



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Faculdade de Engenharia

Sanye Soroldoni Guimarães

**Ecotoxicidade aguda, crônica e genotoxicidade de solo
contaminado por óleo lubrificante usado e biorremediado
sobre *Eisenia andrei***

Rio de Janeiro
2012

Sanye Soroldoni Guimarães

Ecotoxicidade aguda, crônica e genotoxicidade de solo contaminado por óleo lubrificante usado e biorremediado sobre *Eisenia andrei*



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcia Marques Gomes
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia

Rio de Janeiro
2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

G963 Guimarães, Sanye Soroldoni.
Ecotoxicidade aguda, crônica e genotoxicidade de solo
contaminado por óleo lubrificante usado e biorremediado
sobre *Eisenia andrei* / Sanye Soroldoni Guimarães. - 2012.
209 f.

Orientadora: Marcia Marques Gomes.
Coorientador: Fábio Veríssimo Correia
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do
Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia Ambiental. 2. Ecotoxicologia –
Dissertações. 3. Biorremediação - Dissertações. Gomes,
Marcia Marques. II. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. III. Título.

CDU 631.453

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Sanye Soroldoni Guimarães

**Ecotoxicidade aguda, crônica e genotoxicidade de solo contaminado por óleo
lubrificante usado e biorremediado sobre *Eisenia andrei***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em: 14 de dezembro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marcia Marques Gomes (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof^a. Dr^a. Camille Ferreira Mannarino
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia (Coorientador)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO
Depto. de Ciências Naturais

Prof. Dr. Josino Costa Moreira
Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador - CESTEH / FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional durante toda minha vida, não sendo diferente nesses dois anos de árduo trabalho. Amo vocês!

Ao amor da minha vida, meu companheiro, amigo, meu marido, Johnnyvan, pela paciência por todas as vezes que estive em falta e sempre apoiar meus sonhos e objetivos tornando-os nossos. Eu te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas durante minha vida, por sempre me mostrar o caminho certo e por mais esse sonho realizado.

À minha orientadora Prof. Marcia Marques, que mais do que uma excelente orientadora se tornou uma grande amiga, com a qual pude dividir alguns momentos de minha vida, sempre me apoiando e contribuindo para o meu crescimento profissional. Obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Fabio Verrisimo, pelos ensinamentos passados e confiança em realizar esse trabalho.

Aos professores Josino Moreira e Camille Mannarino por fazerem parte da banca e pelas suas contribuições.

Aos amigos, do Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) – André, Graciane, Siomara, Clooer, Tadeu, Raul, Ludmila, Francisca, Greyce, Alexandre, Maria Luiza, Rodrigo, Antônio, Jorge, Chaiana, Tatiane, Clooer, Tadeu, Raul, Alessandra, Mônica. Agradeço, em especial, aos amigos André e Graciane pela amizade e ajuda, em todos os momentos da execução deste trabalho, seja com uma palavra amiga, ouvindo um desabafo ou passando a noite nas análises dos experimentos. Vocês são especiais!

À Barbara Prestes pelos ensinamentos e auxílio nas análises cromatográficas.

Ao Laboratório de Engenharia Sanitaria (LES), especialmente à professora Daniele Bila e a Técnica Rita, pela utilização de alguns equipamentos.

Às amigas do PEAMB Iara, Juliana, Quésia, Catarina, Ana Carolina, Caroline, Erica, pela amizade e ajuda durante as disciplinas.

Ao Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) da ENSP – FIOCRUZ, por ceder o espaço para realização das análises ecotoxicológicas. Em especial a Tecnologista Thelma e as estagiárias Taís, Nathália, Ana, Margarete e Marcele.

Ao Dr. Daniel Vidal Perez, da EMBRAPA Solos, pelas análises físicas e químicas realizadas.

À empresa Cetrel-Lumina Soluções Ambientais pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudos no primeiro ano de mestrado e a UERJ pela concessão da bolsa PROATEC para auxílio na finalização do último ano.

À minha querida mãe, Sonia, ao meu pai, Jorge e aos meus irmãos, Afonso e Angelo, pelo apoio em todos os momentos e pela compreensão da minha falta nesses dois anos de mestrado. Amo muito vocês!

Aos meus queridos sogros, Graça e Josevan, e minha cunhada Jamiliny, por toda a atenção, carinho e ajuda nesse último ano. Vocês foram essenciais!

Ao meu amor, Johnnyvan, por sempre estar ao meu lado, nunca me deixando desistir, mesmo nos momentos de saudade e distância, por entender minha ausência, e por acreditar nesse sonho e me fazer muito feliz. Você é tudo na minha vida. Eu te amo!

“ O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano
Mas sem ela, o oceano seria menor.”
Madre Teresa de Calcutá

“ Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo. Vai!
Tente outra vez!”
Raul Seixas

“ Nunca deixem que te digam que não vale a pena acreditar num sonho que se tem.
Quem acredita sempre alcança”
Renato Russo

RESUMO

GUIMARAES, Sanye Soroldoni. *Ecotoxicidade aguda, crônica e genotoxicidade de solo contaminado por óleo lubrificante usado e biorremediado para Eisenia andrei*. 2012. 209f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo do presente deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, crônica e a genotoxicidade sobre *E. andrei* causadas por solo recém-contaminado com óleo lubrificante usado e após biorremediação por diferentes estratégias, após 22 meses, e paralelamente ao estudo de ecotoxicidade, foi conduzida uma investigação comparativa de três métodos de extração de HTP e HPA de solos para análise cromatográfica. A comparação das técnicas de extração evidenciou que para HTP, a técnica de extração acelerada por solvente-ASE foi a que melhor recuperou n-alcanos; já para as frações HRP e MCNR as técnicas soxhlet e micro-ondas-MARS não apresentaram diferenças significativas e foram melhores que ASE. Para HPA, a técnica de extração por soxhlet foi a que apresentou melhor recuperação em todos os solos. O teste de mortalidade apresentou, aos 14 dias, taxas crescentes de mortalidade de $10 \pm 6\%$, $20 \pm 0\%$, $73 \pm 25\%$, $93 \pm 12\%$ e $100 \pm 0\%$ para amostras de CONT (solo controle, sem contaminação artificial), BIOS (solo contaminado com 5% de OLU e biorremediado por bioestimulo), BIOA1 (solo contaminado com 5% de OLU e biorremediado por bioestimulo + bioaumento com adição de 10% de RSU maturado), e BIOA2 (solo contaminado com 5% de OLU e biorremediado por bioestimulo + bioaumento com adição de 10% de RSU semi-maturado) e OLU (solo contaminado com 5% de OLU), respectivamente. Aos 28 dias, entretanto, BIOS e OLU apresentaram taxas de mortalidade de $97\% \pm 6\%$ e de $100\% \pm 0\%$ respectivamente, valores estes significativamente superiores ao CONT. Foram observadas deformações anatômicas nos indivíduos mantidos em BIOS e OLU, assim como diminuição da biomassa em todas as amostras, evidenciando efeitos crônicos. O teste de reprodução, aos 28 dias, foram observadas grandes quantidades de indivíduos jovens nos solos biorremediados e recém-contaminado. No entanto, aos 56 dias houve uma diminuição dessas formas e o controle (CONT) exibiu uma quantidade maior de formas juvenis. O teste de densidade e viabilidade celular mostrou ser indicador sensível para toxicidade crônica apresentando queda nos solos BIOS e OLU em relação ao CONT com diferenças significativas ($p < 0.05$). Não foram observados micronúcleos nos solos em estudo. Tal observação reforça a necessidade de testes de ecotoxicidade para avaliar a real eficácia de tecnologias de tratamento.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Eisenia Andrei; Micronúcleo; Técnicas de extração de hidrocarbonetos; Biorremediação; Redução da biomassa.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the acute toxicity, chronic and genotoxicity on *E. andrei* caused by freshly contaminated soil with used lubricating oil and after bioremediation by different strategies, after 22 months, and alongside ecotoxicity study, we conducted a comparative study of three methods of extraction and HTP HPA soil for chromatographic analysis. Comparison of extraction techniques for HTP showed that the technique of accelerated solvent extraction-ASE had the best recovery of n-alkanes, whereas for fractions and HRP MCNR soxhlet techniques and microwave-MARS and no significant differences were better than ASE. For HPA, the soxhlet extraction technique showed the best recovery in all soils. The mortality test showed, at the 14th day, growing mortality rates of $10 \pm 6\%$, $20 \pm 0\%$, $73 \pm 25\%$, $93 \pm 12\%$ and $100 \pm 0\%$ for samples CONT (ground control without contamination artificial), BIOS (soil contaminated with 5% of OLU and bioremediated for biostimulation) BIOA1 (soil contaminated with 5% of OLU and bioremediated for biostimulation + bioaugmentation by adding 10% of MSW matured) and BIOA2 (soil contaminated with 5% bioremediated of OLU and for biostimulation + bioaugmentation by adding 10% of MSW semi-matured) and OLU (soil contaminated with 5% OLU), respectively. At the 28th day, however, OLU BIOS and mortality rates were $97\% \pm 6\%$ and $100\% \pm 0\%$, respectively, values which are significantly higher than CONT. Anatomical deformations have been observed in individuals kept in BIOS and OLU, as well as decreased biomass in all samples, suggesting chronic effects. The reproduction test, at the 28th day, were found large quantities of juveniles in bioremediated soils and freshly contaminated soil. However, at the 56th day there was a decrease of these forms and control (CONT) exhibited a greater amount of juveniles. The >test< density and cell viability test showed to be a sensitive indicator for chronic toxicity in soils having decrease BIOS and OLU compared to CONT with significant differences ($p < 0.05$). No micronuclei were observed in soils under study. This observation reinforces the need for ecotoxicity tests to assess the true efficacy of treatment technologies.

Keywords: Ecotoxicology; *Eisenia andrei*; Micronuclei; Hydrocarbons extraction techniques; Bioremediation; Biomass reduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Composição e divisão dos hidrocarbonetos de petróleo.....	23
Figura 2	Estrutura química dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA.....	25
Figura 3	Processos de interação entre o contaminante e o solo.....	34
Figura 4	Ação dos micro-organismos no processo de biorremediação.....	38
Figura 5	Cadeia de causalidade.....	42
Figura 6	Vias de transferências entre as matrizes.....	43
Figura 7	Abordagem ecotoxicológica.....	44
Figura 8	<i>Eisenia andrei</i> conhecida popularmente como “Vermelha da Califórnia”.....	54
Figura 9	Contaminação do solo na concentração de 5% de Óleo Lubrificante Usado.....	60
Figura 10	Solo arenoso homogeneizado após a contaminação com OLU.....	60
Figura 11	Esquema das análises físicas, químicas e ensaios de toxicidade realizadas.....	61
Figura 12	Soxhlet utilizado na extração baseada no método US EPA 3540C.....	65
Figura 13	Extração realizada por micro-ondas.....	66
Figura 14	Extração por solvente acelerada (ASE).....	68
Figura 15	Cromatógrafo GC/MS Agilent 7890A.....	70
Figura 16	Disposição dos béquers com solo em estante para realização dos ensaios de toxicidade.....	72
Figura 17	Descrição esquemática da montagem do experimento.....	73
Figura 18	Câmara de Neubauer utilizada para contagem de coleomócitos...	75
Figura 19	Curva de neutralização do CaCO ₃	79
Figura 20	Figura 20: Relação dose-resposta para <i>E. andrei</i> a substância de referência 2-cloroacetamida.....	93
Figura 21	Média e desvio-padrão da mortalidade, em porcentagem, durante os 14, 28, 42 e 56 dias de ensaio de letalidade.....	94

Figura 22	Diminuição de biomassa dos organismos expostos aos solos CONT, BIOS, BIOA ₁ , BIOA ₂ e OLU após 14, 28, 42 e 56 dias de exposição.....	96
Figura 23	Estrangulamento no segmento de minhoca exposta ao tratamento BIOS	97
Figura 24	Estrangulamento no segmento e inchaço após clitelo de minhoca exposta ao tratamento BIOS.....	97
Figura 25	Forma juvenil encontrada no solo do tratamento BIOS.....	100
Figura 26	Coleomocito de <i>E. andrei</i> no tratamento CONT, aos 14 dias de exposição.....	102
Figura 27	Coleomocito de <i>E. andrei</i> no tratamento BIOS, aos 14 dias de exposição.....	103
Figura 28	Coleomocito de <i>E. andrei</i> no tratamento OLU, aos 14 dias de exposição.....	104
Figura 29	Cromatogramas das análises de HTP extraídas pela técnica do soxhlet para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA ₁ , (d) BIOA ₂ e (e) OLU.....	119
Figura 30	Cromatogramas das análises de HTP extraídas pela técnica micro-ondas-MARS para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA ₁ , (d) BIOA ₂ e (e) OLU.....	121
Figura 31	Cromatogramas das análises de HTP extraídas pela técnica de extração acelerada por solvente (ASE) para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA ₁ , (d) BIOA ₂ e (e) OLU.....	124
Figura 32	Cromatogramas das análises de HPA extraídas pela técnica do soxhlet para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA ₁ , (d) BIOA ₂ e (e) OLU.....	126
Figura 33	Cromatogramas das análises de HPA extraídas pela técnica micro-ondas- MARS para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA ₁ , (d) BIOA ₂ e (e) OLU.....	129
Figura 34	Cromatogramas das análises de HPA extraídas pela técnica de extração acelerada por solvente - ASE para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA ₁ , (d) BIOA ₂ e (e) OLU.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição elementar média do petróleo.....	21
Tabela 2	Valores orientadores da Lista Holandesa para HTPs em solo.....	24
Tabela 3	Algumas propriedades físicas e químicas dos HPAs.....	26
Tabela 4	Características carcinogênicas, mutagênicas e genotóxicas dos HPAs.....	28
Tabela 5	Valores orientadores de HPA no solo.....	29
Tabela 6	Condições que afetam a biorremediação do petróleo.....	39
Tabela 7	Vantagens e limitações da biorremediação de solos.....	40
Tabela 8	Definições utilizadas em ensaios de toxicidade.....	47
Tabela 9	Organismos-teste e ensaios indicados para matrizes ambientais....	52
Tabela 10	Estratégias de biorremediação utilizadas nos biorretores.....	59
Tabela 11	Condições da extração no Micro-ondas com base no método 3535 da USEPA.....	66
Tabela 12	Condições da extração no ASE Dionex.....	67
Tabela 13	Características e condições de análise de HTP do sistema GC/MS.....	69
Tabela 14	Características e condições de análise de HPA do sistema GC/MS.....	70
Tabela 15	Reagentes e concentrações necessários para solução de extrusão.....	74
Tabela 16	Reagentes para a solução de tampão <i>Lumbricus Balanced Salt Solution</i> (LBSS).....	75
Tabela 17	Caracterização física e química do solo controle e biorremediados utilizados no experimento de toxicidade.....	77
Tabela 18	Valores encontrados para os metais nos solos em estudo.....	80
Tabela 19	Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas-MARS e acelerada por solvente-ASE) do solo CONT.....	82

