueno	0,61	0,67	0,41	0,08 ^c	3,37
Xileno	0,18	0,23	0,13	ND	0,136
Surfactantes (MBAS)	<0,20	<0,20	<0,20	ND	ND
Salinidade (‰)	35	35	35	ND	ND

(-) não realizado; (ND) não definido;

(a) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes em águas costeiras segundo Legislações Federal e Estadual: Resolução CONAMA 20, art.21, 1986 e Lei 997, art.18, 1976.

(b) Concentrações máximas permitidas na água de produção após tratamento através da melhor tecnologia praticável (MTP) (13, abril, 1979, EPA)

(c) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes ao mar no Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia (CRA, 1997)

Tabela 30- Parâmetros físico-químicos de amostra não tratada (AP1) e amostras tratadas (AP2 e AP3) de água de produção coletada em outubro de 1997 após diluição com água destilada.

Parâmetro (mg/L)	43,6% de Água de Produção			VMP ^a	MTP ^b
	AP1	AP2	AP3		
Cloreto(Cl)	20900	20650	21150	ND	65.111
DBO (5d, 20°C)	583	-	-	60	ND
DQO	797	-	-	ND	ND
Fenóis (C ₆ H ₅ OH)	0,14	0,18	0,28	0,5 0,1 ^c	0,55
Nitrogênio amoniacal (N)	110	110	90	5,0	65,7
Óleos e Graxas	42	14	22	20	52,95
pH	7,01	-	-	5-9	ND
SÉRIE DE SÓLIDOS					
Totais	37.140	38100	37835	ND	ND
Fixos totais	33.910	34220	36635	ND	ND
Voláteis totais	3230	3880	1200	ND	ND
Dissolvidos totais	36768	37738	37593	ND	84.036
Suspensos totais	372	362	242	ND	133,06
Sedimentáveis mL/L	0,3	0,6	<0,1	1,0	ND
Dissolvidos fixos	33566	33880	36433	ND	ND
Dissolvidos Voláteis	3202	3858	1160	ND	ND
Suspensos fixos	344	340	202	ND	ND
Suspensos voláteis	28	22	40	ND	ND
Sulfeto(S)	0,8	2,0	2,0	1,0	ND
Benzeno	<0,008	<0,008	0,041	0,14 ^c	4,28
Etil benzeno	<0,006	<0,006	<0,006	0,11 ^c	0,115
Tolueno	<0,008	<0,008	0,011	0,08 ^c	3,37
Xileno	<0,010	<0,010	0,010	ND	0,136
Surfactantes (MBAS)	<0,40	<0,40	<0,40	ND	ND
Salinidade (%)	34	34	34	ND	ND

(-) não realizado; (ND) não definido;

(a) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes em águas costeiras segundo Legislações Federal e Estadual: Resolução CONAMA 20, art.21, 1986 e Lei 997, art.18, 1976.

(b) Concentrações máximas permitidas na água de produção após tratamento através da melhor tecnologia praticável (MTP) (13, abril, 1979, EPA)

(c) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes ao mar no Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia (CRA, 1997)

Tabela 31- Parâmetros físico-químicos de amostra não tratada (AP1) e amostras tratadas (AP2 e AP3) de água de produção coletada em fevereiro de 1998 após diluição com água destilada.

Parâmetro (mg/L)	59,2% de Água de Produção			VMP ^a	MTP ^b
	AP1	AP2	AP3		
Cloreto(Cl)	21400	21000	20700	ND	65.111
DBO (5d, 20°C)	476	NR	NR	60	ND
DQO	2570	NR	NR	ND	ND
Fenóis (C ₆ H ₅ OH)	0,84	0,18	0,83	0,5 0,1 ^c	0,55
Nitrogênio amoniacal (N)	55	61	61	5,0	65,7
Oleos e Graxas	64	44	56	20	52,95
PH	6,93	NR	NR	5-9	ND
SÉRIE DE SÓLIDOS					
Totais	39280	37625	37405	ND	ND
Fixos totais	30890	31725	29405	ND	ND
Voláteis totais	8390	5900	8000	ND	ND
Dissolvidos totais	39030	37345	37179	ND	84.036
Suspensos totais	250	280	226	ND	133,06
Sedimentáveis mL/L	<0,1	<0,1	<0,1	1,0	ND
Dissolvidos fixos	30726	31573	29241	ND	ND
Dissolvidos Voláteis	8304	5772	7938	ND	ND
Suspensos fixos	164	152	164	ND	ND
Suspensos voláteis	86	128	62	ND	ND
Sulfeto(S)	51,2	<0,8	<0,8	1,0	ND
Benzeno	3,835	2,889	1,050	0,14 ^c	4,28
Etil benzeno	1,430	1,317	0,433	0,11 ^c	0,115
Tolueno	6,612	5,452	2,030	0,08 ^c	3,37
Xileno	9,718	9,718	3,010	ND	0,136
Surfactantes (MBAS)	0,10	<0,40	0,13	ND	ND
Salinidade (‰)	36	36	36	ND	ND

(-) não realizado; (ND) não definido;

(a) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes em águas costeiras segundo Legislações Federal e Estadual: Resolução CONAMA 20, art.21, 1986 e Lei 997, art.18, 1976.

(b) Concentrações máximas permitidas na água de produção após tratamento através da melhor tecnologia praticável (MTP) (13, abril, 1979, EPA)

(c) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes ao mar no Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia (CRA, 1997)

Tabela 32- Parâmetros físico-químicos de amostra não tratada (AP1) e amostras tratadas (AP2 e AP3) de água de produção coletada em abril de 1998 após diluição com água destilada.

Parâmetro (mg/L)	28,3% de Água de Produção			VMP ^a	MTP ^b
	AP1	AP2	AP3		
Cloreto(Cl)	14750	17500	17750	ND	65.111
DBO (5d, 20°C)	225	-	-	60	ND
DQO	661	-	-	ND	ND
Fenóis (C ₆ H ₅ OH)	<0,063	<0,063	<0,063	0,5 0,1 ^c	0,55
Nitrogênio amoniac. (N)	610	78	74	5,0	65,7
Óleos e Graxas	12	40	8	20	52,95
pH	6,5	-	-	5-9	ND
SÉRIE DE SÓLIDOS					
Totais	33010	33760	38140	ND	ND
Fixos totais	29735	31490	32520	ND	ND
Voláteis totais	3275	2270	5620	ND	ND
Dissolvidos totais	32722	33264	37954	ND	84036
Suspensos totais	288	496	186	ND	133,06
Sedimentáveis mL/L	<0,1	0,4	0,1	1,0	ND
Dissolvidos fixos	29571	31122	32346	ND	ND
Dissolvidos Voláteis	3151	2142	5608	ND	ND
Suspensos fixos	164	368	174	ND	ND
Suspensos voláteis	124	128	12	ND	ND
Sulfeto(S)	4,8	2,8	<0,8	1,0	ND
Benzeno	0,513	0,490	0,329	0,14 ^c	4,28
Etil benzeno	0,080	0,160	0,033	0,11 ^c	0,115
Tolueno	0,415	0,478	0,229	0,08 ^c	3,37
Xileno	0,375	0,438	0,109	ND	0,136
Surfactantes (MBAS)	0,09	0,08	0,14	ND	ND
Salinidade (%)	34	37	37	ND	ND

(-) não realizado; (ND) não definido;

(a) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes em águas costeiras segundo Legislações Federal e Estadual: Resolução CONAMA 20, art.21, 1986 e Lei 997, art.18, 1976.

(b) Concentrações máximas permitidas na água de produção após tratamento através da melhor tecnologia praticável (MTP) (13, abril, 1979, EPA)

(c) Valores máximos permitidos para lançamento de efluentes ao mar no Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia (CRA, 1997)

Tabela 33- Concentrações de metais (mg/L) em amostras não tratadas (API) e diluídas de água de produção.

Metais (mg/L)	Amostras Diluídas de Água de Produção				VMP ^a (mg/L)	MTP ^b (mg/L)	Valores Referência p/ Água do mar c/ 35‰ (mg/L)	VRCSS ^d (mg/L)
	Ago/97 45,9% API	Out/97 43,6% API	Fev/98 59,2% API	Abr/98 28,3% API				
Cálcio (Ca)	2040	2210	1776	2595	ND	2501	393-427	-
Estrôncio (Sr)	201	225	104	220	ND	205,5	13	-
Magnésio (Mg)	1000	450	516	377	ND	615,7	1295	-
Potássio (K)	410	310	304	648	ND	ND	390	-
Bário (Ba)	22,3	45,2	10,6	28,4	5,0	52,57	ND	-
Chumbo (Pb)	0,3	<0,1	0,14	<0,1	0,5	0,515	ND	<0,0004
Cobre (Cu)	0,15	0,04	<0,01	<0,01	1,0	0,180	ND	<0,005
Ferro (Fe)	22,6	5,48	1,35	1,33	15	15,49	ND	0,106
Zinco (Zn)	2,09	1,11	0,16	0,57	5,0	0,329	ND	0,017

(a) VMP= valores máximos permitidos para lançamento de efluentes em águas costeiras segundo Legislações Federal e Estadual. Resolução CONAMA 20, art. 21, 1986 e Lei 997, art. 18, 1976.

(b) Concentrações máximas permitidas na água de produção após tratamento através da melhor tecnologia praticável (MTP) (13 abril 1979, EPA)

(c) Nikol et al., 1967 (Glossário de Ecologia, 1997)

(d) Moreira et al. (1989)

(ND) não definido

Tabela 34- Valores de amônia total obtidos em intervalos de 2h após exposição a diferentes concentrações de água de produção não tratada à 10g e 20g da alga *Ulva* sp em 4/12/96.

Água de produção (%)	Salinidade (‰)	Duração (hora)	<i>Ulva</i> sp					
			10g/80mL			20g/80mL		
			pH	Amônia total (mg/L)	Redução (%)	pH	Amônia total (mg/L)	Redução (%)
21,3	30	0	7,34	11,2	-	7,34	11,2	-
		2	7,36	5,8	48,2	7,19	4,2	62,5
		4	7,23	3,5	68,7	7,16	2,3	79,5
		6	7,04	3,6	67,8	6,81	4,2	62,5
		6*	7,75	23,3	-	-	-	-
42,7	30	0	7,22	25,5	-	7,22	25,5	-
		2	7,19	18,9	25,9	7,11	14,0	45,1
		4	7,00	11,8	53,7	7,00	9,6	62,3
		6	6,95	14,0	45,1	6,82	12,8	49,8
		6*	7,16	49,4	-	-	-	-
100	70	0	6,87	55	-	6,87	55	-
		2	7,04	49,6	9,8	7,02	33,3	39,4
		4	7,08	37,2	32,4	6,85	27,5	50,0
		6	6,84	66,5	-	6,58	50,0	9,1
		6*	7,20	120	-	-	-	-

(*) sem alga

Tabela 35- Valores de amônia total e não ionizada (NH₃) de água de produção bruta e tratada com peróxido de hidrogênio antes e após adição de *Ulva* sp (20g/80mL) em 5/2/97.

44% de água de produção	Duração (hora)	pH	Amônia total (mg/L)	Remoção de amônia (%)	NH ₃ (µg/L)	Remoção de NH ₃ (%)
Bruta	0	7,93	31,6	-	850,8	-
	4	7,45	16,0	49,4	144,3	83
	5*	7,45	10,9	65,5	98,3	88
Tratada com peróxido	0	7,93	27,0	-	726,9	-
	4	7,45	8,3	69,2	75,2	89,6
	5*	7,44	6,5	75,9	58,6	91,9

(*) análise realizada após centrifugação da amostra

Tabela 36- Parâmetros físico-químicos das amostras brutas de água de produção utilizadas nos experimentos com *Ulva* sp realizados em 6/2/98 e 3/4/98 no Brasil.

Data da coleta de AP	Salinidade (‰)	pH	Amônia total (mg/L)	Fenol (mg/L)	Sulfeto (mg/L)
5/2/98	67	7,0	150	0,6	40
1/4/98	88	6,6	500	2,0	18

Tabela 37- Valores de pH, amônia total e não ionizada em diferentes amostras com salinidade de 34±1‰ antes e após 4 horas de exposição à alga *Ulva* sp à temperatura de 24±1°C.

Data e local coleta	Data experimento	Tipo de amostra	Duração (hora)	pH	Amônia total (mg/L)	NH ₃ (µg/L)	Remoção de amônia total (%)
5/2/98 Araçá	6/2/98	52% de água de produção	0	7,07	≥ 5,0	-	-
			4	6,61	2,5	4,6	-
2/4/98 praia do Lázaro	3/4/98	38,6% de água de produção	0	7,09	≥ 5,0	-	-
			4	6,74	≥ 5,0	-	-
		Água do mar filtrada	0	8,1	-	-	-
			4	7,5	-	-	-
		5mg de NH ₄ Cl	0	8,0	5,0	214	-
			4	7,3	1,0	9,5	80
30/11 Araçá	4/12/98	Água do mar filtrada	0	7,6	-	-	-
			4	7,3	-	-	-
		5mg de NH ₄ Cl	0	7,7	5,0	102	-
			4	7,4	2,5	26	50
		10mg de NH ₄ Cl	0	7,6	10,0	162	-
			4	7,5	5,0	64	50

Tabela 38- Valores de pH e amônia não ionizada (NH₃) em diferentes concentrações nominais de cloreto de amônia (NH₄Cl) à salinidade de 34‰ e temperatura de 24°C.