Tabela 20	Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas-MARS e acelerada por solvente-ASE) do solo BIOS.....	83
Tabela 21	Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas-MARS e acelerada por solvente-ASE) do solo BIOA ₁	83
Tabela 22	Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas-MARS e acelerada por solvente-ASE) do solo BIOA ₂	84
Tabela 23	Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas-MARS e acelerada por solvente-ASE) do solo OLU.....	85
Tabela 24	Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo CONT.....	86
Tabela 25	Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo BIOS.....	87
Tabela 26	Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo BIOA ₁	88
Tabela 27	Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo BIOA ₂	89

Tabela 28	Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo OLU.....	90
Tabela 29	Concentração dos HPA de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis aromáticos encontrados nos solos em estudo.....	91
Tabela 30	Média da recuperação do surrogate para as três técnicas de extração em todos os solos estudados.....	91
Tabela 31	Resultado do ensaio de sensibilidade com <i>E. andrei</i> e a substância de referência 2-cloroacetamida.....	93
Tabela 32	Resultado do ensaio de letalidade após 14, 28, 42 e 56 dias (n=30).....	94
Tabela 33	Médias e desvios-padrão do número de formas juvenis de <i>E. andrei</i> durante o ensaio de reprodução.....	98
Tabela 34	Densidade e viabilidade celular de <i>E. Andrei</i> após 14 dias de exposição ao solo controle, bioestimulado e recém-contaminado (n=4).....	100

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	21
1.1	Características do petróleo e sua interação com o solo	21
1.1.1	<u>Petróleo e sua características</u>	21
1.1.2	<u>Hidrocarbonetos totais de petróleo</u>	22
1.1.2.1	Valores orientadores para Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) em solo.....	24
1.1.3	<u>Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)</u>	24
1.1.3.1	Aspectos toxicológicos dos HPAs.....	27
1.1.3.2	Valores orientadores para Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) em solo.....	29
1.1.4	<u>Métodos de extração de hidrocarbonetos de petróleo</u>	30
1.1.4.1	A cromatografia gasosa na análise química dos hidrocarbonetos de petróleo.....	32
1.1.5	<u>O solo e o petróleo</u>	32
1.1.5.1	O comportamento do petróleo no solo.....	33
1.1.6	<u>Técnicas de remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos</u>	35
1.1.6.1	Processos físicos e químicos.....	35
1.1.6.2	Processos biológicos.....	36
1.1.6.2.1	Fitorremediação.....	36
1.1.6.2.2	Biorremediação.....	37
1.2	Ecotoxicologia	41
1.2.1	<u>Ensaio de toxicidade</u>	44
1.2.1.1	Ensaio de toxicidade aguda.....	46
1.2.1.2	Ensaio de toxicidade crônica.....	48
1.2.1.3	Ensaio de genotoxicidade.....	49
1.2.2	<u>Escolha do organismo-teste</u>	50
1.2.3	<u>Ecotoxicologia terrestre</u>	53
1.2.3.1	Utilização das minhocas <i>Eisenia sp.</i> em testes de toxicidade.....	54

1.2.3.2	Ensaio de toxicidade na avaliação de solos biorremediados.....	55
2	METODOLOGIA.....	58
2.1	Experimentos de biorremediação que deram origem ao solo estudado.....	58
2.2	Contaminação do solo para os ensaios de toxicidade.....	59
2.3	Caracterização dos solos após coleta dos reatores.....	62
2.3.1	<u>pH.....</u>	62
2.3.1.1	Correção do pH dos solos para os testes de toxicidade.....	62
2.3.2	<u>Capacidade de campo.....</u>	63
2.3.3	<u>Umidade.....</u>	63
2.3.4	<u>Extração dos hidrocarbonetos de petróleo.....</u>	64
2.3.4.1	Extração por Soxhlet.....	64
2.3.4.2	Extração por Micro-ondas.....	65
2.3.4.3	Extração acelerada por solvente (ASE).....	67
2.3.5	<u>Quantificação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP).....</u>	68
2.3.6	<u>Quantificação dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).....</u>	69
2.4	Ensaio de toxicidade.....	71
2.4.1	<u>Cultura das minhocas.....</u>	71
2.4.2	<u>Ensaio de sensibilidade.....</u>	71
2.4.3	<u>Desenho experimental.....</u>	72
2.4.4	<u>Extração, contagem e viabilidade das células de anelídeos expostos.....</u>	74
2.5	Análise estatística.....	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.1	Caracterização do solo controle e biorremediados.....	77
3.1.1	<u>Caracterização física e química.....</u>	77
3.1.2	<u>Metais.....</u>	80
3.1.3	<u>Comparação das técnicas de extração de hidrocarbonetos.....</u>	80
3.1.3.1	Extração dos HTPs.....	80
3.1.3.2	Extração dos HPAs.....	85
3.2	Ensaio de toxicidade.....	92
3.2.1	<u>Ensaio de sensibilidade.....</u>	92

3.2.2	<u>Avaliação dos efeitos letais</u>	94
3.2.3	<u>Avaliação dos efeitos sub-letais</u>	96
3.2.3.1	Avaliação da biomassa.....	96
3.2.3.2	Deformações anatômicas.....	97
3.2.4	<u>Avaliação dos efeitos crônicos</u>	98
3.2.4.1	Reprodução – Ovos e formas juvenis.....	99
3.2.5	<u>Avaliação dos efeitos genotóxicos</u>	100
3.2.5.1	Viabilidade e densidade celular.....	100
3.2.5.2	Micronúcleo.....	101
4	CONCLUSÃO	105
5	SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS	106
	REFERÊNCIAS	107
	APENDICE A – Análises cromatográficas de HTP e HPA resultantes de diferentes técnicas de extração (Soxhlet, MARS, ASE) realizadas no LABIFI.....	119
	APÊNDICE B – Análise estatística da LC50 de <i>E. Andrei</i> para a substância de referência 2-cloroacetamida através do método Probit utilizando o software Minitab 15.....	135
	APENDICE C – Estudo Comparativo de Técnicas de Extração de HTP e HPA de solos argiloso e arenoso: Soxhlet, Micro-ondas e Extração Acelerada por Solvente.....	137
	APENCICE D – Toxicidade aguda, crônica e genotoxicidade para <i>Eisenia andrei</i> de solo biorremediado e recém-contaminado por óleo lubrificante usado.....	156
	APENDICE E – Toxicidade aguda e crônica sobre <i>Eisenia andrei</i> de solos com e sem histórico de contaminação por petróleo e derivados.....	187

INTRODUÇÃO

A atividade humana introduz diversos compostos, estranhos ou já existentes, no ambiente, podendo ser agrotóxicos, metais, derivados de petróleo e resíduos de atividade industrial (Andréa, 2010). Os impactos causados pela disposição inadequada ou acidentes desses compostos no ambiente podem contaminar águas superficiais ou subterrâneas através da lixiviação do contaminante pelo solo contaminado (Rodrigues, 2005).

As indústrias do setor petroquímico têm recebido muito incentivos, visto os investimentos com o pré-sal (Petrobrás, 2012), porém, junto ao desenvolvimento, está associado o aumento da poluição e seus derivados. Os solos contaminados com petróleo correspondem à maior parte dos 12% do total de resíduos gerados associados à produção do petróleo (Seabra, 2005).

Devido à ocorrência de casos de vazamentos de oleodutos e postos de gasolinas, as contaminações de solos por hidrocarbonetos derivados de petróleo têm sido motivo de preocupação, repercussão na sociedade e alvo de inúmeras pesquisas de profissionais de várias áreas, no intuito de desenvolver técnicas de remediação para a descontaminação dessas áreas (Mariano, 2006).

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos presente no óleo cru, sendo poluentes potenciais de água e solos em derramamento de óleo e combustíveis. Além disso, alguns HPA são sabidamente carcinogênicos, como Benzo(a)pireno e Benzo(a)antraceno (Oga, 2008).

A qualidade do solo, assim como as tentativas de remediação de áreas contaminadas, pode ser avaliada através da toxicidade sobre organismos do solo (Dorn et al, 1998). A biorremediação é o uso de agentes biológicos capazes de metabolizar compostos (Mariano, 2006) sendo considerado um tratamento viável para a remediação de áreas contaminadas por petróleo e derivados, pois acelera o processo natural de biodegradação dos poluentes, sendo eficaz na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (Millioli, 2009).

As minhocas são importantes membros da fauna do solo e possuem um grande número de características que tornam apropriado seu uso nas avaliações de solos contaminados (Correia & Moreira, 2010). Os contaminantes no solo podem ficar adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo e, desse modo, as minhocas entram em contato com os compostos por meio da ingestão do solo (Spadotto et al, 2004).

Os ensaios de toxicidade relacionam os efeitos adversos observados em determinada área com medidas diretas da biodisponibilidade dos poluentes, avaliando exposições agudas, sub-letais e crônicas medindo os efeitos biológicos resultantes das exposições, tais como, mortalidade, crescimentos, efeitos morfológicos, comportamentais, reprodutivos e celulares (Andréa, 2010).

Teste de toxicidade para avaliar a contaminação por petróleo e derivados em solos e avaliar a técnica de biorremediação, utilizando minhocas da espécie *Eisenia sp.* vêm sendo realizados observando, especialmente, a mortalidade (Millioli, 2009; Chagas-Spinelli, 2007; Ramos, 2007). No entanto, são necessárias avaliações de efeitos crônicos e sub-letais para entender de fato os efeitos e destino dos hidrocarbonetos de petróleo no ecossistema.

Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação da toxicidade aguda, crônica e genotoxicidade causadas a *Eisenia andrei* por solo recém contaminado por óleo lubrificante usado, solo contaminado e tratado ao longo de 22 meses com diferentes estratégias de biorremediação, e solo com contaminação antiga não tratado.

Objetivos específicos

- Analisar as características físicas e químicas dos solos contaminados por óleo lubrificante usado após 22 meses de tratado por diferentes estratégias de biorremediação;
- Comparar a eficiência de recuperação de diferentes frações de hidrocarbonetos de petróleo de três técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas, extração por solvente acelerada) para os solos estudados;

- Avaliar a toxicidade aguda dos solos a partir de ensaios de mortalidade sobre *E. andrei*;
- Avaliar a toxicidade crônica dos solos a partir de observação na diminuição da biomassa e alterações morfológicas com *E. andrei*;
- Avaliar a toxicidade crônica dos solos a partir de teste de reprodução observando a quantidade de ovos e formas juvenis produzidas por *E. andrei*;
- Avaliar a genotoxicidade dos solos a partir de teste de densidade e viabilidade de coleomócitos e teste de micronúcleo.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Características do petróleo e sua interação com o solo

1.1.1 Petróleo e suas características

O petróleo, também conhecido como óleo cru, petróleo cru ou “ouro negro”, tem sido utilizado desde a antiguidade pelo homem. No entanto, somente no século XVIII começou a ser utilizado comercialmente e, com o passar do tempo, foi substituindo outras fontes de energia como a madeira e o carvão (Pedrozo *et al.*, 2002). Hoje, o petróleo possui vários derivados importantes utilizados na sociedade, sendo imprescindível na vida cotidiana (Petrobrás, 2012; Aguiar, 2006; Pedrozo *et al.*, 2002).

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e quantidade variáveis de enxofre, nitrogênio e oxigênio que pode ser encontrado naturalmente em determinadas formações geológicas como um combustível fóssil, resultante da transformação e da decomposição da matéria orgânica, proveniente de restos de animais e vegetais sedimentados, causada pela ação de bactérias em meio com baixo teor de oxigênio (Petrobrás, 2012; Farias, 2009; Silva, 2007; Kolesnikovas, 2006; Pedrozo *et al.*, 2002). Em linhas gerais, a composição do petróleo é indicada na Tabela 1:

Tabela 1: Composição elementar média do petróleo.

Elemento	% Em Peso
Carbono	83.00 a 87.00
Hidrogênio	11.00 a 14.00
Enxofre	0.06 a 8.00
Nitrogênio	0.11 a 1.70
Oxigênio	0.5
Metais (Fe, Zn, V, Cr, Pb)	0.3

Fonte: Pedrozo *et al.* (2002).

O petróleo contém hidrocarbonetos que podem variar desde moléculas simples como o metano (CH_4) até moléculas complexas, como o benzo(g,h,i)perileno ($\text{C}_{22}\text{H}_{12}$), motivo pelo qual os diferentes compostos são agrupados em frações. A fração saturada compreende os n-alcanos, alcanos ramificados e os cicloalcanos, enquanto que a fração aromática compreende compostos contendo um ou mais anéis benzênicos de forma linear, angular ou agrupada (Silva, 2007).

O petróleo serve como matéria-prima para a produção anual de cerca de três bilhões de toneladas de produtos químicos, como combustíveis, solventes, óleos lubrificantes, parafinas, asfaltos e outros derivados (Pedrozo *et al.*, 2002).

A interação dos hidrocarbonetos entre si e sua solubilidade na água dependerão da polaridade de suas moléculas. Geralmente, quanto maior a sua polaridade maior será a sua solubilidade na água e o seu ponto de ebulição. Os hidrocarbonetos aromáticos são relativamente mais solúveis na água e menos voláteis do que os hidrocarbonetos parafínicos com o mesmo número de átomos de carbono correspondentes (Pedrozo *et al.*, 2002).

1.1.2 Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Hidrocarboneto total de petróleo (HTP) é um termo utilizado para descrever uma família com vários compostos presentes no óleo cru. Nesse sentido, os HTP podem ser considerados como uma mistura de substâncias químicas. A denominação hidrocarbonetos tem origem no fato de que tais compostos são na sua maioria formados por hidrogênio e carbono. Os produtos derivados do petróleo podem conter HTP em sua composição (ASTDR, 1995).

Dentre os componentes do petróleo, os hidrocarbonetos alifáticos formam o maior grupo de compostos englobando tanto os de cadeia linear quanto os de cadeia ramificada (Figura 1). Os n-alcanos são importantes constituintes desse tipo de hidrocarbonetos, possuem cadeia normal e saturada (Ferreira, 2010; Ramos, 2007).

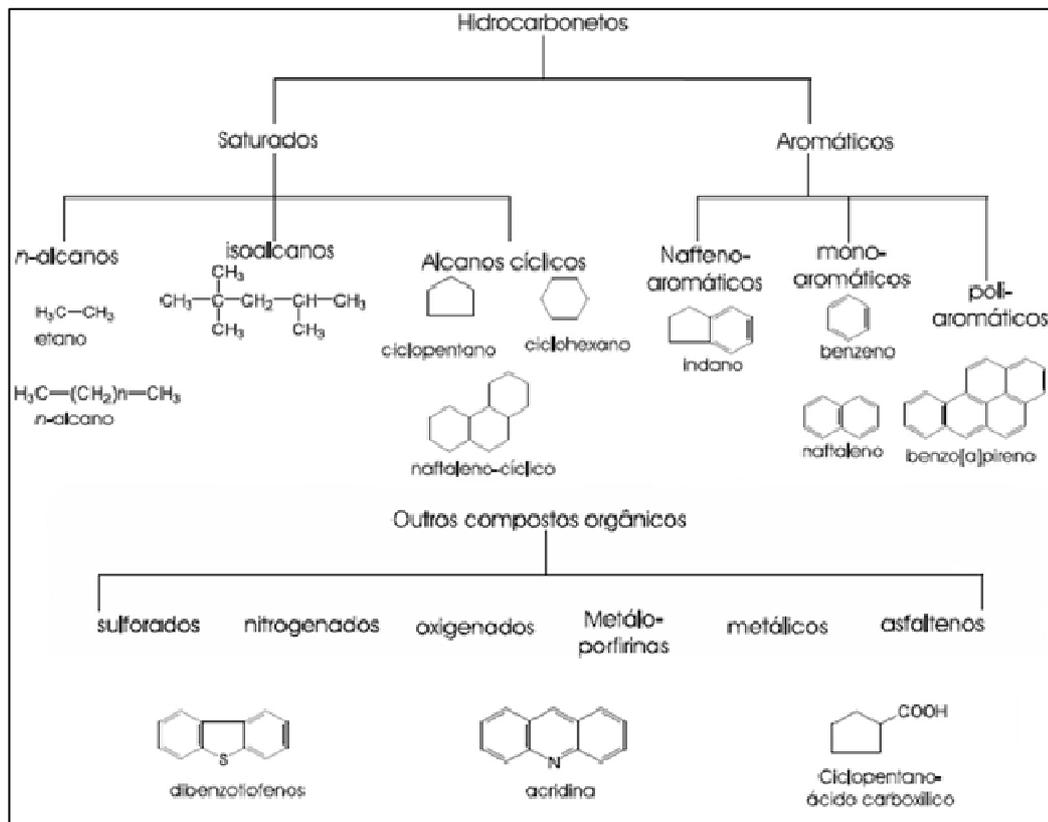


Figura 1: Composição e divisão dos hidrocarbonetos de petróleo Fonte: Aguiar, 2006.

Os **hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)** correspondem à soma dos n-alcenos passíveis de identificação em análises cromatográficas. Os “hidrocarbonetos resolvidos totais” (HRT) são hidrocarbonetos não degradados aparecendo no cromatograma como picos bem resolvidos, porém não identificados (Silva, 2010) ; e uma grande parte dos componentes que não são passíveis de quantificação nem identificação e aparecem no cromatograma como uma “lombada”, é denominada de “mistura complexa não resolvida (MCNR) ou UCM (*Unresolved Complex Mixture*) (Ferreira, 2010; Silva, 2010; Mariano, 2006). Os componentes presentes na UCM são recalcitrantes, portanto, mais difíceis de serem biodegradados apresentando uma tendência de acumulação na matriz ambiental (Coimbra, 2006).

A determinação dos HTP nas matrizes ambientais é bastante utilizada para avaliação de áreas impactadas por derramamentos de petróleo (Ferreira, 2010).

1.1.2.1. Valores orientadores para Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP)

A legislação brasileira não estabelece valores orientadores para HTP nos compartimentos ambientais. Em diversos países, onde são estabelecidos valores de qualidade e de intervenção nos solos, os HTP são pouco utilizados como indicador da qualidade do solo.

Ferreira (2010) destaca que a Lista Holandesa determina valores para a qualidade do solo e de águas subterrâneas. A Tabela 2 indica os valores considerados para o solo limpo (S), para o valor de intervenção (I), o qual já apresenta riscos para a saúde humana e o meio ambiente, e o valor de alerta (T), que é o valor médio entre os dois primeiros S e I, e indica a ocorrência de alteração nas características do solo. Segundo Seabra (2005), na chamada Lista de Berlim, os valores variam de 300 a 5000 mg kg⁻² (peso seco) de HTP, dependendo da sensibilidade do local.

Tabela 2: Valores orientadores de HTP em mg kg⁻¹ (peso seco) no solo encontrados na -Lista Holandesa.

S (solo limpo)	T (alerta)	I (intervenção)
50	2525	5000

Fonte: Ferreira (2010).

1.1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromático tendo, assim como seus derivados, ampla distribuição nos compartimentos ambientais (Netto et al., 2000). Os HPA são considerados poluentes prioritários em estudos ambientais, pois alguns são conhecidamente tóxicos e carcinogênicos (IARC, 2000; Manzo *et al.*, 2008; Oga, 1998). Podem se ligar entre si e formarem mais de 100 HPA. Essas moléculas são introduzidas no ambiente de forma contínua em decorrência da combustão de substâncias orgânicas incêndios em florestas, pela atividade industrial, pelos processos de extração, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados (Jacques *et al.*, 2007; Baird, 2002).

Os HPA são abundantes e difundidos em nosso meio ambiente moderno, estando associado com a poluição do ar, solo e água. Os HPA de origem pirogênica são formados com a fuligem durante a combustão, isto é, eventos de combustão curtos e com alta temperatura. Outros HPA, chamados de HPA petrogênicos, são originados de fontes petroquímicas, tais como derramamento de óleo (Pedrozo et al, 2002).

Devido à abundância, toxicidade e potencial de exposição humana destes compostos, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 1998) indicou os 16 HPA considerados prioritários e necessários de investigação nos compartimentos ambientais (Figura 2).

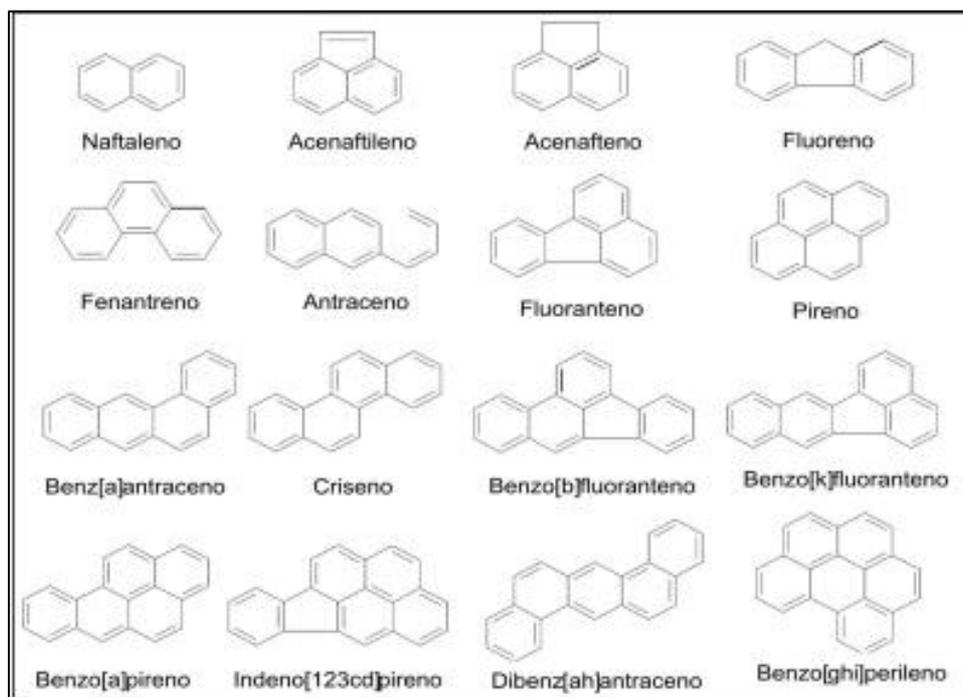


Figura 2: Estrutura química dos 16 HPA considerados prioritários pela USEPA (USEPA, 1998).

Os HPA podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais, tais como atmosfera, solo, sedimento e, por bioacumulação, são incorporados aos organismos animais e vegetais (Junior, 2006). Em solos, é mais provável que os HPA fiquem adsorvidos às partículas sólidas, sendo que os de peso molecular mais baixo, podem evaporar a partir da superfície.

O tempo de decomposição destes compostos no solo e na água pode variar de semanas a meses e é causada, inicialmente, pela ação de microrganismos (ATSDR, 1995).

O transporte e a partição dos HPA no meio ambiente são determinados por várias propriedades físicas e químicas dos mesmos (Tabela 3), tais como solubilidade em água, pressão de vapor, constante de Henry, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e o coeficiente de partição de carbono orgânico presentes nos solos e em sedimentos (Aguiar, 2006).

Tabela 3: Algumas propriedades físicas e químicas dos HPA.

HPA	Nº de anéis	M.M	C^s (mg L ⁻¹)	Log K_{ow}	P (Torr a 20°C)
Naftaleno	2	128	30	3,37	$4,9 \times 10^{-2}$
Acenaftileno	3	152	3,93	4,07	$2,1 \times 10^{-2}$
Acenafteno	3	154	3,47	4,33	$2,0 \times 10^{-2}$
Fluoreno	3	166	1,98	4,18	$1,3 \times 10^{-2}$
Fenantreno	3	178	1,29	4,46	$6,8 \times 10^{-4}$
Antraceno	3	178	$7,0 \times 10^{-2}$	4,45	$1,9 \times 10^{-4}$
Fluoranteno	4	202	$2,6 \times 10^{-1}$	5,33	$6,0 \times 10^{-6}$
Pireno	4	202	$1,4 \times 10^{-1}$	5,32	$6,8 \times 10^{-7}$
Benzo(a)antraceno	4	228	$1,4 \times 10^{-2}$	5,61	$5,0 \times 10^{-9}$
Criseno	4	228	$2,0 \times 10^{-3}$	5,61	$6,3 \times 10^{-7}$
Benzo(b)fluoranteno	5	252	$1,2 \times 10^{-3}$	6,57	$5,0 \times 10^{-7}$
Benzo(k)fluoranteno	5	252	$5,5 \times 10^{-4}$	6,84	$5,0 \times 10^{-7}$
Benzo(a)pireno	5	252	$3,8 \times 10^{-3}$	6,04	$5,0 \times 10^{-7}$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	6	276	$6,2 \times 10^{-2}$	7,66	$1,0 \times 10^{-10}$
Dibenzo(ah)antraceno	6	278	$5,0 \times 10^{-3}$	5,97	$1,0 \times 10^{-10}$
Benzo(g,h,i)perileno	6	276	$2,6 \times 10^{-4}$	7,23	$1,0 \times 10^{-10}$

M.M. = massa molar; C^s = solubilidade em água; K_{ow} = Coeficiente de partição octanol-água; P = pressão de vapor

1.1.3.1 Aspectos toxicológicos dos HPAs

A exposição humana aos HPA se dá principalmente através da contaminação ambiental. Em virtude das suas características físicas e químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por estas substâncias é significativo. Devido o seu caráter lipofílico, HPA podem ser absorvidos pela pele, pela ingestão e pela inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo (Netto *et al.*, 2000).

Os HPA são altamente lipossolúveis, por isso são absorvidos rapidamente pelos pulmões, intestinos e pela pele de animais experimentais, independente da via de administração (Meire *et al.*, 2007). O contato humano com os HPA pode ocorrer de diversas formas, dentre elas podemos citar o consumo de água, partículas de solo, carnes grelhadas, gases atmosféricos e contato direto com o contaminante (Junior, 2006).

Netto *et al.* (2000) observaram que testes laboratoriais realizados com diversos HPA para verificação de suas características carcinogênicas, mutagênicas ou genotóxicas mostraram que os efeitos variam de acordo com os diferentes compostos (Tabela 4). Além disso, o potencial carcinogênico e mutagênico é maior para aqueles com maior número de anéis aromáticos.

A metabolização dos HPA gera compostos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (Jacques *et al.*, 2007).

Vários estudos evidenciam a genotoxicidade de HPA em diversos organismos. Dentre eles, as minhocas (*Eisenia sp.*) são bons indicadores para solos contaminados com derivados de petróleo, em especial, HPA (Bonnard *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2006; Di Marzio *et al.*, 2005), pesticidas (Correia & Moreira, 2010; Ribera *et al.*, 2001; Zang *et al.*, 2000) e metais (Lourenço *et al.*, 2011; Homa *et al.*, 2007; Plytycz *et al.*, 2007; Spurgeon *et al.*, 2000).

Tabela 4: Características carcinogênicas, mutagênicas e genotóxicas dos HPA.

HPA	Carcinogenicidade	Genotoxicidade	Mutagenicidade
Fluoreno	I	L	-
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Fluoranteno	N	L	+
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzofluorantenos	S	I	+
Ciclopenta[cd]pireno	L	S	+
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Trifenileno	I	I	+
Benzo[e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Perileno	I	I	+
Indeno[1,2,3-cd]pireno	S	I	+
Dibenz[ac]antraceno	L	S	+
Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Dibenz[aj]antraceno	L	I	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Antranteno	L	I	+
Coroneno	I	I	+
Dibenzo[ac]fluoranteno	L	N	
Dibenzopirenos	S	I	+
2-nitronaftalenos	N	L	-
1-nitropireno	I	S	+
Dinitropireno			+

Dados disponíveis para comprovação de efeito: S= suficientes; I= insuficientes; L=limitados; N= não carcinogênico. A genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA, aberração cromossômica, micronúcleos, mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconclusivo). Fonte: Netto *et al.* (2000).