NH ₄ Cl (mg/L)	Data dos experimentos			
	3/4/98		4/12/98	
	pH	NH ₃ (µg/L)	pH	NH ₃ (µg/L)
Água do mar	7,87	-	7,6	-
0,312	7,91	9,9	7,5	4,0
0,625	7,86	19,9	7,5	8,1
1,25	7,85	31,8	7,6	20,2
2,5	7,84	63,7	7,7	51
5,0	7,92	159	7,7	102
10,0	-	-	7,6	162

Tabela 39- Valores médios de fecundação para o ouriço *S. purpuratus* após exposição a amostras brutas (AP1) e tratadas (AP2) de água de produção manipuladas através dos procedimentos de filtração, coluna de C18 e diferentes valores de pH.

Fracionamento	43,6% de água de produção	Número médio de óvulos fecundados (%)
-	Controle AMF	93
Baseline	AP1	0
	AP2	0
	AP3	0
Filtração	AP1	69
	AP2	63
	AP3	58
C18	Controle AMF	98,7
	AP1	82
pH 6,5	AP1	0
	AP2	78
	AP3	17
pH 7,5	AP1	0
	AP2	65
	AP3	29
pH 8,5	AP1	-
	AP2	0
	AP3	0

(AMF) água do mar filtrada; (-) não realizado

Tabela 40- Valores de CE50 para peróxido de hidrogênio, EDTA e tiosulfato de sódio obtidos nos testes de fecundação com *A. punctulata* e *L. variegatus*.

Teste de fecundação	Data	CE50 (mg/L)				
		DSS	Zinco	H ₂ O ₂	EDTA	Tiosulfato
<i>A. punctulata</i> (60min.)	29/4/97	3,27 (2,91-3,68)	-	10,67 (8,01-14,2)	-	-
<i>L. variegatus</i> (80 min.)	17/8/97	-	>0,11	-	199,61 (117,8-338,2)	298,19 (250,1-355,5)
	5/2/98	-	<0,0137	<3,12	213,41 (207,06-219,96)	>800
	1/4/98	-	>0,22	-	334,74 (328,27-341,33)	>800

(-) não realizado

Tabela 41- Resultados dos testes de fecundação com *A. punctulata* realizados com amostra de água de produção coletada em fevereiro de 1997 e submetida a 6 fracionamentos físico-químicos.

Data	Água de Produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	6,2% AP (% Fec.)	CE ₅₀ ;1h (%) (IC)	
27/02/97	-	DSS (mg/L)	87	-	4,34 (3,39-4,80)	
	Não Tratada (AP1)	Baseline* (Referência)	87	0	0,56	(0,55-0,57)
		Aeração	-	0	0,58	(0,55-0,60)
		Filtração	87	25	4,55	(4,16-4,97)
		EDTA	-	0	0,56	(0,54-0,57)
		Tiosulfato de sódio	-	0	0,56	(0,54-0,57)
		C ₁₈	76	64	16,2	(14,4-18,2)
		<i>Ulva</i> sp	-	0	1,24	(1,18-1,30)
	Oxidação química (AP2)	Baseline* (Referência)	87	0	0,76	(0,71-0,82)
		Aeração	-	0	1,00	(0,93-1,08)
		Filtração	87	55	7,45	(6,71-8,28)
		EDTA	-	0	1,01	(0,93-0,94)
		Tiosulfato de sódio	-	0	0,88	(0,82-0,94)
		C ₁₈	76	83	9,31	(9,03-9,60)
		<i>Ulva</i> sp	-	76	8,26	(7,90-8,64)

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada; (-) não realizado



Tabela 42- Resultados dos testes de fecundação com *A. punctulata* realizados com amostra de água de produção coletada em março de 1997e submetida a 6 fracionamentos físico-químicos.

Data	Água de Produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	26,4% AP (%Fec.)	CE _{50;1h} (%) (IC)
3/04/97	-	DSS (mg/L)	91	-	6,43 (5,96-6,94)
	Não Tratada (AP1)	Baseline* (Referência)	94	0	0,24 (0,18-0,31)
		Aeração	51	0	0,16 (0,12-0,22)
		Filtração	94	17	11,32 (9,83-13,03)
		EDTA	95	0	0,40 (0,36-0,45)
		Tiosulfato de sódio	92	0	0,73 (0,61-0,87)
		C ₁₈	37	54	>26,4
		<i>Ulva</i> sp	-	68**	30,08 (27,14-33,34)
	Oxidação química (AP2)	Baseline* (Referência)	94	0	0,33 (0,25-0,43)
		Aeração	51	0	<0,01
		Filtração	94	41	20,91 (14,95-29,25)
		EDTA	90	0	0,49 (0,36-0,66)
		Tiosulfato de sódio	85	0	0,50 (0,39-0,64)
		C ₁₈	51	83	>26,4
<i>Ulva</i> sp		-	59**	19,94 (14,69-27,05)	

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada; (-) não realizado;
 (**) concentração de 21,1% de AP

Tabela 43- Resultados dos testes de fecundação com *A. punctulata* realizado com amostra de água de produção coletada em abril de 1997 e submetida a 6 fracionamentos físico-químicos.

Data	Água de Produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	48,4% AP (% Fec.)	CE _{50;1h} (IC) (%)
29/04/97	-	DSS (mg/L)	87	-	3,27(2,91-3,68)
	Não tratada (AP1)	Baseline* (Referência)	85	0	0,43(0,35-0,52)
		Aeração	21	0	0,49(0,46-0,52)
		Filtração	86	0	0,96(0,86-1,07)
		EDTA	93	0	6,03(5,22-6,98)
		Tiosulfato	93	0	0,16(0,14-0,18)
		C ₁₈	47	0	5,46(5,09-5,86)
		<i>Ulva</i> sp	96	0	0,60(0,60-0,75)
	Oxidação química (AP2)	Baseline* (Referência)	84	0	0,15(0,13-0,17)
		Aeração	37	0	0,50(0,44-0,56)
		Filtração	76	0	4,43(3,55-5,52)
		EDTA	96	0	0,38(0,35-0,41)
		Tiosulfato	84	0	0,38(0,35-0,42)
		C ₁₈	60	35	12,53(7,28-21,59)
		<i>Ulva</i> sp	96	72	>48,4
	Flotação + Oxidação química (AP3)	Baseline* (Referência)	68	0	0,60(0,50-0,72)
		Aeração	12	0	2,06(1,68-2,54)
		Filtração	72	7	10,19(7,99-12,98)
		EDTA	89	0	1,22(1,09-1,37)
		Tiosulfato	93	0	1,33(1,20-1,47)
		C ₁₈	63	8	29,76(27,19-32,57)
<i>Ulva</i> sp		96	88	>48,4	

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada

Tabela 44- Resultados dos testes de fecundação com *L. variegatus* realizados com amostra de água de produção coletada em agosto de 1997 e submetida a 6 fracionamentos físico-químicos.

25/8/97	Água de produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	45,9% AP (% Fec.)	CE50; 80min. (IC) (%)
		Zinco (mg/L)	95	-	0,09(0,08-0,09)
	Não tratada (AP1)	Baseline* (Referência)	95	0	24,29(22,7-25,9)
		Aeração	99	0	26,86(25,34-28,48)
		Filtração	100	16	34(33,15-34,87)
		EDTA	99	55	45,10(39,87-51)
		Tiosulfato	95	0	18,51(17,56-19,52)
		C ₁₈	99	100	>45,9
		<i>Ulva</i> sp	-	-	-
	Oxidação Química (AP2)	Baseline* (Referência)	95	98	>45,9
		Aeração	99	96	>45,9
		Filtração	100	98	>45,9
		EDTA	99	0	28,82(27,36-30,36)
		Tiosulfato	95	0	16,80(15,17-18,59)
		C ₁₈	29	6	33,70(32,84-34,58)
		<i>Ulva</i> sp	-	1,5	9,10(7,77-10,66)
	Flotação + Oxidação Química (AP3)	Baseline* (Referência)	95	0	10,04(9,42-10,70)
		Aeração	99	0	6,36(5,67-7,14)
		Filtração	100	0	<0,17
		EDTA	99	0	4,79(4,34-5,29)
		Tiosulfato	95	0	<0,17
		C ₁₈	96	90	>45,9
		<i>Ulva</i> sp	-	0	9,10(8,60-9,64)

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada

Tabela 45- Resultados dos testes de fecundação com *Lytechinus variegatus* realizados com amostra de água de produção coletada em outubro de 1997e submetida a 6 fracionamentos físico-químicos.

27/10/97	Água de produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	43,6% AP (% Fec.)	CE50; 80min.(IC) (%)
		Zinco (mg/L)	98	-	< 0,027
	Não tratada (AP1)	Baseline* (referência)	98	0	7,59(7,43-7,76)
		Aeração	91	0	7,13(6,69-7,58)
		Filtração	12	11	33,81(32,31-35,37)
		EDTA	98	0	19,73(18,21-21,37)
		Tiosulfato	91	0	7,13(6,69-7,58)
		C ₁₈	79	27	35,45(33,14-37,92)
		<i>Ulva</i> sp	12	94	>43,6
	Oxidação Química (AP2)	Baseline* (referência)	98	0	7,29(6,94-7,65)
		Aeração	91	0	7,68(7,51-7,85)
		Filtração	12	60	>43,6
		EDTA	98	83	>43,6
		Tiosulfato	91	0	10,17(9,2-11,24)
		C ₁₈	66	88	>43,6
		<i>Ulva</i> sp	12	86	>43,6
	Flotação + Oxidação Química (AP3)	Baseline* (referência)	98	0	3,84(NC)
		Aeração	91	0	10,75(10,03-11,52)
		Filtração	12	84	>43,6
		EDTA	98	0	23,03(21,31-24,89)
		Tiosulfato	91	0	6,59(6,10-7,12)
		C ₁₈	91	82	>43,6
		<i>Ulva</i> sp	12	94	>43,6

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada; (NC) não calculável

Tabela 46- Resultados dos testes de fecundação com *Lytechinus variegatus* realizados com amostra de água de produção coletada em fevereiro de 1998 e submetida a 6 fracionamentos físico-químicos.

13/2/98	Água de produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	59,2% AP (% Fec.)	CE50; 80min.(IC) (%)
		Zinco (mg/L)	69	-	0,02(0,01-0,02)
	Não tratada (AP1)	Baseline* (referência)	69	0	1,82(1,57-2,11)
		Aeração	65	0	3,92(3,14-4,88)
		Filtração	80	0	5,06(4,72-5,42)
		EDTA	71	0	10,97(9,15-13,13)
		Tiosulfato	67	0	2,76(2,66-2,87)
		C ₁₈	82	2	40,63(38,85-42,48)
		<i>Ulva</i> sp	28	1,5	25,25(23,57-27,04)
	Oxidação Química (AP2)	Baseline* (referência)	69	0	4,75(4,53-4,98)
		Aeração	65	0	5,12(4,97-5,28)
		Filtração	80	0	22,38(20,97-23,89)
		EDTA	71	0	25,60(23,09-28,39)
		Tiosulfato	67	0	5,23(NC)
		C ₁₈	71	37	49,7
		<i>Ulva</i> sp	28	39	28,82(25,36-32,76)
	Flotação + Oxidação Química (AP3)	Baseline* (referência)	69	0	5,31(5,06-5,58)
		Aeração	65	0	3,58(3,30-3,89)
		Filtração	80	2	42,31(41,78-42,85)
		EDTA	71	0	10,91(9,01-13,21)
		Tiosulfato	67	0	4,23(3,95-4,52)
		C ₁₈	84	95	>59,2
		<i>Ulva</i> sp	28	64	>59,2

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada; (NC) não calculável

Tabela 47- Resultados dos testes de fecundação com *Lytechinus variegatus* realizados com amostra de água de produção coletada em abril de 1998 e submetida a 7 fracionamentos físico-químicos.

3/5/98	Água de produção/ tratamento	Teste	Controle (% Fec.)	28,3% AP (% Fec.)	CE50; 80min.(IC) (%)
		Zinco (mg/L)	88	-	0,02(0,02-0,03)
Não tratada (AP1)	Baseline* (referência)	88	1	10,59(10,11-11,09)	
	Aeração	85	0	20,05(19,9-20,19)	
	Filtração	96	59	>28,3	
	EDTA	93	75	>28,3	
	Tiossulfato	77	6	10,95(9,60-12,50)	
	C ₁₈	98	55	>28,3	
	<i>Ulva</i> sp	91	40	25,98(23,36-28,89)	
	Zeolite	66	18	13,58(11,39-16,19)	
Oxidação Química (AP2)	Baseline* (referência)	88	0	10,09(9,97-10,22)	
	Aeração	85	1	11,87(11,16-12,63)	
	Filtração	96	1	18,59(17,63-19,60)	
	EDTA	93	1	18,28(17,39-19,21)	
	Tiossulfato	77	1	7,59(6,22-9,27)	
	C ₁₈	83	93	>28,3	
	<i>Ulva</i> sp	91	4	18,73(17,63-19,90)	
	Zeolite	66	1	17,65(16,68-18,66)	
Flotação + Oxidação Química (AP3)	Baseline* (referência)	88	1	11,87(11,14-12,65)	
	Aeração	85	1	15,10(14,08-16,20)	
	Filtração	96	0	15,87(14,76-17,06)	
	EDTA	93	16	20,99(20,11-21,92)	
	Tiossulfato	77	2	11,48(10,09-13,07)	
	C ₁₈	91	3	20,05(19,66-20,45)	
	<i>Ulva</i> sp	91	37	24,93(22,51-27,61)	
	Zeolite	66	0	20,05(19,90-20,19)	

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada

Tabela 48- Resultados dos testes de desenvolvimento embrio-larval com *Lytechinus variegatus* realizados com amostra de água de produção coletada em abril de 1998 e submetida a 5 fracionamentos físico-químicos.