1.1.3.2. Valores orientadores para Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em solos

A resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009, dispõe sobre valores orientadores da qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias decorrentes de atividades antrópicas. Esses valores foram trazidos dos valores considerados pela CETESB (2005). Outros valores referenciados na literatura são a Lista Holandesa (2009) e a Lista Canadense (2008). A Tabela 5 indica os valores das três normas acima citadas:

Tabela 5: Valores orientadores de HPA no solo.

COMPOSTO (nº de anéis aromáticos)	CONAMA 420 (mg/kg)	CANADENSE (mg/kg)	HOLANDESA (mg/kg)
Naftaleno (2)	0,12	0,14	*
Acenaftileno (3)	**	**	*
Acenafteno (3)	**	**	*
Fluoreno (3)	**	**	*
Fenantreno (3)	3,3	0,51	*
Antraceno (3)	0,039	0,12	*
Fuoranteno (4)	**	**	*
Pireno (4)	**	**	*
Benzo (a) antraceno (4)	0,025	0,25	*
Criseno (4)	8,1	10,7	*
Benzo (b) fluoranteno (5)	**	**	*
Benzo (k) fluoranteno (5)	0,38	2,4	*
Benzo (a) pireno (5)	0,052	0,26	*
Indeno (1,2,3-c,d) pireno (6)	0,031	**	*
Dibenzo (a,h) antraceno (6)	0,08	**	*
Benzo (g,h,i) pirleno (6)	0,57	7,5	*

** Não possui valores para esse composto

* $\Sigma = 40$ mg

1.1.4. Métodos de extração de hidrocarbonetos de petróleo

De maneira geral, a detecção e quantificação da presença de hidrocarbonetos de petróleo em solos pode ser dividido em duas etapas. A primeira está relacionada ao preparo da amostra para obtenção de um extrato contendo os analitos de interesse. A segunda envolve a separação dos analitos por cromatografia e determinada por espectrometria de massa (Ferreira, 2010; Junior, 2006).

Para que um composto seja extraído é necessário que ele interaja com o solvente selecionado, sendo que essa interação depende de três fatores principais: tempo de contato (interação), solubilidade do analito no solvente e a disponibilidade do solvente ao composto presente no solo, que por sua vez, depende das características do solo (Ferreira, 2010).

Na literatura encontram-se diversos métodos de extração de hidrocarbonetos em solos, sendo os mais utilizados o soxhlet (Cianella, 2010; Silva, 2010; Silva, 2007; Chagas-Spinelli, 2007; Aguiar, 2006), extração por agitação, no caso para HPA (Andrade, 2009, Pereira, 2008); extração por ultrassom (Millioli, 2009; Barros, 2007), extração por ASE (Accelerated Solvent Extraction) (Seabra, 2005). O método de extração por soxhlet é o mais utilizado e é o recomendado pela U.S EPA para extração de compostos orgânicos semi-voláteis e não voláteis de matrizes sólidas. Essa técnica tem sido preferida por ser padronizada e ter recuperação aceitável quando comparada com outras técnicas. No entanto, a extração por soxhlet é muito trabalhosa, requer uma grande quantidade de solvente, um grande tempo de extração (6-24 h) e pode degradar compostos termo-lábeis (Queiroz *et al.*, 2009).

Na extração por soxhlet com base no método 3540 da U.S. EPA (EPA, 1996), o solvente é aquecido, passando pela amostra de solo ou sedimento continuamente por 16 a 24 h. Como a quantidade de solvente utilizado por amostra é muito grande, cerca de 200 ml, frequentemente é necessária a concentração da amostra após extração. Na extração acelerada por solvente (ASE), com base no método 3445 da U.S. EPA (EPA, 1996), o solvente é aquecido, pressurizado e passado pela amostra. Esse método apresenta eficiência de extração comparável ao soxhlet, além disso, requer uma quantidade pequena de solvente, 25 ml, e o tempo de extração é de 30 min por amostra. No entanto, a extração por ASE possui a desvantagem do alto custo do equipamento e o gasto com gás nitrogênio. Já a extração por micro-ondas, com base no método 3535 da U.S. EPA (EPA, 1996), envolve o uso da energia de

micro-ondas para produzir condições de elevada temperatura e pressão em um recipiente fechado contendo a amostra e o solvente orgânico. Suas vantagens são o baixo uso de solvente, ou seja, 25 ml por amostra; a possibilidade de realizar a extração de 32 amostras simultaneamente o baixo tempo de extração (20 min) tornam o método particularmente atraente.

Alguns estudos têm comparado diferentes técnicas de extração para hidrocarbonetos de petróleo para avaliar uma técnica que tenha uma boa recuperação, tal como a do soxhlet, no entanto, gaste menos solvente, menos tempo de extração e faça mais amostras por extração.

Queiroz et al. (2009), avaliando diferentes métodos de extração de HPA em solo, sedimento e lodo, observaram que a extração através do soxhlet envolve consumo de maior quantidade de solvente e maior tempo de extração. No entanto, o soxhlet é o método mais tradicional e testado e o que requer menor investimento em equipamentos. Já outras técnicas como micro-ondas e extração por fluido pressurizado são mais rápidas, entretanto, necessita de um alto investimento com equipamento. Chegaram à conclusão de que a técnica de extração com ultrassom seria mais barata e utilizaria menor quantidade de solvente.

Com o mesmo intuito, Wang et al (2007) comparam três métodos de extração, soxhlet, micro-ondas e ASE, para solos contaminados com HPA e pesticidas organoclorados e observaram que o ASE é o método que obteve a melhor eficiência de extração quando comparado ao micro-ondas e ao soxhlet para os HPA e a eficiência de extração entre o micro-ondas e o soxhlet era comparável.

Junior (2006) objetivou em seu trabalho comparar as metodologias de extração de HPA em solo (ultra-som, soxhlet e agitação mecânica) e a eficiência de cada uma. O resultado obtido foi que a técnica de ultra-som, apesar de fornecer menor recuperação do contaminantes (com relação aos HPA naftaleno, acenaftileno, fenantreno e fluoranteno) entre os métodos estudados, foi superior ao soxhlet e à agitação mecânica no que diz respeito à recuperação do padrão d-10 fluoranteno em particular, menor consumo de solvente e tempo de extração reduzido.

O método de ultrassom foi comparado com a extração por soxhlet no estudo de Guerin (1999) com solo com contaminação antiga por HPA. O autor relatou que a eficiência do ultrassom foi similar à eficiência do soxhlet na recuperação do HPA,

sendo que os HPA mais voláteis eram perdidos logo nas primeiras horas de extração na técnica soxhlet.

1.1.4.1. A cromatografia gasosa na análise química dos hidrocarbonetos de petróleo

A cromatografia gasosa é uma técnica largamente empregada para a separação de misturas complexas. Na cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS), a mistura extraída é injetada no cromatógrafo, e seus componentes são separados à medida que percorrem uma fase fixa (coluna cromatográfica), arrastados que são pela fase móvel (gás, geralmente, o Hélio). Ao percorrerem a coluna, os compostos da mistura são, pouco a pouco, separados e detectados à medida que chegam ao espectrômetro de massas (Faria et al, 2009). Assim, a cromatografia gasosa, em função de suas características tais como possibilitar a separação dos diversos componentes de uma mistura complexa (como é o caso do petróleo), permitindo, ainda, a identificação e a quantificação das espécies químicas presentes na mistura, constitui-se na técnica das mais apropriadas para a análise do petróleo e de seus derivados (Faria et al, 2009).

1.1.5 O solo e o petróleo

O solo é um corpo natural da superfície terrestre, independente e dinâmico, e representado pela parte intemperizada da crosta terrestre, que contém matéria viva e matéria inorgânica. Os fatores de formação do solo (relevo, tempo, clima e organismos vivos) e os fatores pedogenéticos são os responsáveis pelas adaptações e alterações da rocha mãe (Barros, 2007; EMBRAPA, 2012).

A maioria dos solos é composta principalmente por partículas provenientes de rochas expostas ao intemperismo. Os principais componentes do solo variam de acordo com o tipo do solo, mas são normalmente ar (20-30%), água (20-30%), minerais (45%) e matéria orgânica (5%). A matéria orgânica é proveniente de material animal e vegetal depositado na superfície do solo (Baird, 2002).

As características do solo variam, horizontal e verticalmente. A mais óbvia, que é influenciada pelo tempo é a espessura. O período durante o qual o material de origem esteve exposto à ação de alguns fatores de formação – nesse caso o tempo e o clima – indica que solos mais jovens são, normalmente, mais rasos, pois ficaram

menos tempo expostos, do que os velhos que ficaram expostos por mais tempo. Diferentes condições climáticas também são importantes, pois formam solos completamente distintos (Lepsch, 1993). Segundo Lepsch (1993), a biota presente no solo (micro-organismos, animais e vegetais) desempenha importante papel na diferenciação dos perfis do solo. Os microrganismos atuam principalmente, na decomposição de restos vegetais e animais formando o húmus que fica depositado na superfície do solo. Muitos organismos podem efetivamente se alimentar de hidrocarbonetos, transformando-os, por via metabólica, em CO₂ e H₂O, ou ainda, em outros compostos orgânicos. Dessa forma, tais organismos podem contribuir com dois processos relevantes, sendo o primeiro desejável e o segundo, indesejável: (a) atuar na descontaminação de áreas (biorremediação) ou; (b) atuar alterando a composição de combustíveis armazenados (Pedrozo et al, 2002).

1.1.5.1. O comportamento do petróleo no solo

Uma das formas pela qual o petróleo e seus derivados podem ser liberados para o meio ambiente é através de acidente durante o processo do seu uso (carga, descarga, transporte, produção de subprodutos, resíduos, dentre outros). É importante o conhecimento do comportamento dos diferentes petro-derivados no solo, água e ar para a avaliação dos efeitos à saúde e à biota decorrente dessa exposição (Pedrozo *et al.*, 2002).

Vários processos estão envolvidos no transporte dos componentes do petróleo no meio ambiente. Dentre eles podemos destacar: volatilização, hidrólise, fotólise, biodegradação, biotransformação, degradação física e dissolução (Pedrozo *et al.*, 2002). Sobre a contaminação, é preciso levar em consideração que, após o contato com o ambiente, o petróleo sofre alterações em função de fatores físicos e químicos (adsorção/desorção, oxidação fotoquímica, dentre outros) e biológicos (biodegradação) (Dorn & Salanitro, 2000).

Os petroderivados liberados no solo migram por dois mecanismos principais: (1) como uma massa de óleo que, por ação da gravidade e capilaridade, percola no solo e; (2) como substâncias individuais que se dissolvem, na água ou no ar, e se separam dessa massa. Alguns fatores afetam a velocidade da percolação da massa de óleo, dentre eles estão o teor de água do solo, a vegetação, a geologia do local, o

clima, a granulometria, a viscosidade do óleo e a velocidade de liberação do mesmo (Reid *et al.*, 2000).

Uma vez que os compostos apresentam diferentes propriedades de sorção, pressão de vapor, solubilidade, densidade, dentre outros, durante a percolação, os mesmos podem se separar em fases distintas, tais como: fase líquida residual, fase de vapor e fase dissolvida. A passagem desses compostos de uma fase para outra pode envolver a qualidade ambiental do solo, do ar e da água (Mariano, 2006).

As interações de um contaminante com o solo são influenciadas pela quantidade e natureza da matéria orgânica, pelos constituintes inorgânicos, como poro e estrutura, pela população microbiana e pela concentração do poluente. A adsorção aos constituintes do solo favorece a persistência dos compostos e limita a capacidade de biodegradação dos microrganismos (Figura 3) (Vidali, 2001; Reid *et al.*, 2000). Nos solos, principalmente os argilosos, os contaminantes são adsorvidos às partículas do solo, devido à baixa permeabilidade inerente a este tipo de solo, dificultam a penetração de nutrientes e de oxigênio, dificultando a biodegradação dos compostos (Trindade, 2002; Vidali, 2001).

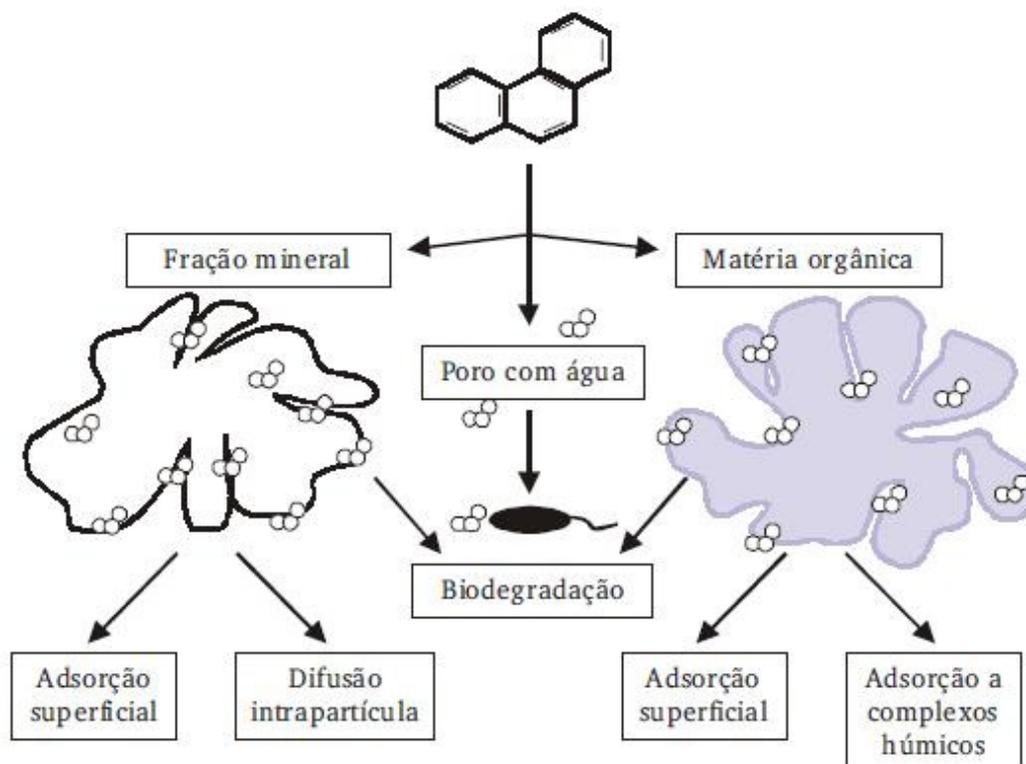


Figura 3: Processos de interação entre o contaminante e o solo Fonte: Trindade (2002).

1.1.6 Técnicas de remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos

As técnicas para remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos se dividem em processos físicos, químicos e biológicos. Em alguns casos, pode ser feita a combinação de mais de uma técnica para um melhor resultado (Ferreira, 2010).

O estudo da descontaminação de uma área contaminada requer um diagnóstico da evolução da contaminação e o tipo de contaminante da referida área. Um dos critérios para utilização dos métodos de descontaminação é o local de aplicação do tratamento, que pode ser classificado em: tratamento "*in-situ*", ou seja, no local da contaminação; e tratamento "*ex-situ*", ou seja, realizado fora do local da contaminação (Wolff, 2011; Baird, 2002). De acordo com Pedrozo *et al.* (2002), as técnicas de remediação foram criadas para prevenir ou mitigar ameaças à saúde pública e ao meio ambiente e tem como principais objetivos:

- ✓ Prevenir a exposição humana através da ingestão, inalação e contato dérmico com o solo contaminado;
- ✓ Prevenir a exposição ecológica através da bioacumulação decorrente da absorção, contato e inalação de solo contaminado;
- ✓ Prevenir a percolação dos contaminantes evitando que atinjam as águas subterrâneas;
- ✓ Remover a fase líquida não-aquosa leve dos aquíferos que é fonte contínua de sua contaminação.

1.1.6.1. Processos Físicos e Químicos

Para utilização de tratamento físico e químico, normalmente são colocadas em questão as propriedades físicas e químicas do contaminante, tais como solubilidade, coeficiente de partição, dentre outros (Price & Sambasivam, 2003). As técnicas mais utilizadas são: processo de encapsulamento e solidificação; lavagem do solo (utilização de substância surfactante); Separação eletrocínética; Bombeamento e tratamento ("Pump-and-treat"); Processos oxidativos avançados; Extração química; e Processos térmicos (Millioli, 2009).

1.1.6.2. Processos Biológicos

Os processos biológicos têm recebido atenção crescente, pois via-de-regra causam menor impacto ambiental sobre o solo, são tecnicamente factíveis e economicamente viáveis. Existem basicamente dois tipos de processos biológicos: fitorremediação e biorremediação (que possui diferentes estratégias) (Aguiar, 2006).

1.1.6.2.1. Fitorremediação

As plantas possuem um potencial para acumular, imobilizar e transformar contaminantes que persistiram em baixas concentrações. A fitorremediação é uma tecnologia que utiliza plantas para remover contaminantes do solo e da água, sendo uma área bastante promissora (Vidali, 2001). Para utilização da técnica de fitorremediação, devem ser selecionadas espécies com potencial fitorremediador, ou seja, baseado na concentração do contaminante que determinada espécie é capaz de tolerar e germinar, pois nem todas as plantas apresentam a mesma tolerância a contaminantes específicos (Marques, 2005; Marques *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006).

De acordo com Vidali (2001), as plantas podem remediar os contaminantes por meio de cinco mecanismos básicos destacados a seguir:

- ✓ Fitoextração: capacidade de “seqüestrar” elementos tóxicos, principalmente metais;
- ✓ Rizofiltração: capacidade de absorver e, algumas vezes, precipitar contaminantes presentes em águas poluídas;
- ✓ Fitoestabilização: plantas que são tolerantes são utilizadas para estabilizar o contaminante reduzindo sua biodisponibilidade;
- ✓ Fitodegradação: associação entre plantas e micro-organismos para degradar poluentes orgânicos;
- ✓ Fitovolatilização: capacidade de volatilizar os poluentes extraídos do solo pelas plantas.

Vários trabalhos mostraram o potencial da fitorremediação como importante técnica para a recuperação de áreas degradadas (Wolff, 2011; Aguiar, 2006; Marques *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006; Marques, 2005).

1.1.6.2.2. Biorremediação

A biorremediação é a técnica que utiliza microrganismos para degradar substâncias tóxicas em substâncias inertes, tais como CO₂ e H₂O. Normalmente são utilizados fungos e bactérias para a degradação dos compostos orgânicos (Silva, 2007; Baird, 2002). Por definição, biorremediação é o uso de organismos vivos, principalmente microrganismos, para degradar os contaminantes ambientais em compostos menos tóxicos. São utilizadas bactérias e fungos para degradar essas substâncias que são perigosas para a saúde humana e o meio ambiente. Os contaminantes são transformados por esses organismos através de reações que ocorrem como parte de seus processos metabólicos. Os microrganismos degradadores podem ser indígenas da área contaminada ou podem ser introduzidos microrganismos que sabidamente possuem a capacidade de degradar o contaminante em questão (Vidali, 2001).

Para que a biorremediação seja efetiva, as condições ambientais devem ser favoráveis ao crescimento e atividade microbiana e, eventualmente, os parâmetros ambientais são manipulados para que a degradação seja favorecida e mais rápida (Vidali, 2001).

A biorremediação tem como objetivo principal a mineralização completa dos contaminantes orgânicos, ou seja, transformá-los em produtos com ou pouca toxicidade ou inerte, como CO₂ e água. Dessa maneira, os microrganismos metabolizam as substâncias orgânicas, das quais se obtêm nutrientes e energia, sendo que, para que isso ocorra, alguns fatores devem ser observados e controlados, dentre eles podemos destacar: a biodisponibilidade dos contaminantes para a população microbiana e; fatores ambientais, tais como: tipo de solo, temperatura, pH, presença de oxigênio e nutrientes (Andrade *et al.*, 2010; Vidali, 2001). A ação dos micro-organismos é retratada na Figura 4.

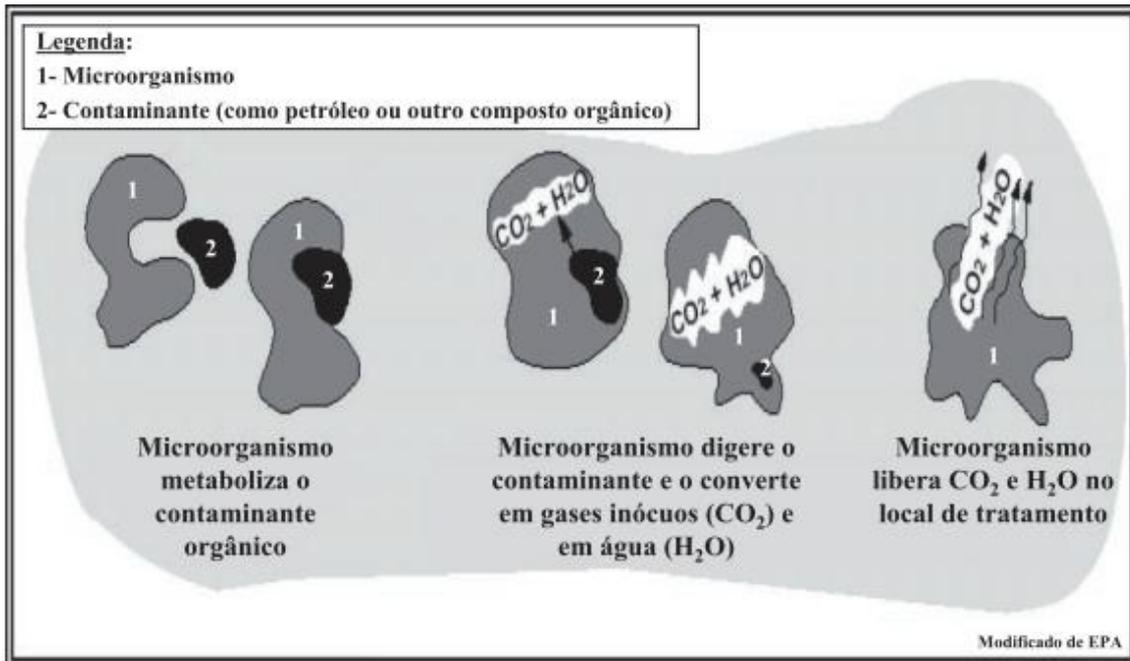


Figura 4: Ação dos microrganismos de biorremediação. Fonte: Andrade *et al.*, 2010.

O crescimento e atividade microbiana no solo são afetados pelo pH, temperatura e umidade. Um solo muito ácido é tóxico para os microrganismos; a temperatura afeta a taxa de reações bioquímica e, abaixo de uma determinada temperatura, os microrganismos geralmente morrem; uma quantidade de água disponível é essencial para a sobrevivência dos microrganismos e a manutenção e correção da umidade é importante nesse processo (Vidali, 2001). A quantidade de oxigênio disponível determina se o sistema é aeróbio ou anaeróbio. Hidrocarbonetos são degradados geralmente em condições aeróbias, por isso, para uma boa degradação é necessário a disponibilidade de oxigênio suficiente no sistema. A estrutura do solo é responsável pela disponibilidade de ar, água e nutrientes, portanto, para melhorar a estrutura do solo materiais que facilitam essa passagem podem ser adicionados. Uma baixa permeabilidade pode impedir a passagem desses itens e prejudicar a remediação (Vidali, 2001). A Tabela 6 seguir sintetiza as condições que afetam a biorremediação.

Tabela 6: Condições que afetam a biorremediação do petróleo.

Parâmetros (solo)	Condições requeridas para atividade microbiana	Valores ótimos para degradação
Umidade	25-28% da capacidade de campo	30-90%
pH	5.5-8.8	6.5-8.0
Oxigênio	Aeróbico, mínimo de espaço no poro de 10%	10-40%
Nutrientes	Nitrogênio e fósforo para o crescimento microbiano	C:N:P = 100:10:1
Temperatura (°C)	15-45	20-30
Contaminantes	Não muito tóxico	Hidrocarbonetos de 5- 10% solo seco
Metais pesados	Total de 2000 ppm	700 ppm
Tipo de solo	Baixa argila e silte	-

Fonte: Vidali (2001).

Diferentes estratégias podem ser adotadas para uma melhor otimização do processo de biorremediação. Dentre eles, destacaremos o bioestímulo e o bioaumento. O bioestímulo consiste na oferta de fontes adicionais de nutrientes, oxigênio e água para aumentar a atividade microbiana e tornar o processo mais eficaz. A adição de nutrientes e a otimização das condições ambientais permitem aumentar a atividade metabólica dos micro-organismos e, conseqüentemente, o processo de biodegradação (Andrade *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2006).

O bioaumento é caracterizado pelo aumento da microbiota do solo pela adição de micro-organismos exógenos. A utilização dessa estratégia se justifica por dois fatores: (1) uma biodegradação mais rápida do contaminante e (2) redução do período de adaptação normalmente requerido pelo microrganismos autóctones que antecede a biodegradação (Andrade *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2006; Vidali, 2001).

A estratégia do bioaumento apresenta um diferencial quando possui a finalidade de degradar contaminantes complexos, como, por exemplo, os hidrocarbonetos de petróleo, já que apresenta a possibilidade de utilização de um consórcio microbiano que apresenta a característica de aumentar a biodegradação, uma vez que diferentes micro-organismos são capazes de degradar substâncias diferentes e sobreviver a condições adversas (Silva, 2010). No entanto, alguns

autores afirmam que o bioaumento não supera a degradação quando comparada com a técnica de bioestímulo (ajuste de nutriente, oxigênio e umidade) (Cianella, 2010; Rizzo *et al.*, 2006; Seabra, 2005).

Segundo Marques (2005), no Brasil, a utilização da biorremediação ainda é considerada incipiente, no entanto apresenta considerável potencial de uso em função da biodiversidade e condições climáticas favoráveis existentes no país. A Tabela 7 indica as vantagens e limitações da biorremediação de solos:

Tabela 7: Vantagens e limitações da biorremediação de solos.

VANTAGENS	LIMITAÇÕES
A aplicação envolve o uso de equipamentos de fácil obtenção, instalação e operação.	Podem ser requeridos monitoramento contínuo por tempos longos e/ou manutenção do sítio submetido à biorremediação.
Em atividades in-situ, a biorremediação gera distúrbios mínimos ao meio ambiente.	A técnica é ineficiente para compostos orgânicos que ficam adsorvidos no solo, tornando-os indisponíveis à biodegradação.
Em condições ótimas de operação, apresenta custos menores em comparação às técnicas alternativas de remediação.	É menos eficiente em períodos menores de tempo em comparação às outras técnicas de remediação, como os processos oxidativos avançados.
Pode ser combinada com outras técnicas para acelerar o processo de descontaminação.	Contaminantes de baixa solubilidade em concentrações elevadas, como os HTPs, podem ser tóxicos aos micro-organismos e/ou não biodegradáveis, inviabilizando a utilização da técnica.
Na maioria dos casos, essa técnica não produz compostos tóxicos, que devem ser dispostos e tratados em outro local.	As propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação.
É muito eficiente na biodegradação de petróleo e seus derivados em solos permeáveis.	Dificuldade de utilização em solos argilosos ou com baixa permeabilidade.

Fonte: Andrade *et al.*, (2010); Vidali, (2001).

1.2. Ecotoxicologia

Ecotoxicologia é a ciência que estuda os contaminantes e os seus efeitos na biosfera. Pode ser definida como caracterização, conhecimento e antecipação dos efeitos deletérios de produtos químicos, naturais ou antropogênicos, no meio ambiente (Oga, 2008; Cassaret & Douls, 2008). O foco de estudo da Ecotoxicologia são as implicações decorrentes da exposição aos contaminantes ambientais, em determinada concentração, sobre os ecossistemas e seus constituintes (Hodgson, 2004). Ademais, estuda os efeitos de substâncias químicas, efluentes industriais e resíduos em uma população, na comunidade e no ecossistema, bem como as medidas necessárias para antecipar, evitar ou tratar os danos causados (Oga, 2008).

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez pelo toxicologista francês René Thuhaut, em 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, ocasião em que definiu a Ecotoxicologia como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem (Azevedo & Chasin, 2003; Cassaret & Douls, 2008; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). A Ecotoxicologia é, portanto, uma área que centraliza seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica populacional e de comunidades integrantes de determinados ecossistemas. Basicamente, a ecotoxicologia compreende a sequência de eventos denominada como cadeia de causalidade (Figura 5).