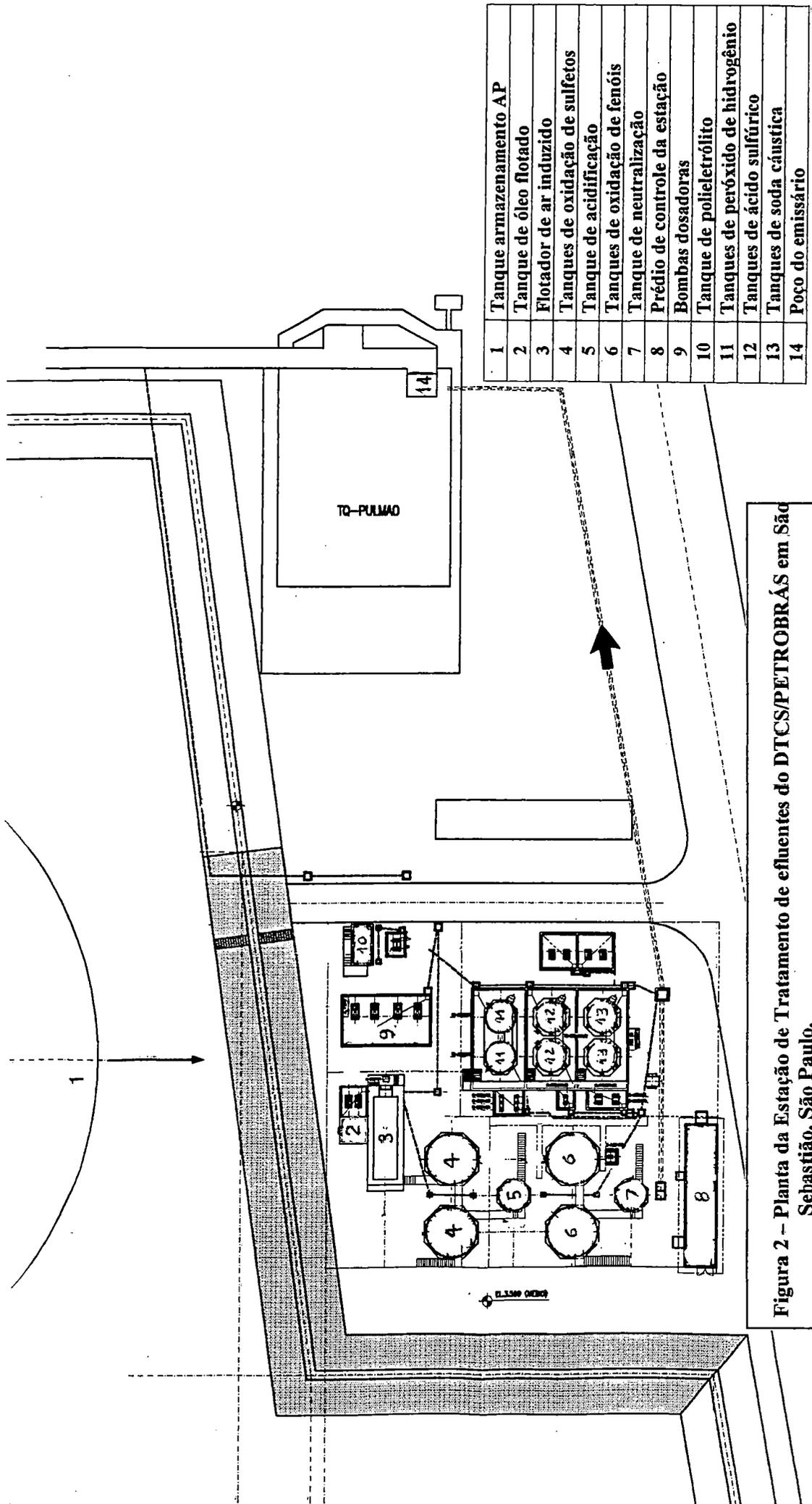
3/5/98	Água de produção/ tratamento	Teste	Controle (% pluteus)	0,88% AP (% pluteus)	CE50; 24h (IC) (%)
		Zinco (mg/L)	89	-	0,09(0,08-0,10)
	Não tratada (AP1)	Baseline* (referência)	89	13	0,65(0,61-0,69)
		Filtração	81	0	<0,88
		EDTA	89	41	0,89
		C ₁₈	75	9	<0,88
		<i>Ulva</i> sp	8	54	1,05(0,98-1,13)
		Zeolite	95	42	0,92
	Oxidação Química (AP2)	Baseline* (referência)	89	0	0,54(0,50-0,58)
		Filtração	81	23	<0,88
		EDTA	89	44	0,93(0,82-1,05)
		C ₁₈	75	89	1,24
		<i>Ulva</i> sp	8	74	1,23(1,20-1,27)
		Zeolite	95	51	1,02
	Flotação + Oxidação Química (AP3)	Baseline* (referência)	89	0	0,38(0,33-0,43)
		Filtração	81	31	<0,88
		EDTA	89	47	0,98
		C ₁₈	75	88	1,24
		<i>Ulva</i> sp	8	74	1,23(1,20-1,27)
		Zeolite	95	51	1,02

(*) teste realizado com amostra de água de produção não fracionada

8. FIGURAS



Figura 1- Tanque de armazenamento de efluentes do DTCS/PETROBRÁS em São Sebastião, São Paulo.



1	Tanque armazenamento AP
2	Tanque de óleo flotado
3	Flotador de ar induzido
4	Tanques de oxidação de sulfetos
5	Tanque de acidificação
6	Tanques de oxidação de fenóis
7	Tanque de neutralização
8	Prédio de controle da estação
9	Bombas dosadoras
10	Tanque de polieletrólito
11	Tanques de peróxido de hidrogênio
12	Tanques de ácido sulfúrico
13	Tanques de soda cáustica
14	Poço do emissário

Figura 2 - Planta da Estação de Tratamento de efluentes do DTCS/PETROBRÁS em São Sebastião, São Paulo.



Figura 3- Vista geral da Estação de Tratamento de Efluentes do DTCS/PETROBRÁS em São Sebastião, São Paulo.

- 1- Tanque de polieletrólito
- 2- Bombas dosadoras
- 3- Tanque de óleo flotado
- 4- Flotador de ar induzido
- 5- Tanques de oxidação de sulfetos
- 6- Tanque de acidificação
- 7- Tanques de oxidação de fenóis
- 8- Tanque de neutralização
- 9- Tanques de peróxido de hidrogênio
- 10- Tanques de ácido sulfúrico
- 11- Tanques de soda cáustica
- 12- Prédio de controle da ETE



Figura 4- Vista aérea do Terminal Petrolífero da PETROBRÁS e do canal de São Sebastião, SP.



Figura 5- Rede de coleta de misidáceos.

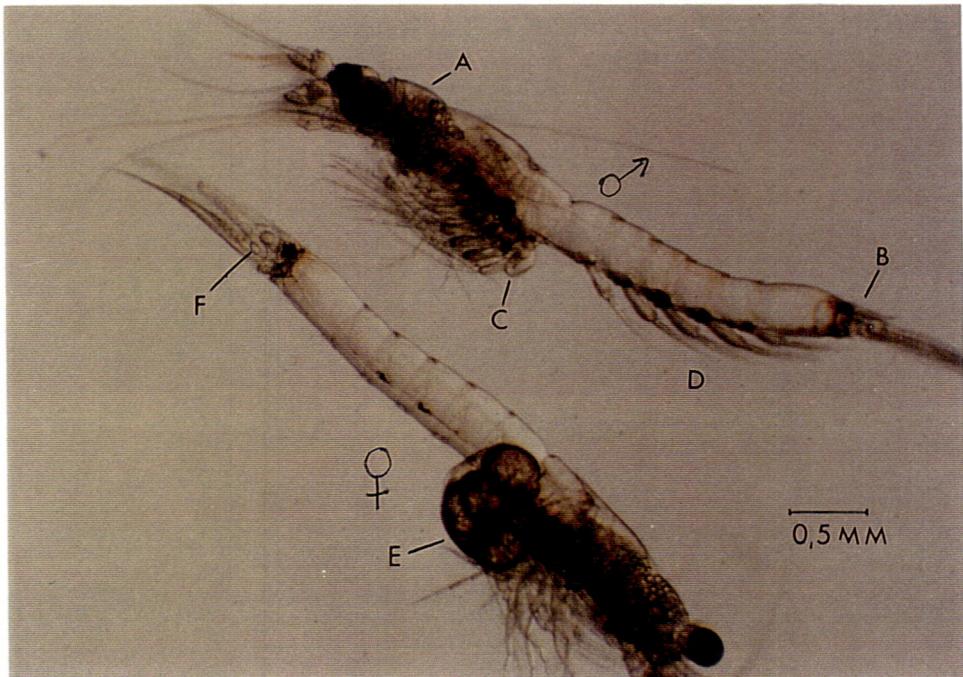


Figura 6- Macho e fêmea adultos de *Mysidopsis juniae*.
A- rostró, B- telson, C- gônada, D- pleópodos, E- marsúpio com ovos, F- estatocisto

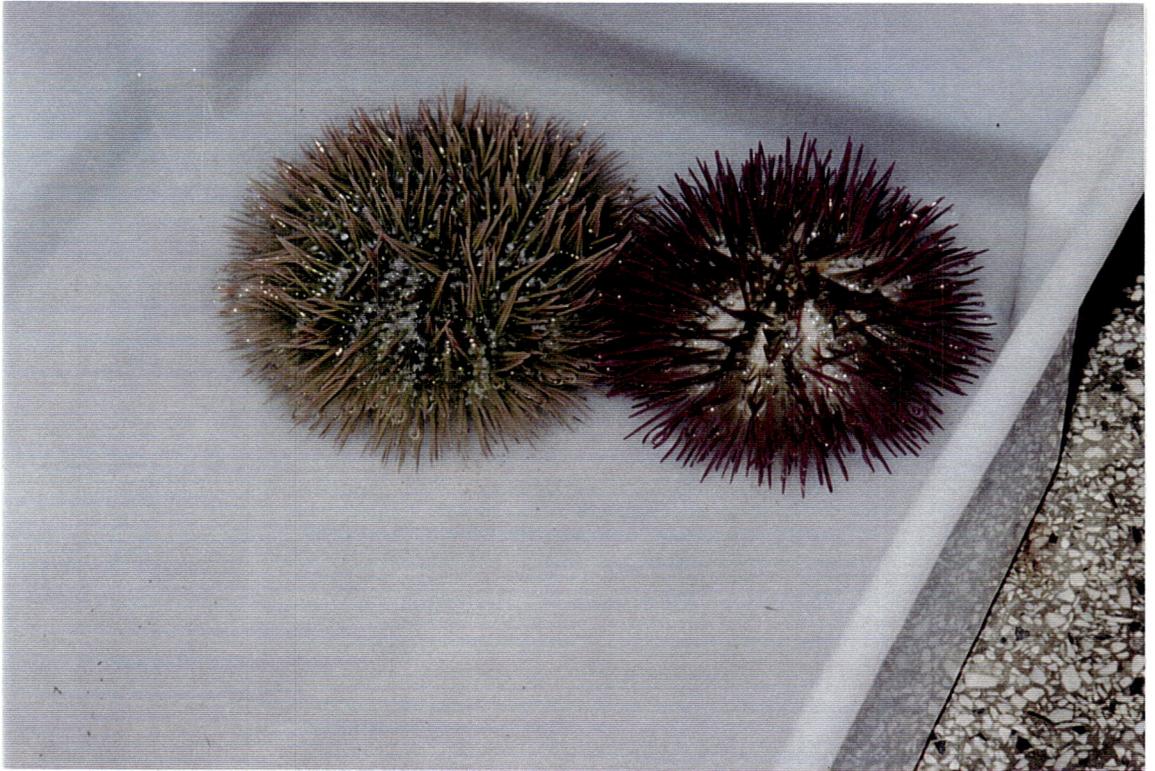


Figura 7a- Indivíduos adultos de *Lytechinus variegatus*.



Figura 7b- Injeção de KCl para liberação de gametas.



Figura 8- Estimulação elétrica para liberação de gametas em *Arbacia punctulata*.



Figura 9- Machos adultos de *A. punctulata* alimentando-se de alface.

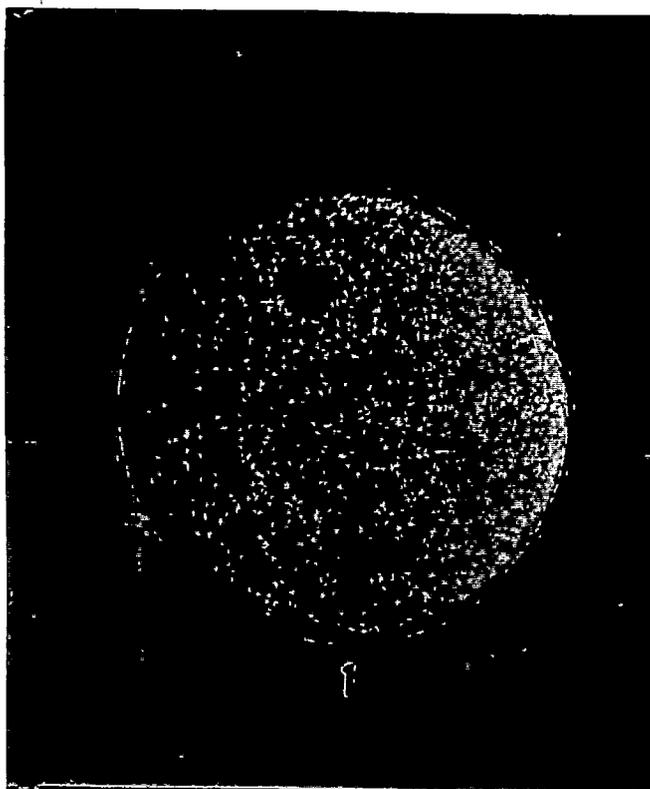


Figura 10a- Óvulo não fecundado de *L. variegatus*.

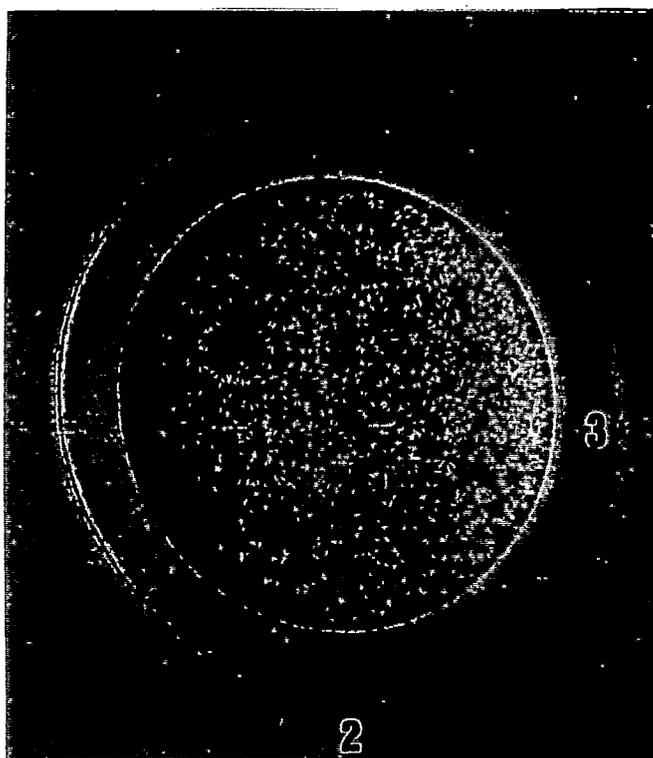


Figura 10b- Óvulo fecundado de *L. variegatus* com a presença de membrana de fecundação (3)
(fotos gentilmente cedidas por Ademilson Zamboni)



Figura 11- Óvulo e ovo de *Arbacia punctulata*.
(foto gentilmente cedida pelo Dr. Robert Scott Carr)

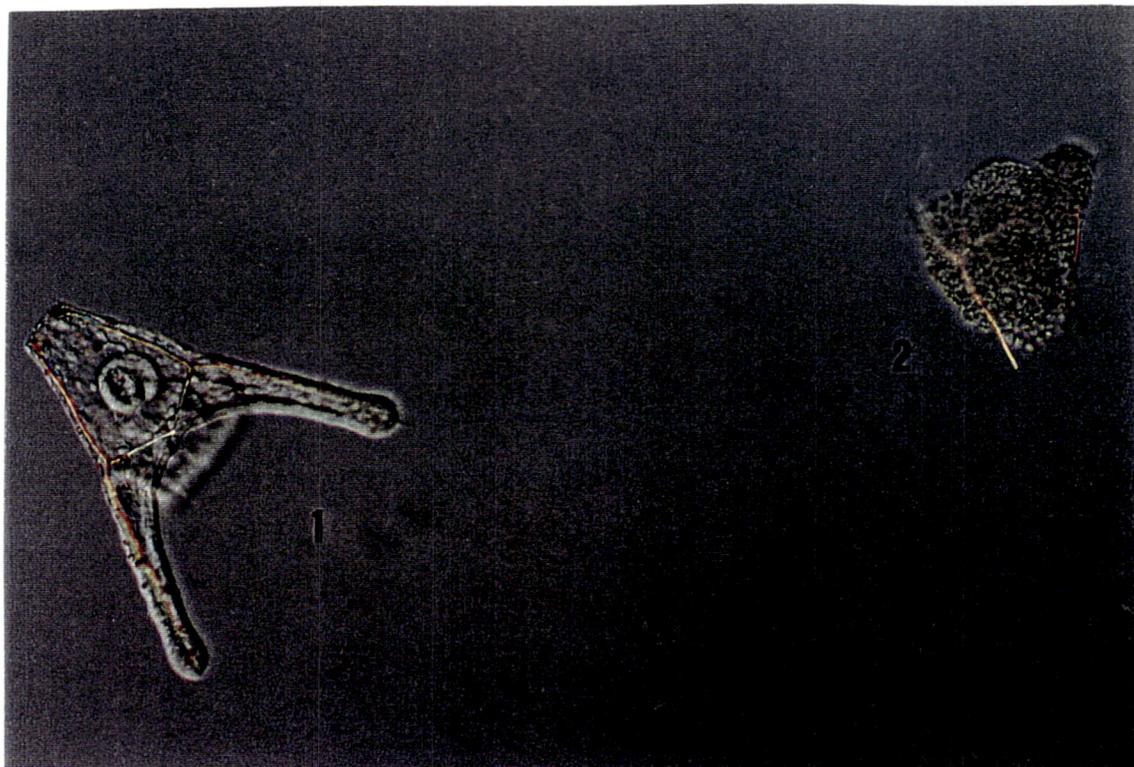


Figura 12a,b- Larva pluteus normal (1) e não desenvolvida (2) de *L. variegatus*.
(foto gentilmente cedida por Ademilson Zamboni).

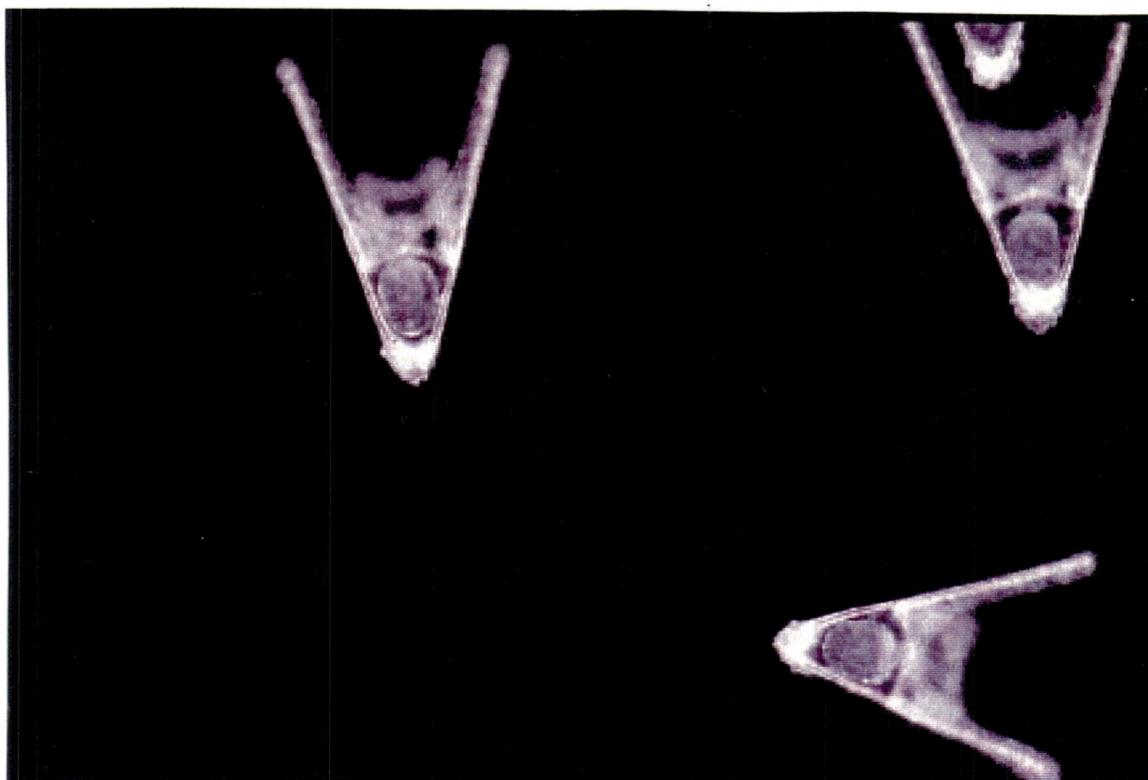
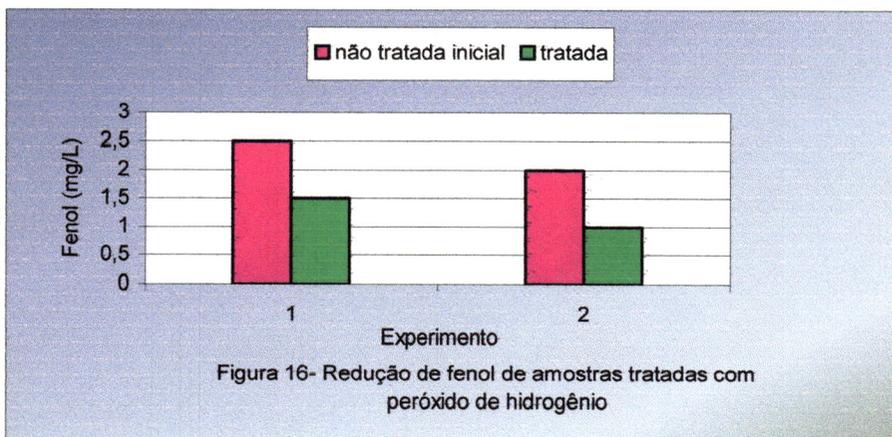
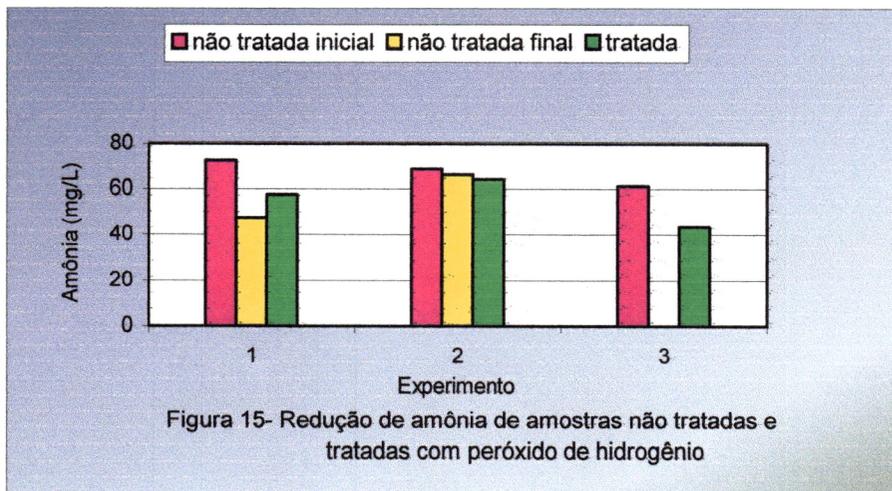
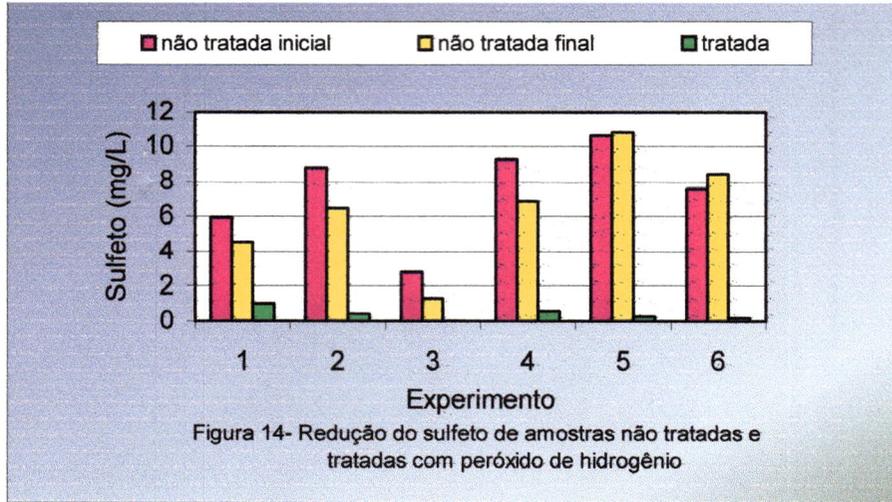
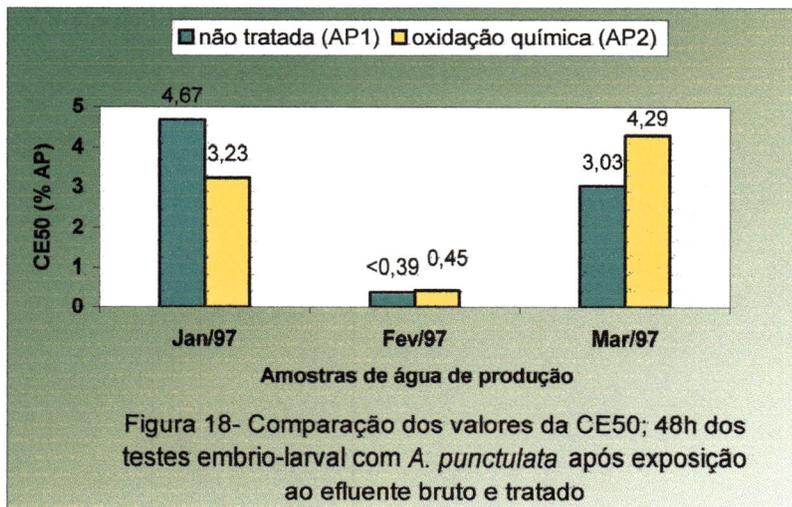
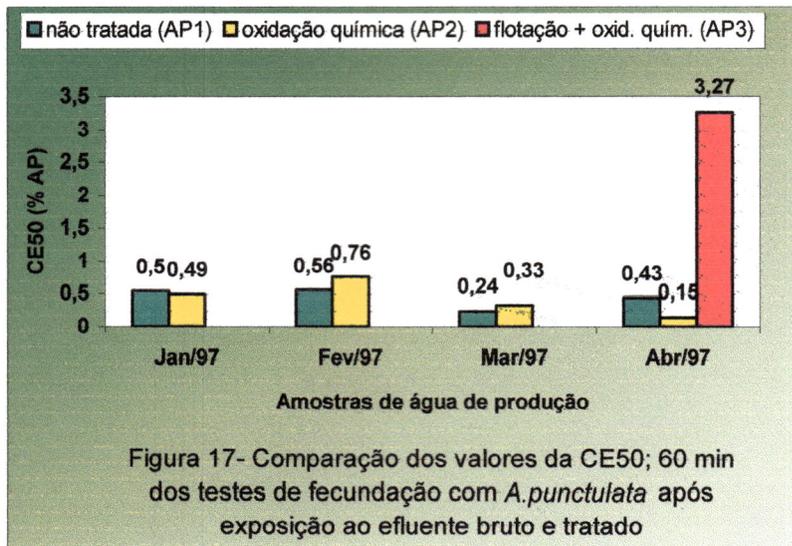
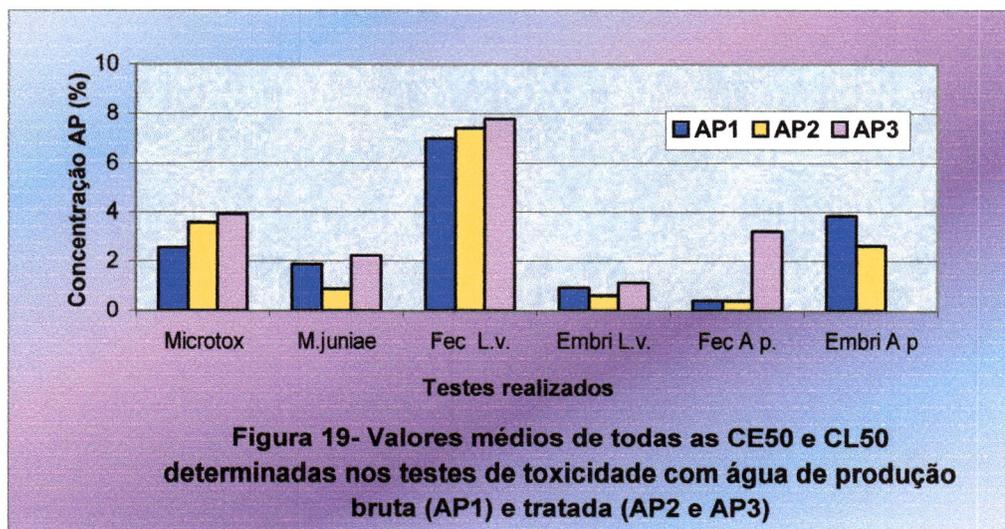
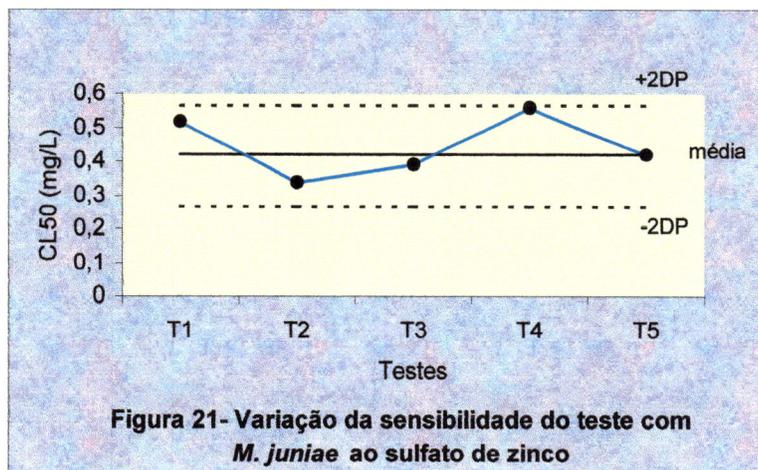
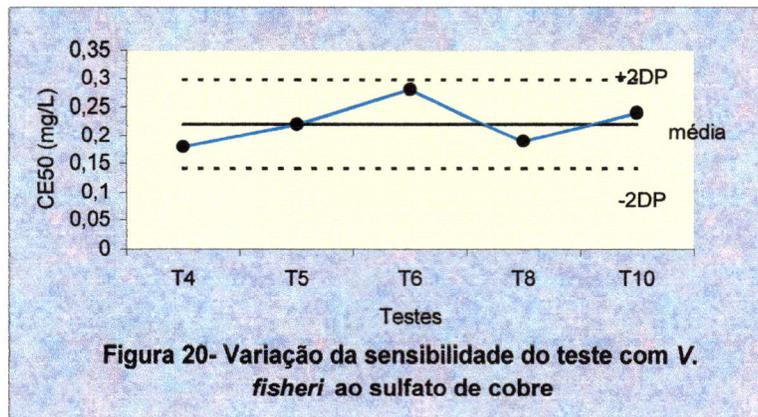