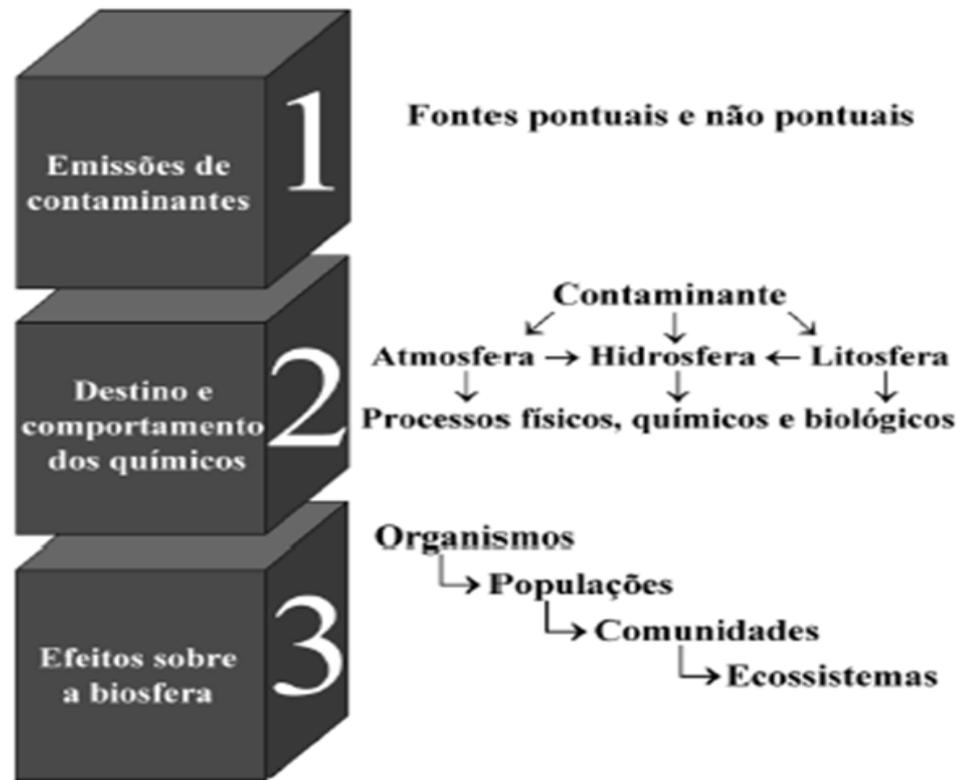


Figura 5: Cadeia de causalidade. Fonte: Costa *et al.* (2008).

As informações obtidas por meio dessa cadeia de causalidade são essenciais para determinar a quantidade, forma e locais de liberação dos contaminantes no ambiente conhecendo seu comportamento e seus destinos, além de avaliar como a substância é transportada para diferentes matrizes ambientais gerando metabólitos de comportamento e toxicidade pouco conhecidas para os organismos vivos indicando, portanto, níveis máximos permitidos de contaminantes, ou seja, os padrões a serem mantidos pela legislação com o intuito de diagnosticar e prognosticar o efeito dos contaminantes no ambiente, o efeito das medidas tomadas, controlar a emissão de resíduos e avaliar os riscos ecológicos (Costa *et al.*, 2008; Azevedo & Chasin, 2003).

Os atributos do ambiente e as peculiaridades dos contaminantes determinam, principalmente, a concentração, transporte, degradação e a disposição final de um contaminante introduzido no ambiente. As emissões de contaminantes no ar, no solo e na água estão relacionadas aos processos naturais e, sobretudo, às atividades humanas (Costa *et al.*, 2008).

As propriedades físico-químicas dos contaminantes determinam seu transporte entre as diferentes matrizes ambientais. Esse transporte está

condicionado a processos físicos abióticos, como a movimentação das massas de ar e água ou a difusão, e a fatores bióticos (Azevedo & Chasin, 2003) (Figura 6).

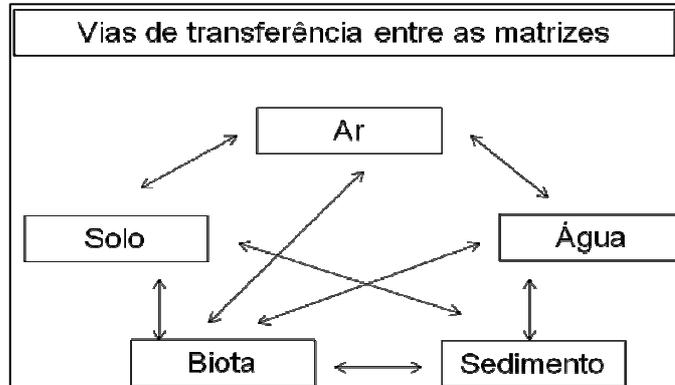


Figura 6: Vias de transferências entre as matrizes. *Fonte:* USEPA (1998).

O princípio fundamental da Ecotoxicologia é baseado na análise dos processos de transferência de contaminantes nos ecossistemas e nos efeitos sobre sua estrutura e funcionamento. Os contaminantes lançados no ambiente - podendo ser agentes físicos, químicos ou biológicos – podem ocasionar perturbações nos ecossistemas que tem como resultado conseqüências ecotoxicológicas que afetam a biosfera (Figura 7) (Boudou & Ribeyre, 1989).

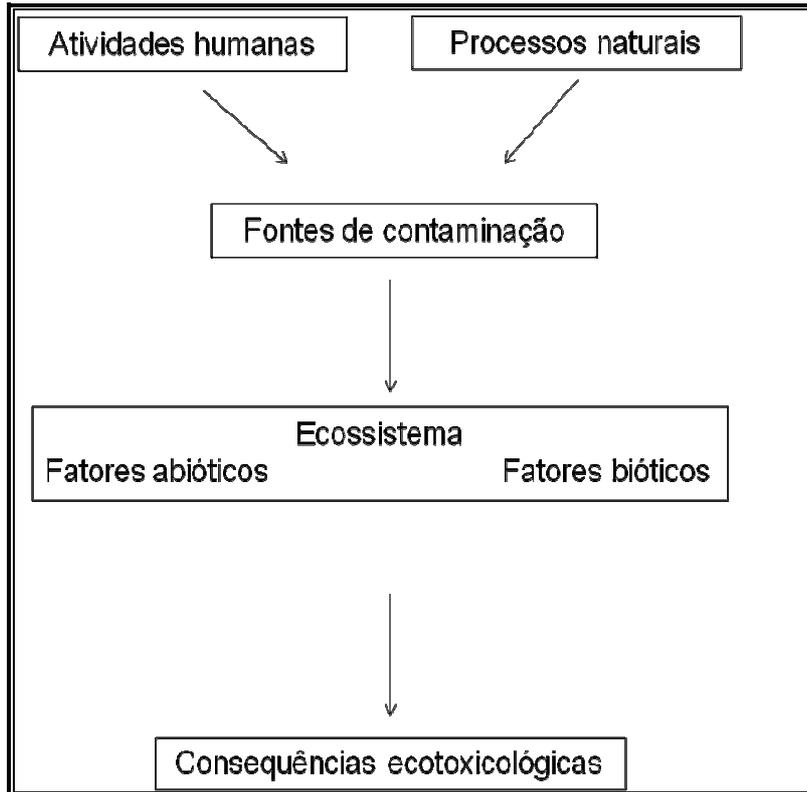


Figura 7: Abordagem ecotoxicológica. *Fonte:* Boudou & Ribeyre, 1989.

A avaliação ambiental da degradação ocasionada a ambientes terrestres e aquáticos, cujas variações físicas são acentuadas, exige que fatores mais estáveis, por exemplo, fatores biológicos, sejam levados em consideração como indicadores da avaliação. Esses fatores, derivados da observação de espécies bioindicadoras, podem indicar melhor se ocorreu um desequilíbrio do ambiente em questão (CETESB,2005).

1.2.1. Ensaio de Toxicidade

A avaliação da qualidade de um determinado ambiente através somente de análises químicas não evidencia o impacto ambiental total causado pelos poluentes, pois somente qualificam e quantificam certas substâncias, no entanto, não fornecem informações sobre os efeitos nas comunidades existentes sobre o funcionamento do ecossistema exposto ao poluente, sobre as possíveis interações das substâncias, bem como a biodisponibilidade das mesmas (Harmel, 2004; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Nesse sentido, a aplicação de ensaios de toxicidade apresenta-se como uma importante ferramenta para a observação dos efeitos dos contaminantes

sobre os compartimentos bióticos, aumentando sua importância no que tange a complexidade das substâncias e suas interações no meio ambiente (Harmel, 2004; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Uma forma normalmente utilizada para avaliar se um ou mais agentes contaminantes podem causar efeitos tóxicos sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres é definir a concentração dos mesmos nos compartimentos ambientais e comparar com os limites permitidos ou valores orientadores de qualidade do meio (CETESB, 2005).

Ensaio de toxicidade são, na maioria dos casos, testes laboratoriais, realizados em condições experimentais específicas e controladas, permitindo a avaliação ambiental por diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, amostras ambientais (água, solo e sedimentos), medicamentos e produtos químicos em geral. Desse modo, detectam a capacidade de um agente tóxico ou uma mistura de substâncias causarem efeitos deletérios em organismos vivos permitindo, assim, em que concentração as substâncias são nocivas e como se manifestam os efeitos (níveis celular até ecossistêmico) (CONAMA, 2011; Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, que devido às suas características intrínsecas como, por exemplo, pequeno limite de tolerância a determinadas substâncias químicas apresentando algum tipo de alteração quando expostas a determinados poluentes, em uma determinada concentração, por um determinado período de tempo (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Para análises de toxicidade são utilizados organismos representativos e sensíveis a compostos estranhos ao seu meio, seguindo o raciocínio de que se estes forem afetados muito provavelmente outros organismos também o serão. Os organismos utilizados são representativos a biota, preferencialmente que sejam de fácil aplicação aos ensaios. Muitas vezes são selecionados mais de um organismo, abrangendo mais posições dentro da cadeia trófica (Harmel, 2004).

Estes ensaios apresentam uma série de normas e procedimentos que permitem definir limites permissíveis de toxicidade aceitáveis que sirvam para auxiliar as empresas e entidades reguladoras para tomada de decisão. Diversos órgãos de proteção ambiental, como a *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos (USEPA), *Environment Canada*, e de padronização, como

*Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), American Society for Testing and Materials (ASTM), Association of Analytical Communities (AOAC), Deutsches Institut für Normung (DIN) e International Organization for Standardization (ISO) estabelecem as normas e os procedimentos a serem seguidos. No Brasil, os protocolos de ensaios de toxicidade são desenvolvidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (Costa *et al.*, 2008).*

1.2.1.1. Ensaio de Toxicidade Aguda

Os Ensaio de toxicidade aguda são utilizados para avaliar a resposta dos organismos, quando exposto a agentes tóxicos, em um intervalo de tempo curto, durante o qual observam-se efeitos como letalidade ou outras manifestações que a antecedem, tais como, por exemplo, imobilidade. O objetivo destes testes é via-de-regra, definir a Concentração Letal Média (CL_{50}) ou a Concentração Efetiva Média (CE_{50}), isto é, a concentração do contaminante que cause 50% de efeito deletério nos organismos, imobilidade ou mortalidade, em um determinado tempo de exposição. A Tabela 8 apresenta algumas definições utilizadas em ensaios de toxicidade.

Os ensaios de toxicidade aguda também podem ser aplicados para avaliar a sensibilidade de organismos para um determinado agente tóxico, no entanto, normalmente os poluentes, no ambiente, podem sofrer uma série de transformações (biodegradação, fotodegradação, adsorção, diluição, etc.), estando disponíveis, geralmente, em concentrações crônicas (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Tabela 8: Definições utilizadas em ensaios de toxicidade.

Parâmetro	Definição
CL ₅₀	Concentração Letal Média: é a concentração da amostra que causa mortalidade a 50% dos organismos, em determinado período de exposição, nas condições de ensaio.
CE ₅₀	Concentração Efetiva Média: é a concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos, em determinado período de exposição, nas condições de ensaio.
DL ₅₀	Dose Letal Média: dose da amostra que causa mortalidade a 50% dos organismos, em determinado período de exposição, nas condições de ensaio.
CENO	Concentração de Efeito Não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em um determinado tempo de exposição, nas condições do ensaio.
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração do agente tóxico que cause efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos, em um determinado tempo de exposição, nas condições do ensaio.
FT	Fator de Toxicidade: número adimensional que expressa a menor diluição da amostra que não cause efeito agudo aos organismos, em um determinado tempo de exposição, nas condições do ensaio.

Fonte: Adaptado de Alves, 2010; CONAMA, 2011; Costa *et al.*, 2008.

Nesse sentido, Magalhães & Ferrão-Filho (2008) apontam alguns obstáculos para os ensaios agudos, tais como:

- ✓ Por serem testes curtos , não é possível avaliar como a mortalidade aumentará após esse tempo de exposição;

- ✓ Apenas um estado de vida é testado. Nos estágios juvenil, larvar e ovos, a sensibilidade das espécies é geralmente maior do que no estágio adulto;
- ✓ Certas concentrações do agente tóxico no ambiente podem causar efeitos subletais que não causam a morte imediata dos organismos, no entanto, impedem que o organismo realize algumas de suas funções vitais, abalando o ecossistema. Dentre esses efeitos estão: inibição da reprodução, dificuldade na eclosão de ovos, deformações ou perda de membros, alterações morfológicas (cor, aumento da densidade celular, diminuição da biomassa), alterações celulares (carcinomas, micronúcleos), dentre outros.

1.2.1.2. Ensaio de Toxicidade Crônica

Os ensaios de toxicidade crônica avaliam as respostas dos organismos expostos por um período de tempo longo, que abrange parte ou todo o ciclo de vida, do organismo-teste. Geralmente, são efeitos subletais que permitem a sobrevivência do organismo por um período de tempo, porém, afeta suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (Newman, 2010; Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Esses efeitos ocorrem em concentrações ou doses abaixo do que produziria morte direta. Quase sempre são efeitos adversos, ou supostamente adversos, que diminuem a aptidão de um indivíduo (Newman, 2010). Os resultados obtidos em ensaios de toxicidade crônica são geralmente obtidos em CENO e CEO (Tabela 8). A exposição crônica ocorre por dois motivos de acordo com Azevedo & Chasin (2003):

- ✓ Acúmulo da substância tóxica no organismo, que ocorre, pois a quantidade eliminada é menor que a absorvida, desse modo, aumentando sua concentração no organismo progressivamente até níveis que causem efeitos adversos;
- ✓ Efeitos ocasionados por exposições repetidas, sem acúmulo da substância tóxica no organismo.