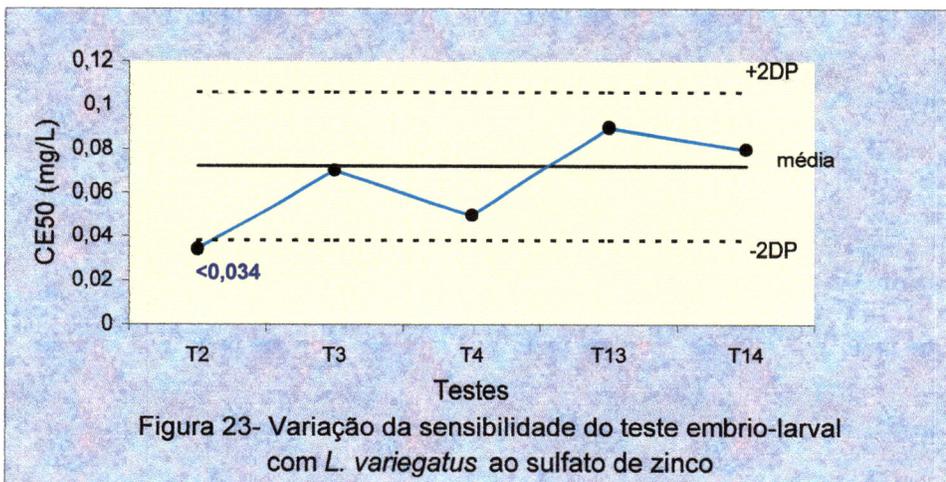
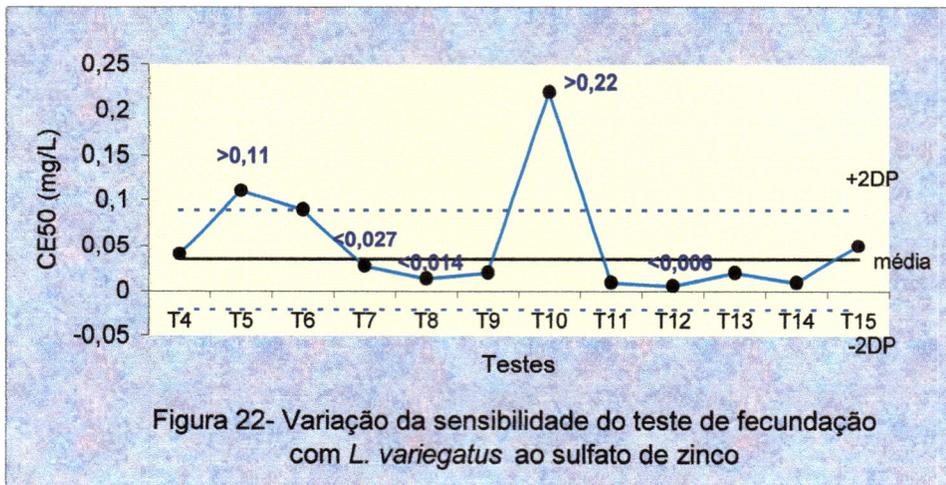
Figura 13- Larva pluteus normal de *A. punctulata*.
(foto gentilmente cedida pelo Prof. Robert Scott Carr)

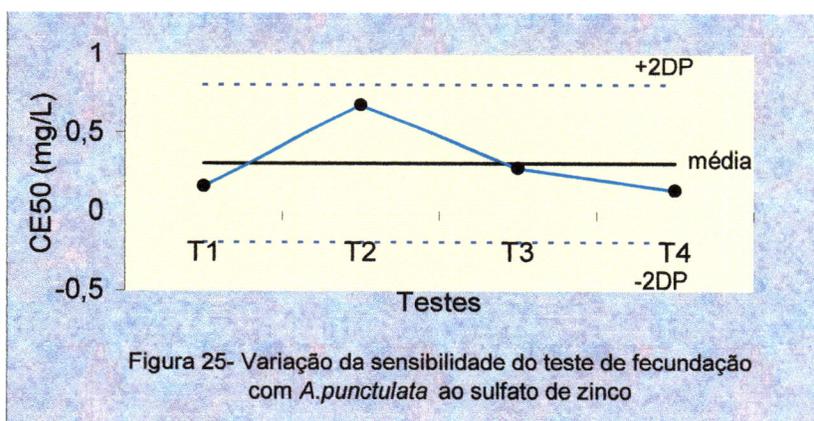
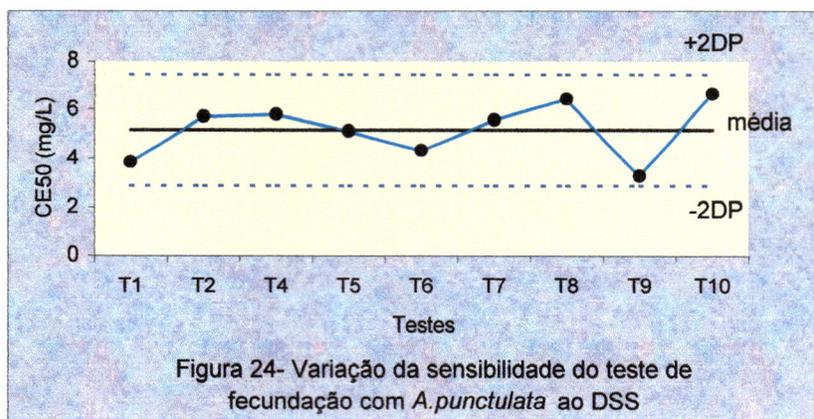












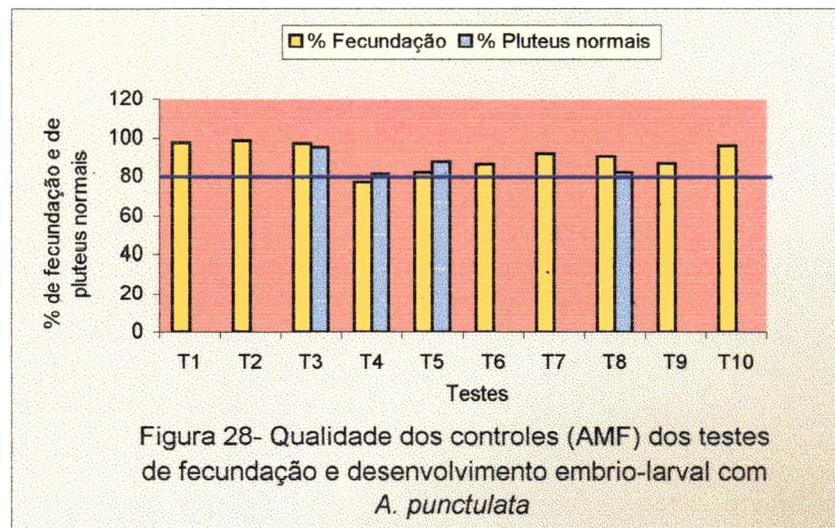
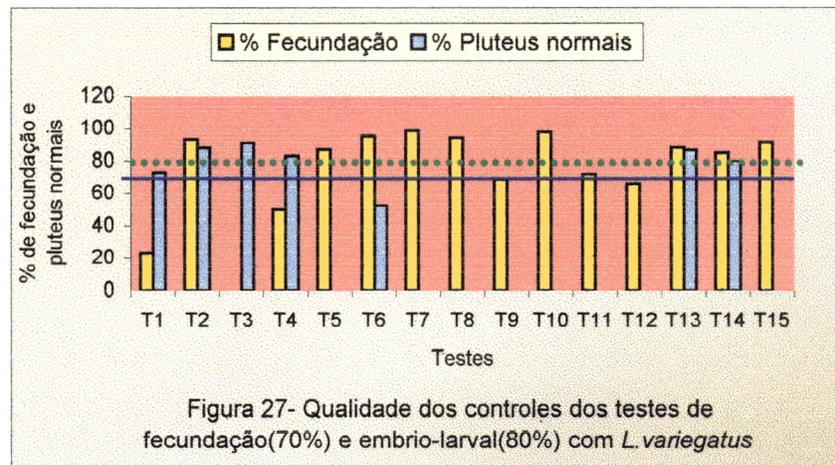
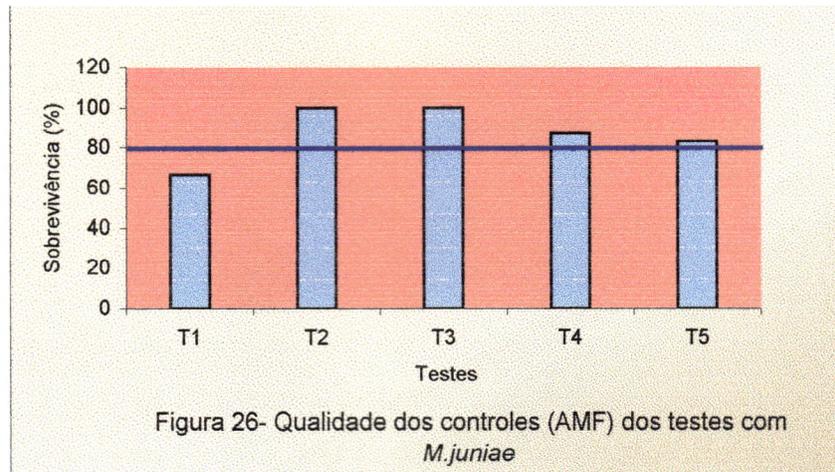
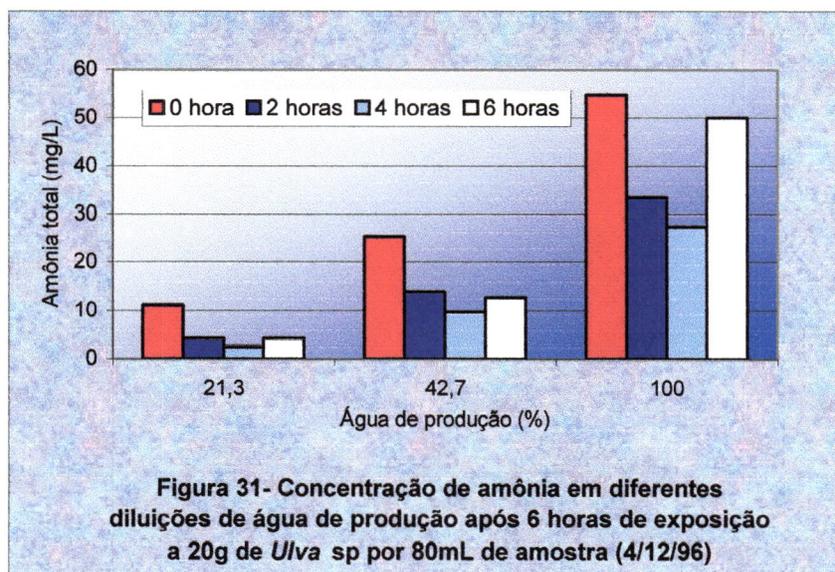
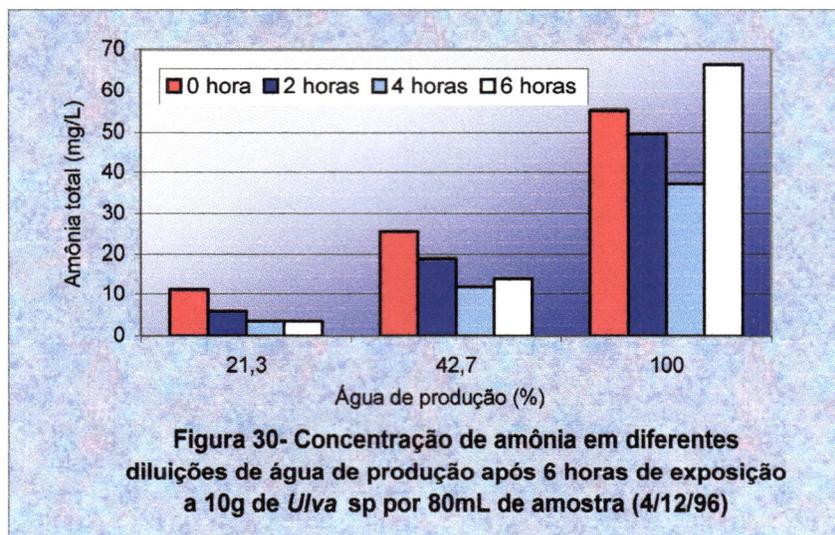
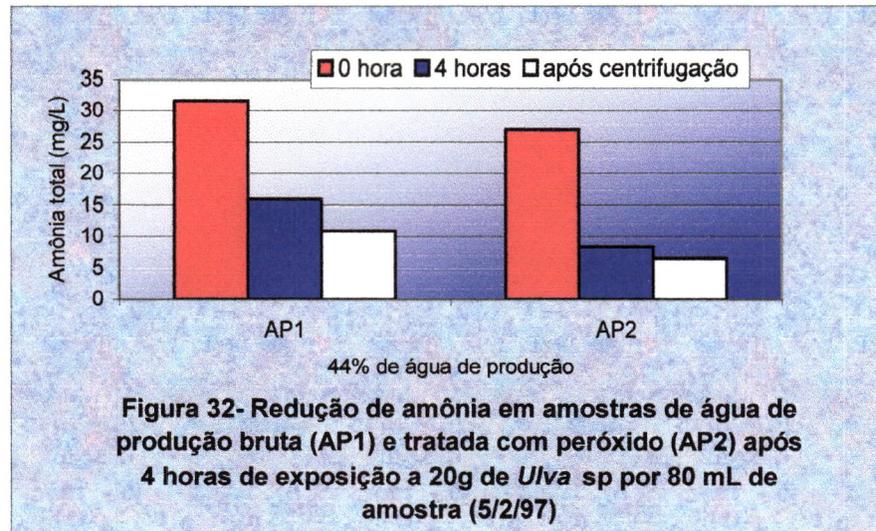




Figura 29- *Ulva lactuca* em Port Aransas, Texas.





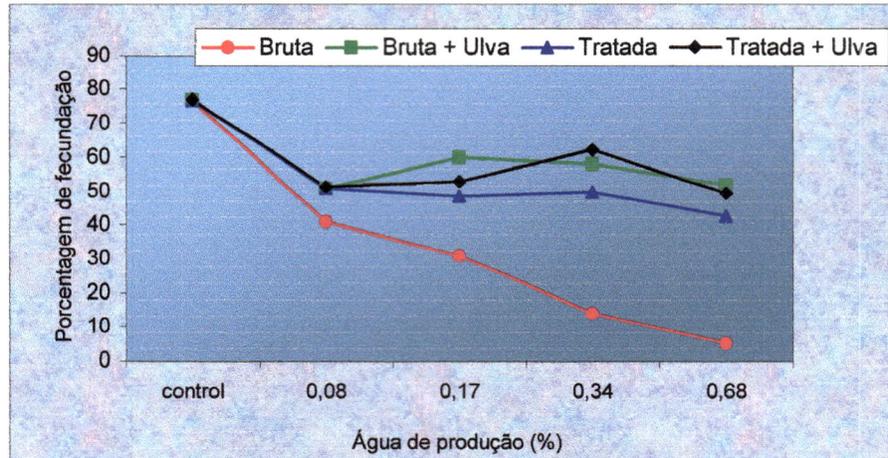


Figura 33- Percentagem de fecundação de *A.punctulata* em amostras de água de produção tratadas com *Ulva* sp (7/2/97)

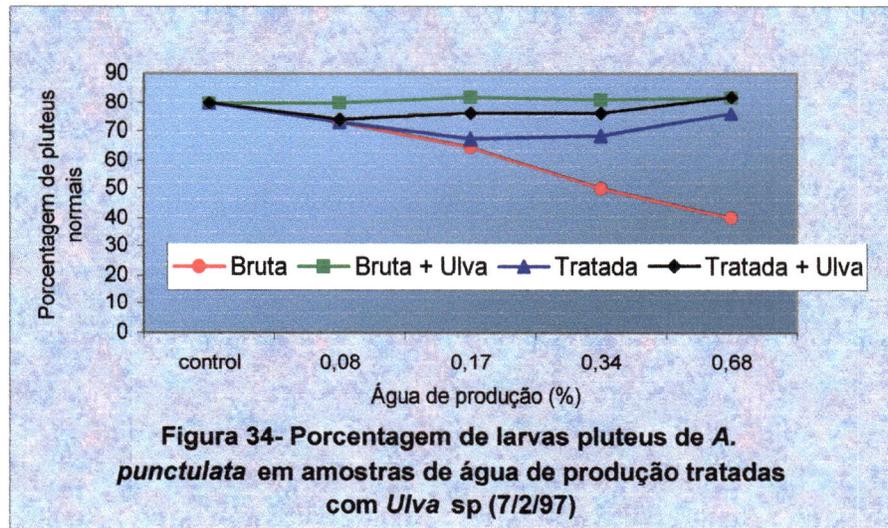
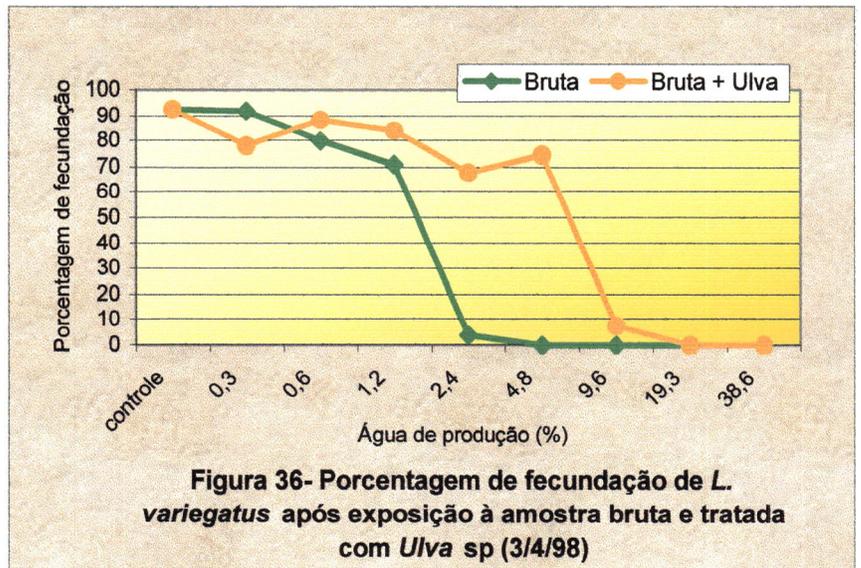
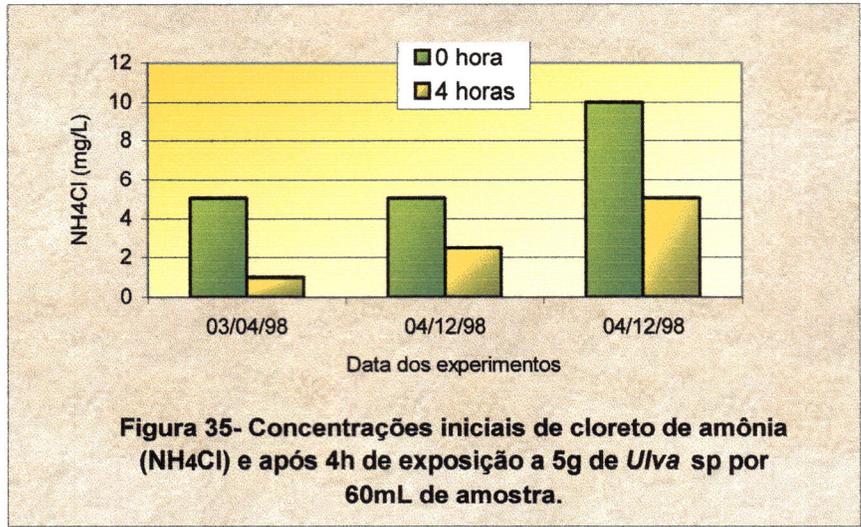