Para monitoramento em longo prazo, os organismos-teste entram em contato com a amostra do poluente em período de tempo constante, mas com concentrações menores em cada dosagem. Nos ensaios de toxicidade crônica é possível avaliar o comportamento dos organismos em diferentes ciclos de vida. Por

exemplo, no teste de reprodução do oligoqueto *Eisenia foetida* ou *Eisenia andrei* é possível avaliar o comportamento dos oligoquetos expostos aos poluentes tóxicos desde a fecundação até a eclosão e desenvolvimento dos ovos (Andrade, 2009). Já na observação do crescimento (biomassa), pode-se avaliar se a exposição ao contaminante esta dificultando o organismo de se alimentar ou se desenvolver. O crescimento é frequentemente escolhido como variável para medir efeitos subletais (Newman, 2010). Em testes de toxicidade crônica podem ser realizadas análises, tais como bioacumulação, hematológicas, histológicas, parasitológicas e de genotoxicidade (Andrade, 2009).

A alteração da atividade enzimática também pode ser um bioindicador de interesse. Todos os organismos possuem no seu sistema imunológico células antioxidantes compostas por enzimas, tais como Catalase, Superóxido Dismutase, dentre outras. A modificação na atividade dessas enzimas pode ser um indicativo de exposição a longo-prazo (Chen *et al.*, 2011)

1.2.1.3. Ensaio de genotoxicidade

Devido às características carcinogênicas e mutagênicas de certas substâncias, além dos testes de mortalidade e reprodução, estão sendo utilizados testes celulares para uma avaliação mais abrangente da exposição dos organismos aos contaminantes. Em nível celular, diminuição e danos em células imunológicas, aparecimento de micronúcleos, danos no DNA são algumas observações possíveis para a detecção da mutagenicidade de algumas substâncias.

As minhocas, por exemplo, possuem células imunológicas conhecidas como coleomócitos que são importantes células do sistema imunológico das minhocas, encontrados principalmente no seu trato intestinal, se mostrando um indicador sensível à exposição em ambientes contaminados (Bonnard *et al.*, 2009; Manerikar *et al.*, 2008; Di Marzio *et al.*, 2005).

Outro bioindicador de mutagenicidade é o micronúcleo que são pequenos núcleos formados por cromossomos que não se ligaram ao fuso acromático por ocasião da divisão celular. Tal fenômeno pode ser por decorrência de quebras ou falhas na formação dos fusos acromáticos, eventualmente relacionadas à presença de substâncias tóxicas (Leet & Richards, 2009; Feng *et al.*, 2004).

Danos no DNA causados pela exposição às substâncias mutagênicas podem ser observados através do ensaio cometa. O ensaio cometa é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras de cadeia (Di Paolo, 2006). O material genético é submetido à eletroforese e, a partir do núcleo, fragmentos do DNA quebrado migram no sentido do ânodo. Após a coloração, as células são observadas em microscópio, e o DNA danificado apresenta-se similar a forma de um cometa (Di Paolo, 2006; Cotelle & Féraud, 1999). Esse tipo de teste tem sido utilizado para avaliar os danos causados ao DNA das minhocas expostas a diferentes contaminantes (Lourenco et al., 2011; Bigorgne et al., 2010; Manerikar et al., 2008).

1.2.2. Escolha do organismo-teste

Os organismos de pesquisa da Ecotoxicologia fazem parte de ecossistemas e vão desde microrganismos até animais que ocupam o topo da cadeia alimentar. A Ecotoxicologia compreende, ainda, a interação entre os fatores bióticos e abióticos sobre a resposta dos poluentes. Os fatores bióticos incluem os organismos vivos envolvidos e suas características intrínsecas, tais como: tamanho, fase de desenvolvimento, sazonalidade, estado nutricional, entre outras. Já os fatores abióticos correspondem às características do ambiente (ar, água, solo/ sedimento), tais como: temperatura, pH e oxigenação (Oga, 2008).

Os ensaios de toxicidade em laboratórios devem ser conduzidos com espécies representativas do ambiente, podendo ser espécies nativas ou não. De um modo geral, esses ensaios são realizados com espécies já padronizadas em normas, o que facilita a comparação de dados (CETESB, 1992). Bactérias, microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas e peixes destacam-se entre os grupos de organismos mais utilizados em ensaios laboratoriais, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Na Tabela 9 estão descritos os principais ensaios e organismos-teste indicados para as matrizes ambientais.

A sensibilidade dos organismos utilizados em biomonitoramento pode ser desde o nível bioquímico até o nível comportamental. Tal sensibilidade, não depende somente do fator a ser monitorado, mas também de fatores inerentes ao indivíduo, tais como nível nutricional, idade do organismo, sexo, fase de

desenvolvimento, características genéticas, competição entre indivíduos ou espécies; além de fatores ambientais como luminosidade e temperatura (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Para a escolha do organismo-teste geralmente usam-se os seguintes critérios de seleção de espécies: espécie que seja representativa do ambiente e, se possível, autóctone; abundância e disponibilidade da espécie; conhecimento de sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; cosmopolitismo da espécie; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante a várias substâncias; importância comercial; e facilidade de cultivo e manutenção em laboratório (Martins, 2010).

No entanto, não existe uma única espécie de organismo que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Por esse motivo, recomenda-se empregar no mínimo três espécies que representem diferentes níveis na cadeia (Oga, 2008; Cassaret & Douls, 2008; Costa *et al.*, 2008; Martins, 2010).

Tabela 9: Organismos-teste e ensaios indicados para matrizes ambientais.

Matriz	Ensaio indicado	Organismo teste	Referência
Solo	Avaliação da toxicidade do solo	Minhocas (<i>Eisenia foetida</i> ou <i>Eisenia Andrei</i>); Plantas (teste de germinação)	Correia & Moreira (2010); Ferreira (2010); Andrade (2009); Millioli (2007); Ramos (2007); Molina-Barahoma <i>et al.</i> (2005)
	Avaliação da toxicidade do lixiviado do solo	Algas (<i>Scenedesmus subspicatus</i> ; <i>Selenastrum capricornutum</i>); Microcrustáceos (<i>Daphnia magna</i>); Bactérias (<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>)	Koci <i>et al.</i> (2010); Andrade (2009); Eom <i>et al.</i> (2007); Hirmann <i>et al.</i> (2007); Loureiro <i>et al.</i> (2005); Molina-Barahoma <i>et al.</i> (2005); Rila <i>et al.</i> (2003)
Água (rio, represa e lago)	Avaliação da qualidade ou da toxicidade da água	Peixes (<i>Danio rerio</i>); Algas (<i>Scenedesmus subspicatus</i> ; <i>Selenastrum capricornutum</i>); Microcrustáceos (<i>Daphnia magna</i>); Bactérias (<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>)	Neto (2009); Costa <i>et al.</i> (2008); Magalhães & Ferrão-Filho (2008); Bresola (2007); Harmel (2004)
Água marinha (mar e estuário)	Avaliação da qualidade ou da toxicidade da água	Microcrustáceos (<i>Artemia salina</i>); Ouriço do Mar (<i>Lytechinus variegatus</i>); Bactérias (<i>Vibrio fischeri</i>)	Platte <i>et al.</i> (2002); Resgalla & Laitano (2002).
Sedimentos	Avaliação da toxicidade do sedimento	Microcrustáceos (<i>Chironomus xanthus</i> ; <i>Daphnia similis</i>); Copépodos (<i>Arcatia tonsa</i>); Anfípoda (<i>Hyaella azteca</i>); Ouriço do mar (<i>Lytechinus variegatus</i>)	Cavalcanti (2010); Cordeiro (2008); Araujo (2005); Passarelli <i>et al.</i> (2009)
Efluentes líquidos	Estabelecimento de qualidade para lançamento de efluentes em corpos hídricos	Peixes (<i>Danio rerio</i>); Algas (<i>Scenedesmus subspicatus</i> ; <i>Selenastrum capricornutum</i>); Microcrustáceos (<i>Daphnia magna</i>); Bactérias (<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>)	Alves (2011); Hamada (2008); Hobold (2007); Reginatto (1998)

1.2.3. Ecotoxicologia Terrestre

A ecotoxicologia terrestre estuda o comportamento de substâncias químicas no ambiente terrestre, sendo observada a caracterização desses compostos químicos, pois seu comportamento está fortemente ligado com a biota. Nesse contexto, os ensaios de ecotoxicidade surgiram para avaliar os efeitos na biota decorrentes da exposição aos agentes químicos no ecossistema terrestre, avaliando a capacidade de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação das substâncias químicas (Cassaret & Douls, 2008).

Muitos estudos de ecotoxicidade têm sido realizados com organismos do solo, dentre elas plantas e invertebrados (minhocas, collembola) têm sido selecionados, pois são considerados organismos representativos e de grande interesse para essa matriz (Eom et al., 2007).

Distúrbios causados por poluentes no solo resultam em mudanças qualitativas e quantitativas na fauna, afetando o funcionamento do solo. Para ser considerado um bom indicador o organismo deve apresentar requisitos, tais como: ser importante para o funcionamento do ecossistema do solo; ser amplamente distribuído, comum e fácil para uma amostragem; ser possível mensurar a contaminação (concentração do contaminante nos tecidos, distúrbios nas características biológicas como reprodução e crescimento e ter resistência genética); ser passível de reprodução das respostas apresentadas quando for necessária a exposição ao poluente em diferentes sítios (Cortet et al., 1999).

As minhocas são importantes componentes da fauna do solo e possuem características que corroboram seu uso como organismo apropriado para avaliação do risco potencial em ambientes contaminados. Além disso, sua importância se confirma, pois são organismos abundantes no ambiente terrestre, estão em contato maior com o solo, pois além de contato dérmico, ingerem o solo tendo um contato em seu aparelho digestivo, tem importância direta na estrutura, fertilidade e qualidade do solo, e constituem fonte de alimentação para demais organismos da fauna, tais como aves, répteis, mamíferos, peixes e micro-organismos (Dittbrenner et al., 2011; Correia & Moreira, 2010; Andrea, 2010; Buch, 2010; Ramos, 2007; Cortet et al., 1999).

1.2.3.1. Utilização da minhoca *Eisenia* sp. em ensaios de toxicidade

Antigamente, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) e *Eisenia andrei* (Bouche, 1972) foram tidas por muito tempo, como uma única espécie devido a terem aparência e requerimentos ecológicos semelhantes, além de estarem frequentemente associadas. Após a realização de testes bioquímicos, foram reveladas que eram duas espécies distintas, além do fato do cruzamento entre ambas não gerarem descendentes férteis (Dominguez; Velando; Ferreiro, 2005).

Embora se assemelhem morfologicamente, as espécies possuem características distintas, sendo possível sua diferenciação: *E. foetida* possui listras evidentes ao longo do corpo e despigmentação na área em volta dos segmentos, conhecida popularmente como “Tigrada”, enquanto que *E. andrei* é uniformemente avermelhada, com listras pouco aparentes, conhecida popularmente como “Vermelha da Califórnia” (Figura 8). As duas espécies também se diferem quanto ao comportamento: *E. foetida* se desloca com maior velocidade à procura de um refúgio quando é retirada do substrato onde se encontra, possivelmente devido a maior aversão à luz (Guimarães, 2006).



Figura 8. *Eisenia andrei* conhecida popularmente como “Vermelha da Califórnia”.

O ciclo de vida das duas espécies pode ser dividido em três (3) fases distintas: (1) a fase de casulo, consistindo em um ovo que pode produzir de 1 a 11 indivíduos; (2) a fase jovem, durante a qual o indivíduo cresce fisicamente, porém

não pode produzir casulos e por último; (3) a fase adulta, com clitelo totalmente desenvolvido e com capacidade de produzir casulos. Seu ciclo de vida pode durar entre 51 a 166 dias (Jefferies & Ausdsley, 1988).

Em relação ao substrato para manutenção das espécies, os protocolos OECD (1984; 2004) ISO (1993; 1998; 2008) indicam uma mistura com 50% de esterco animal (bovino ou eqüino) e 50% de turfa. O pH deve ser mantido neutro a ligeiramente ácido, a temperatura mantida entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a umidade verificada para que o substrato não fique seco. As culturas devem ser mantidas com 8 h de luz; 14h de escuridão em intensidade luminosa de 400-800 lux (ISO, 1993; OECD, 1984).

As espécies *E. foetida* e *E. andrei* são indicadas para utilização em ensaios de toxicidade, pois tem reprodução relativamente fácil em laboratório e já foram largamente estudadas. Sua utilização é recomendada pelas agências internacionais de padronização tais como, *American Society for Testing and Materials* (ASTM) (1995), *International Organization for Standardization* (ISO) (1993, 1998), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) (1984, 2004).

Recentemente, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) elaborou um protocolo (NBR 15537:2007 – Ecotoxicologia terrestre – Ecotoxicidade Aguda. Ensaio com minhocas) para a utilização da espécie de acordo com a ISO.

Estudos mostram que as respostas das minhocas aos poluentes do solo podem ser de natureza aguda, tais como mortalidade e morfológicos; ou crônica, tais como inibição da reprodução e diminuição de biomassa (Buch, 2010; Ramos, 2007; Cortet et al., 1999). Estudos mais recentes também demonstram respostas celulares, tais como diminuição de células imunológicas (coleomócitos) e formação de micronúcleos (Bigorgne et al., 2010; Bonnard et al., 2009; Calisi et al., 2009; Di Marzio et al., 2005).

1.2.3.2. Ensaio de toxicidade na avaliação de solos biorremediados

A técnica de biorremediação acelera o processo natural de biodegradação dos poluentes orgânicos podendo ser otimizada pela aeração, adição de nutrientes, controle de pH e da temperatura, além da estimulação de microrganismos autóctones (bioestímulo) ou a introdução de microrganismos que possuem a

capacidade de degradação específica (bioaumento) (Hubálek *et al.*, 2007; Ceccanti *et al.*, 2006).

Essa técnica tem mostrado grande eficiência na remoção de poluentes orgânicos do solo, incluindo hidrocarbonetos do petróleo, que constituem um grande risco ecológico (Silva, 2010; Cianella, 2010; Aguiar, 2006; Dorn *et al.*, 1998). No entanto, estudos relatam que uma fração residual do contaminante permanece mesmo quando ocorre uma biodegradação ótima. Esse fato sugere que nem todos os componentes da mistura têm o mesmo destino durante a degradação (Nocentini *et al.*, 2000).