Figura 34- Percentagem de larvas pluteus de *A. punctulata* em amostras de água de produção tratadas com *Ulva* sp (7/2/97)



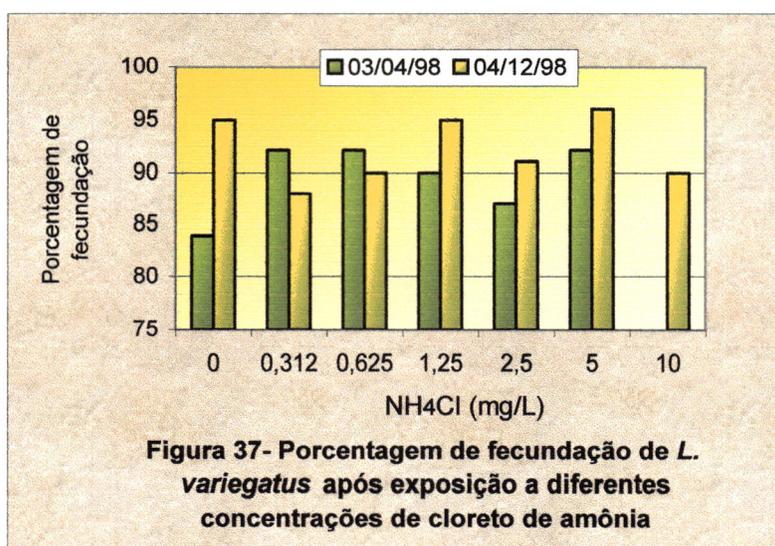
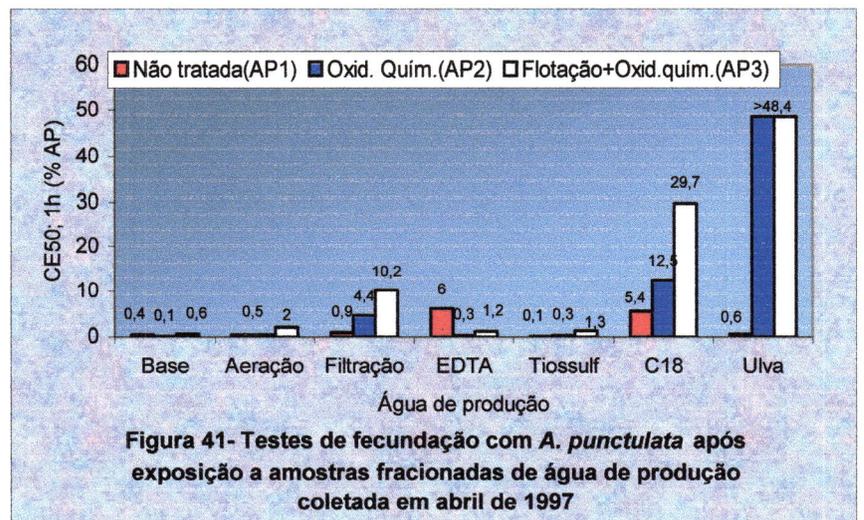
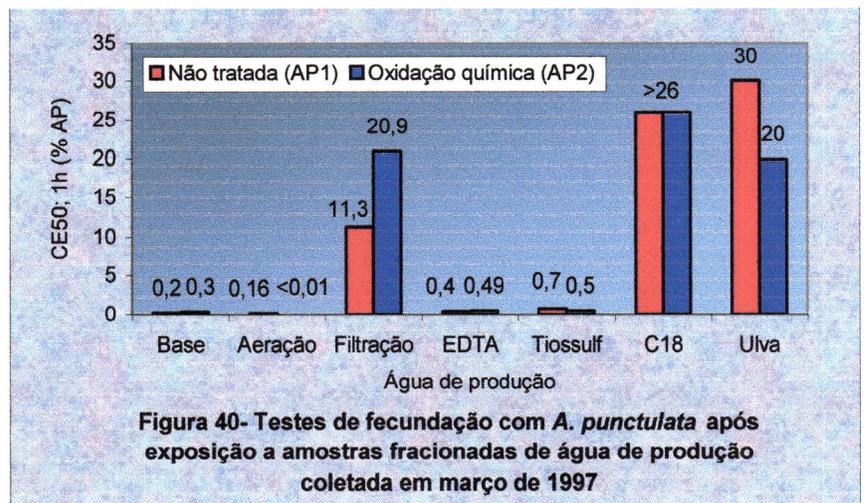
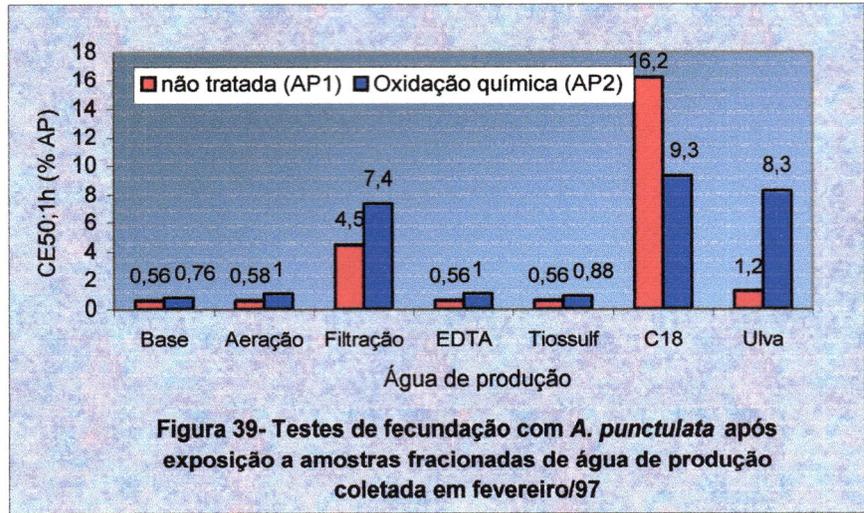
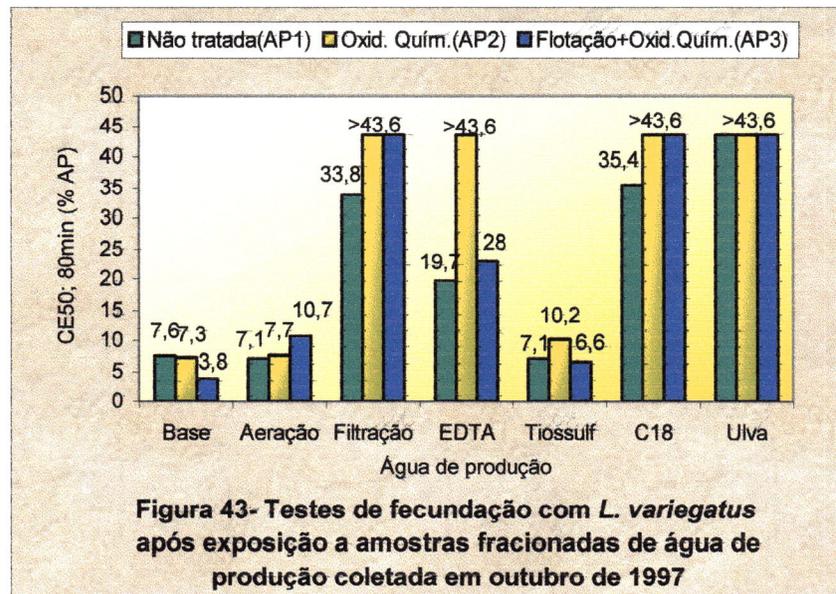
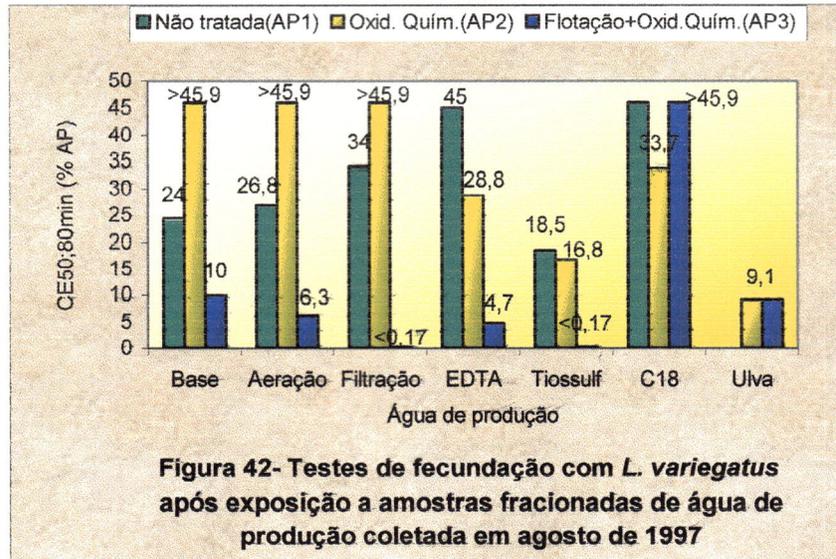


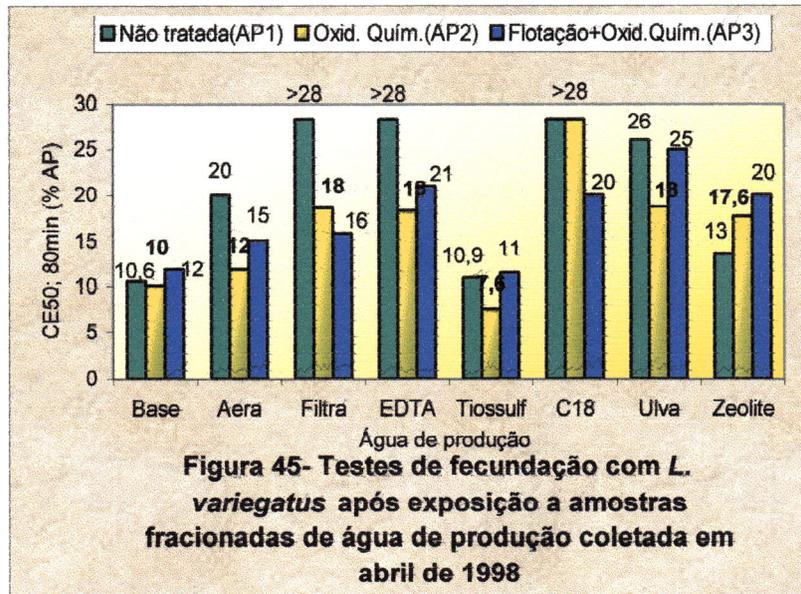
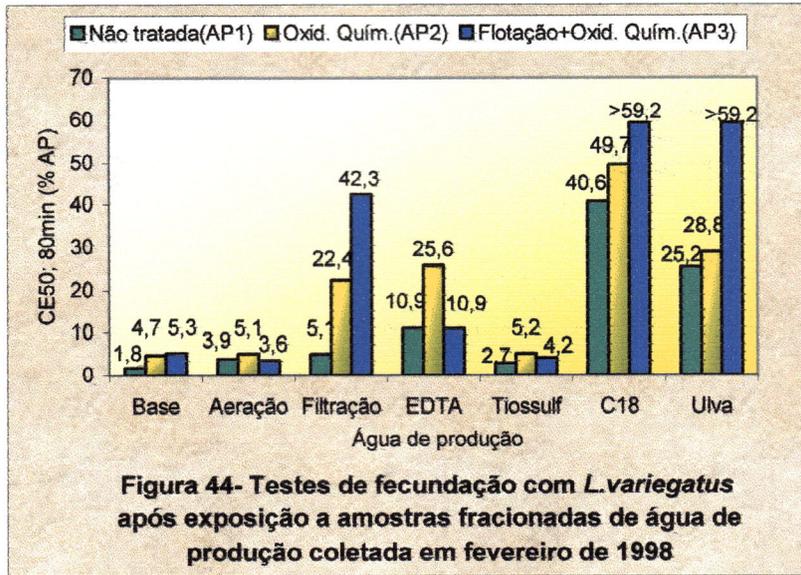
Figura 37- Porcentagem de fecundação de *L. variegatus* após exposição a diferentes concentrações de cloreto de amônia



Figura 38- Macho e fêmea adultos de *Strongylocentrotus purpuratus* após liberação dos gametas.







9. ANEXOS

ANEXO 1 - Toxicidade aguda e crônica de diversos compostos para organismos marinhos (valores de CL, CE50 e CEO em mg/L)

ESPÉCIE	Benzeno	Cd	Ca	Cr	Cu	Pb	Zn	N- Amon	NH3	Fenol	Sulfeto	Tolueno
<i>V. fisheri</i> A (CE50; 15min)	27,5	12		960	0,07- 0,28	0,21- 1,7	0,4- 6,1	3607	1,49	10- 26,3		19,7
<i>M. juniaae</i> B (CL50; 96h)	17,36				0,03		0,35	15,6* (CEO)	0,87* (CEO)			
<i>M. bahia</i> C (CL50; 96h)	27,4		1140	7,0	0,18	3,13	0,49	39,6	1-2,2	12,5	1,92	
<i>L. variegatus</i> D (CE50; 80min)							0,068		1,89			
<i>L. variegatus</i> E (CE50; 24-28h)		1,99		3,76			0,074		0,12			
<i>A. punctulata</i> F (CE50; 60min)		38			0,029	5,4	0,112	19,58	0,6			
<i>A. punctulata</i> G (CE50; 48h)		13,9			0,014	32,5	0,073	1,48	0,058	>100		
<i>S. purpuratus</i> H (CE50; 80min)	9,6	18,4		>100	0,025	8,2	0,262		> 1,4			

A- QUERESHI et al. (1982, 1984); KAMLET et al. (1986); ELNABARAWY et al. (1988); NACCI et al. (1986);

CARLSON & MORRISON (1992); SCHIFF et al. (1992)

B- BADARÓ-PEDROSO (1993); NIPPER et al. (1993); BADARÓ-PEDROSO & SANTOS (dados não publicados)

C- BUIKEMA et al. (1981); LUSSIER et al. (1985); JOP (1989); MILLER et al. (1990); SCHIFF et al. (1992); RAND (1995)

D e E- ZAMBONI (1993); NIPPER et al. (1993); dados não publicados

F e G- NACCI et al. (1986); EPA (1991); SCHIFF et al. (1992); BAY et al. (1993); CARR (comunicação pessoal)

H- SCHIFF et al. (1992); BAY et al. (1993)

(*) crescimento

ANEXO 2- Dados compilados da literatura sobre toxicidade da água de produção a vários organismos.

Organismo	Água de produção	Duração do teste	Efeito	CE ou CL50 (%)	CENO (%)	CEO (%)	Autor
<i>Crassostrea gigas</i> (larva) M	Bruta	48h	Mortalidade	5			SOMMERVILLE et al., 1987
<i>Calanus finmarchicus</i> (adulto) CC		24h	Mortalidade	10			
<i>Campanularia flexuosa</i> (colônia) H		10 dias	Crescimento	5			
<i>Vibrio fisheri</i> (Microtox) B		15 min.	Luminescência	5-6			
<i>Acartia tonsa</i> (17-21 dias idade) CC	Bruta	48h	Imobilidade	3,6			GIRLING, 1989
	Filtrada			2,7			
	Biodegradada + filtrada			18			
<i>Artemia</i> sp (náuplio) CB	Bruta	48h	Imobilidade	23-38	-		SEABRA et al., 1992
	Tratada c/peróxido bruta			45,3-81			
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (gametas) EO		80 min.	Fecundação	0,74-1,73	-		SCHIFF et al., 1992
<i>Menidia beryllina</i> (larva) P		156h	Mortalidade	>1,12-5,8	-		
<i>Mysidopsis bahia</i> (jovem) CM		96h	Mortalidade	4,9-11,8	-		
<i>V. fisheri</i> (Microtox) B		30 min.	Luminescência	8,9-16,6	-		
<i>Neanthes arenaceodentata</i> (2-3 semanas idade) A		96h	Mortalidade	18,1-28,6	-		

Organismo	Água de produção	Duração do teste	Efeito	CE ou CL50 (%)	CENO (%)	CEO (%)	Autor
<i>Skeletonema costatum</i> (microalga)	Plataforma A	48h	Crescimento	4,5-67,6			BRENDEHAUG et al., 1992
<i>Artemia</i> sp (náuplio) CB	Plataforma B Plataforma A Plataforma B	24h	Imobilidade	20-39 5,6-35,7 0-5,6			
<i>V. fisheri</i> (Microtox) B	Plataforma A Plataforma B	4h	Luminescência	5,7-8,7 9,4-19,2			
<i>M. bahia</i> (jovens) CM (7 dias idade)	Bruta	96h 7 dias	Mortalidade Sobrevivência	2,3-15,96	0,75-7,00		MOFFITT et al., 1992
<i>Cyprinodon variegatus</i> P (larvas < 24h idade)		96h 7 dias	Crescimento Fecundidade Mortalidade Sobrevivência	5,44- >28	<0,75-7,00 <0,75-7,00 1,50-28 <0,75-7,00		
<i>S. costatum</i> (microalga) <i>Crassostrea brasiliana</i> M (larva)	Tratada com peróxido	96h 24h	Crescimento Mortalidade	0,3 6,84 e 0,22			FUNDESPA, 1992
<i>V. fisheri</i> (Microtox) B <i>Donax faba</i> M <i>Chaetoceros</i> sp (microalga) D	Bruta	15 min. 96 96h	Luminescência Mortalidade Crescimento	0,2-23,7 0,2-15,3 0,1-4,2	- - -		DIN & ABU, 1993
<i>Macrocystis pyrifera</i> (macroalga)	Bruta	96h	Produção esporófitos			0,01	REED et al., 1994

Organismo	Água de produção	Duração do teste	Efeito	CE ou CL50 (%)	CENO (%)	CEO (%)	Autor
<i>Macrocystis pyrifer</i> (macroalga- zoósporos)	Bruta	42h ?	Migração nuclear			4	GARMAN et al., 1994
			Crescimento tubo germinal			12	
			Germinação			16	
<i>Temora stylifera</i> CC	Bruta	48h	Imobilidade	11,4			REYNIER et al., 1994
<i>Mysidopsis juniae</i> (jovens) CM		96h	Mortalidade	2,49			
<i>Promysis atlântica</i> (jovens) CM	Tratada com peróxido	72 e 96h	Mortalidade	7,07 e 0,37			PHAN et al., 1994
<i>S. costatum</i> (microalga)	Bruta	72h	Crescimento	2,3-30			STRØMGREN et al., 1995
	Biodegradada			2,1			
<i>Mytilus edulis</i> (jovens) M	Bruta	96-120h	Crescimento da concha	0,2-1,9			
	Biodegradada			0,4-1,2			
<i>Abra alba</i> M	Bruta	96-120h	Produção de pelotas fecais	1,1-4,4			
	Biodegradada			2,6 - >8,0			
<i>Crassostrea gigas</i> (embriões) M	Bruta	24h	Desenvolvi/o Embrio-larval	0,5 - 24,8			
	Biodegradada			1,4			

Organismo	Água de produção	Duração do teste	Efeito	CE ou CL50 (%)	CENO (%)	CEO (%)	Autor
<i>Arbacia punctulata</i> EO Gametas		60min	Fecundação	5 - 9,7			D'UNGER et al., 1996
Embriões		48h	Desenvolvimento Embrio-larval	7,3 - 24,6			
<i>V. fisheri</i> (Microtox) B	Bruta	15 min	Luminescência	2,4 - 24,4			FLYNN et al., 1996
<i>Acartia tonsa</i> CC		48h	Imobilidade	2 - 24,8			
<i>S. costatum</i>		72h	Crescimento	1,0 - 35,1			
<i>S. costatum</i>	Bruta	48h	Crescimento	1,2 - >33			STAGG et al., 1996
<i>Acartia tonsa</i> CC		48h	Imobilidade	0,63 - 2			
<i>V. fisheri</i> (Microtox) B		15 min.	Luminescência	3,5 - 6,3			
<i>Tisbe battagliai</i> CC (copepoditos)		48h	Mortalidade	2,1- 19			
<i>Scophthalmus maximus</i> P (larva)	Bruta	12h	Mortalidade			10	STEPHENS et al., 1996
			Atividade natatória			10	
		12h	Batimento cardíaco			10	
<i>Costoanachis sertulariarum</i> (adultos) M	Tratada com peróxido	96h	Mortalidade	0,14 - 15,87			SOUZA & TOMMASI, 1997

A- Anelídio; B-bactéria; CB- crustáceo branquiópodo; CC- crustáceo copepodo; CM- crustáceo misidáceo; D- diatomácea; EO- equinodermo ouriço; H- hidrozoário; M- molusco; P- peixe

APÊNDICE

APÊNDICE I
CRITÉRIOS DE QUALIDADE DA ÁGUA PARA CLASSE 5 SEGUNDO
RESOLUÇÃO CONAMA

PARÂMETROS	CRITÉRIO
Óleos e graxas	Virtualmente ausentes
Subs. que formem depósitos objetáveis	Virtualmente ausentes
Subs. que produzam odor e turbidez	Virtualmente ausentes
DBO ₅ (20°C)	Até 5mg/L
OD	Não inferior a 6mg/L
pH	6,5 a 8,5
Amônia não ionizável	Até 0,4 mg/L
Índice de fenóis	Até 0,001 mg/L C ₆ H ₅ OH
Sulfetos como H ₂ S	Até 0,002 mg/L S
Cádmio	Até 0,005 mg/L Cd
Chumbo	Até 0,01mg/L Pb
Cobre	Até 0,05 mg/L Cu
Cromo VI	Até 0,05 mg/L Cr
Ferro	Até 0,3 mg/L Fe
Níquel	Até 0,1 mg/L Ni
Zinco	Até 0,17 mg/L Zn

APÊNDICE II
RELAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS NA ÁGUA DE PRODUÇÃO

PARÂMETRO	TCA		
	METODOLOGIA	LIMITE DE DETECÇÃO	
Bário	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,10	mg/L Ba
Benzeno	Cromatografia gasosa/ Espectrofotometria de massa. EPA 8260 orgânicos voláteis GC/MS	0,005	mg/L
Cálcio	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,08	mg/L Ca
Chumbo	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,10	mg/L Pb
Cobre	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,002	mg/L Cu
DBO - Demanda Bioquímica de oxigênio	Diluição e incubação -5dias- 20°C e medida da diferença de oxigênio dissolvido, entre o 1° e o 5° dia, através de eletrodo seletivo	1	mg/L O ₂
DQO - Demanda Química de Oxigênio	Colorimetria. Digestão com ácido sulfúrico e dicromato de potássio em sistema fechado.	17	mg/L O ₂
Estrôncio	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,17	mg/L Sr
Etilbenzeno	Cromatografia gasosa/ espectrografia de massa. EPA 8260 orgânicos voláteis GC/MS	0,005	mg/L
Fenol	Colorimetria. Digestão prévia e reação com diaminobenzidina	0,063	mg/L C ₆ H ₅ OH

Ferro total	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,12	mg/L Fe
Magnésio	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,007	mg/L Mg
Nitrogênio amoniacal	Colorimetria. Destilação prévia e reação com fenato	0,05	mg/L N
O&G – Óleos e Graxas	Gravimetria. Extração por solvente (tricloro, trifluor, etano). Retenção prévia em terra diatomácea.	1	mg/L
pH	Potenciometria. Medição com eletrodo seletivo.	0,01	UpH
Potássio	Espectrofotometria de emissão atômica. Digestão prévia com ácido nítrico.	0,04	mg/L K
Sólidos dissolvidos fixos	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105°C e calcinação prévia a 550°C	1	mg/L
Sólidos dissolvidos totais	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105°C.	1	mg/L
Sólidos dissolvidos voláteis	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105°C e calcinação prévia a 550°C	1	mg/L
Sólidos fixos totais	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105°C e calcinação prévia a 550° C	1	mg/L
Sólidos sedimentáveis	Medição do volume do resíduo em cone Inhoff, após uma hora de sedimentação.	0,1	mg/L
Sólidos suspensos fixos	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105° C e calcinação prévia a 550°C	1	mg/L
Sólidos suspensos totais	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105°C.	1	mg/L
Sólidos suspensos voláteis	Gravimetria. Filtração prévia, secagem prévia a 105° C e calcinação prévia a 550° C	1	mg/L

Sólidos totais	Gravimetria. Secagem prévia a 105°C.	1	mg/L
Sólidos voláteis totais	Gravimetria. Secagem prévia a 105°C e calcinação prévia a 550°C	1	mg/L
Sulfeto	Volimetria. Arraste prévio, reação com iodo e titulação com tiosulfato de potássio	0,8	mg/L S
Surfactantes	Colorimetria. Reação com azul de metileno e extração com clorofórmio	0,04	mg/L LAS
Tolueno	Cromatografia gasosa/ espectrografia de massa. EPA 8260 orgânicos voláteis GC/MS	0,005	mg/L
Xilenos (Total)	Cromatografia gasosa/ espectrografia de massa. EPA 8260 orgânicos voláteis GC/MS	0,005	mg/L
Zinco	Espectrofotometria de absorção atômica. Digestão prévia com ácido nítrico	0,003	mg/L Zn
IPEN			
Alumínio	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Bário	Espectrografia de emissão atômica com fonte de plasma		
Boro	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Cálcio	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		

Cádmio	Amostra filtrada em papel de filtro faixa azul. Espectrofotometria de absorção atômica (AAS)- FORNO DE GRAFITA	0,1	mg/L Cd
Cromo	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Cobre	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Chumbo	Amostra filtrada em papel de filtro faixa azul. Espectrofotometria de absorção atômica (AAS)- FORNO DE GRAFITA	2,5	mg/L Pb
Ferro	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Manganês	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Níquel	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Vanádio	Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP/AES)		
Zinco	Amostra filtrada em papel de filtro faixa azul. Espectrofotometria de absorção atômica (AAS) -CHAMA		
CETESB			
Benzeno	Head space*		
Tolueno	Head space*		
Xileno	Cromatografia gasosa/ espectrografia de massa (GC/MS)		

Faculdade de Saúde Pública		
DBO	Diluição e incubação -5dias- 20°C e medida da diferença de oxigênio dissolvido, entre o 1° e o 5° dia, através de eletrodo seletivo	
DQO	Colorimetria. Digestão com ácido sulfúrico e dicromato de potássio em sistema fechado.	
Nitrogênio amoniacal	Colorimetria. Destilação prévia e reação com fenato	

(*) Japan Industrial Standard Handbook Pollution Analysis, Vol. 10 (1984).