Nesse sentido, a observação da eficácia da remediação, é via-de-regra, baseado no decaimento de compostos alvo. No entanto, a redução da contaminação não é sempre acompanhada da redução da toxicidade do solo. A degradação incompleta e a formação de metabólitos intermediários podem contribuir para o aumento da toxicidade do solo. Tal monitoramento não informa se juntamente com o decaimento dos compostos-alvo, a toxicidade também é reduzida, se permanece inalterada ou se aumenta. As três possibilidades existem porque a degradação incompleta de um composto orgânico pode resultar em produtos intermediários de toxicidade inferior, igual ou superior ao composto original. Nesse contexto, surgem os ensaios ecotoxicológicos a serem aplicados antes e após a remediação. Estes ensaios resultam em uma resposta da toxicidade dos contaminantes para organismos vivos (bioindicadores), algo que as análises químicas não podem fornecer. Estudos demonstram que vários subprodutos gerados pela atividade microbiana durante o processo de biorremediação podem ser mais tóxicos do que os contaminantes iniciais (Plaza *et al.*, 2005; Sissino *et al.*, 2006; Saterbak *et al.*, 2000).

Meier *et al.* (1997), usaram as minhocas para avaliar solos contaminados com Bifenilas Policloradas (PCBs) tratados em escala piloto. Além das minhocas, também foram utilizadas plantas e o anelídeo *Lumbricus terrestris*. Nesse sentido, Busch (2010) objetivou avaliar a sensibilidade das espécies *E. andrei* e *Pontoscolex corethrurus* a solos contaminados com agrotóxicos. Também nesse sentido, Correia & Moreira (2010) utilizaram *E. foetida* em análises no laboratório com o pesticida 2,4-D e glifosato, dois pesticidas muito utilizados na agricultura brasileira.

Saterbak *et al.* (2000) compararam as análises físico-químicas e as ecotoxicológicas antes, durante e após a biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. No estudo foram observadas as respostas agudas

(mortalidade) e crônicas (reprodução). Dorn et al. (1998) utilizaram as minhocas em seu estudo com o objetivo de avaliar solos biorremediados contaminados com óleo cru de diferentes pesos moleculares. Também com o objetivo de avaliar a qualidade do solo após a biorremediação, Hubalek et al. (2006) utilizaram organismos de diferentes níveis tróficos, incluindo *E. foetida* em ensaios ecotoxicológicos.

Schaefer (1998) ressaltou que a maioria dos protocolos e estudos levam em consideração somente as respostas de mortalidade e reprodução. No entanto, a resposta comportamental é de fundamental importância para avaliar a influência do poluente na população de minhocas. Em seu trabalho o autor avalia o comportamento das minhocas em solos contaminados com óleo cru.

Hanna & Weaver (2003), avaliaram a resposta da minhoca *E. foetida* em solo contaminado com óleo. Já Shim & Kim (2001), utilizaram a *E. foetida* para avaliar a remediação e o decaimento dos hidrocarbonetos de petróleo de solo contaminado com diesel. Já Lopes et al. (2010) utilizaram a minhoca *E. foetida* para avaliar a toxicidade de diferentes óleos lubrificantes de combustíveis. Os autores também utilizaram um solo arenoso para a realização dos ensaios.

No intuito de avaliar solo de carvoaria contaminado com HPA, Eom et al. (2007) utilizaram *E. foetida* e outros organismos indicadores em ensaios de toxicidade. Dawson et al. (2007), no mesmo intuito, utilizaram indicadores biológicos, dentre eles *E. foetida*, para avaliar a qualidade de um solo tratado de uma planta de gás desativada.

2. METODOLOGIA

2.1 Experimentos de biorremediação que deram origem ao solo estudado

As amostras de solo biorremediado utilizadas no presente trabalho foram obtidas a partir de um projeto do grupo de pesquisa BioProcess, cujo objetivo foi um estudo de tratabilidade em solo arenoso contaminado com 5% de OLU utilizando duas técnicas de biorremediação: bioestímulo e bioaumento com adição de resíduos sólidos urbanos (RSU) (Silva, 2010). O solo utilizado no estudo de biorremediação foi coletado na Estação Experimental de Seropédica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio), sendo caracterizado como Planossolo Háptico Distrófico Arênico. O OLU utilizado para a contaminação foi proveniente da garagem da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ e a empresa de re-refino da Tasa Lubrificantes Ltda (Silva, 2010). Os RSU foram obtidos junto à Companhia Municipal de Limpeza Urbana – COMLURB, no Rio de Janeiro. Tais resíduos foram caracterizados e tal análise mostrou a presença predominante de vidro e pedra/louça e quantidade significativa de microrganismos (Silva, 2010). Os resíduos foram peneirados em malha de 2mm do mesmo modo que o solo utilizado no estudo. Para avaliar os efeitos das estratégias de bioestímulo e bioaumento com adição de RSU, diferentes tratamentos foram adotados. O solo controle teve somente ajuste do pH.

Foram retiradas amostras de três biorreatores (Tabela 10) com funcionamento há 22 meses. Foram retirados aproximadamente 2 kg de solo de cada reator que foram colocados em sacos plásticos para armazenamento na geladeira do LABIFI.

Tabela 10: Estratégias de biorremediação utilizadas nos reatores.

Reatores	Estratégia	Caracterização
BIOS	Bioestímulo	Solo com ajuste de pH + 5% OLU + ajuste de umidade + aeração
BIOA1	Bioestímulo + Bioaumento	Solo com ajuste de pH + 5% OLU + 10% de RSU maturado por 7 meses + ajuste de umidade + aeração
BIOA2	Bioestímulo + Bioaumento	Solo com ajuste de pH + 5% OLU + 10% de RSU semi-maturado por 2 meses + ajuste de umidade + aeração

Fonte: Silva, 2010.

2.2. Contaminação do solo para os ensaios de toxicidade

A contaminação para os testes específicos de toxicidade foi realizada no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI). O solo controle, sem contaminação coletado no início do estudo de biorremediação foi contaminado na concentração de 5% (semelhante à concentração utilizada no experimento original de biorremediação) (Figura 9), para ser observada a toxicidade da contaminação recente. O solo foi homogeneizado (Figura 10) e deixado em capela durante 15 dias para secagem. Após a secagem, o solo foi peneirado em peneira de malha de 2 mesh e estocado para as análises físicas e químicas e teste de toxicidade, assim como os demais solos (Figura 11).



Figura 9: Contaminação do solo na concentração de 5% de Óleo Lubrificante Usado



Figura 10: Solo arenoso homogeneizado após a contaminação com OLU a 5%.

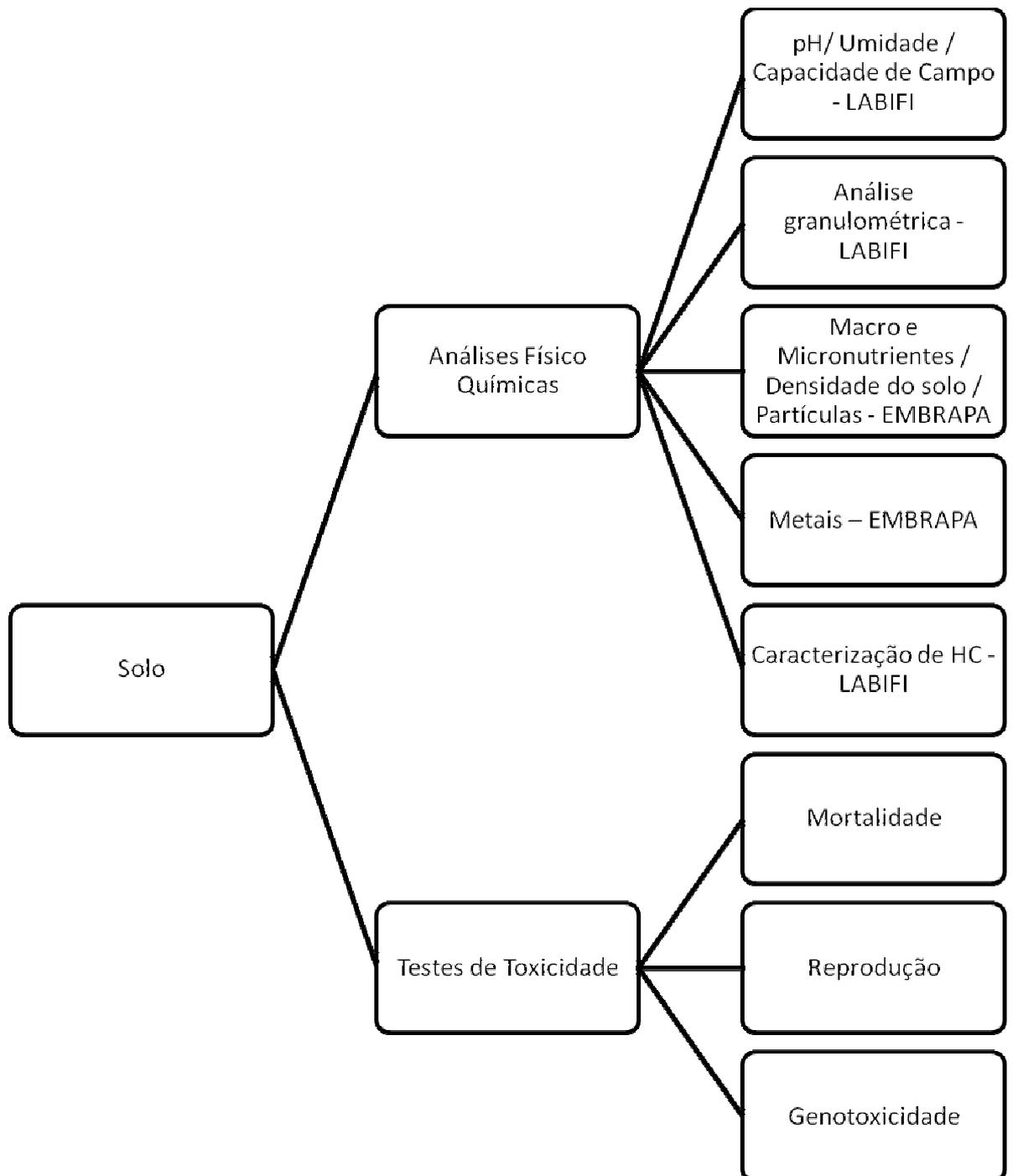


Figura 11: Esquema das análises físicas, químicas e ensaios de toxicidade realizados.

2.3. Caracterização dos solos após as coletas dos reatores

Antes do início dos ensaios de ecotoxicidade, os solos estudados caracterizados quanto às propriedades físicas e químicas mais relevantes para os ensaios de toxicidade, tais como: análise de granulometria, pH, capacidade de campo, umidade, micronutrientes, teor de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, carbono, metais tóxico, hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). A análise de pH, capacidade de campo, umidade, hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram realizadas no LABIFI. As outras análises foram realizadas na EMBRAPA Solos (Figura 11).

2.3.1. pH

O pH foi medido logo após a coleta dos solos nos biorreatores. Para determinação do valor do pH, 10 g de solo foram adicionadas a 25 ml de água destilada em um tubo Falcon de 50 ml. Os tubos Falcon foram depositados em béquers e levados para agitação em *shaker* (Quimis 816M20) por 1 h com rotação de 150 min^{-1} . Após esse período, o sistema foi deixado de repouso por uma (1) hora e o valor do pH do solo determinado no sobrenadante com o pHmetro (Quimis). As análises foram feitas em triplicatas.

2.3.1.1. Correção do pH dos solos para os ensaios de toxicidade

Para a correção do pH das amostras que estavam abaixo da faixa de próxima à neutralidade (entre 6,5 e 7,5) foi utilizado o carbonato de cálcio (CaCO_3) de acordo com a metodologia da Embrapa (1997) de curva de neutralização. Foram pesados 10g da amostra de solo em béquers de 30 ml. Em seguida, foram acrescentadas as seguintes massas de CaCO_3 , com precisão de miligramas: 0 (controle), 50 mg, 100 mg, 150 mg, 300 mg e 600 mg. As amostras foram feitas em triplicatas. Os béquers foram pesados e as massas anotadas. As amostras foram cobertas com filme plástico, para evitar o ressecamento, e deixadas em repouso por 10 dias. Para a verificação do pH e construção da curva, foram preparados os extratos com a

amostra e 25 ml de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. Os valores foram anotados e a curva construída no Microsoft Excel.

2.3.2. Capacidade de Campo

Para análise da capacidade de campo foi utilizado método da proveta (Chagas-Spinelli, 2007; Trindade, 2002). Em uma proveta de 50 ml, de peso conhecido, pesou-se 50 g de solo úmido ($m_{\text{solo úmido}}$), formando uma coluna. Foi adicionada ao solo da proveta água destilada, com um conta-gotas, até que toda a coluna fosse percolada pela água até o fundo, criando uma condição de saturação. O sistema proveta + solo foi pesado ($m_{\text{sistema saturado}}$) e colocado em estufa (marca quimis) a 105°C , por 24h. As amostras foram feitas em triplicatas. Ao término o sistema foi pesado ($m_{\text{solo seco}}$) e a capacidade de campo determinada, após três pesagens consecutivas idênticas, conforme a equação (1) abaixo:

$$\text{Massa}_{\text{(águas retida)}} = m_{\text{saturado}} - m_{\text{solo seco}} \quad (1)$$

$$\text{Capacidade de Campo (\%)} = (M_{\text{(águas retida)}} / m_{\text{solo úmido}}) \times 100$$

2.3.3. Umidade

Para a determinação da umidade foi utilizada metodologia descrita em Ramos (2007). Foram pesados 20g de solo em um béquer de 50 ml. A massa do solo foi obtida e, após zerar a balança, foi obtido o peso total do sistema (solo + béquer). O sistema foi colocado em estufa (marca Quimis) a 105°C , por 24 h. Passado o tempo, a amostra foi retirada da estufa e colocada no dessecador até que esfriasse completamente. Depois de frio, o sistema foi pesado novamente e o percentual de umidade determinado com o auxílio da fórmula (2) abaixo:

$$\% \text{ Umidade} = P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}} / m_{\text{solo úmido}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

P_{inicial} = Peso do sistema antes da estufa;

P_{final} = Peso do sistema depois da estufa;

$m_{\text{solo úmido}}$ = massa de solo úmido.

2.3.4. Extração dos Hidrocarbonetos de Petróleo

Para a extração dos hidrocarbonetos de petróleo foram testadas três metodologias com o intuito de analisar comparativamente vantagens e desvantagens de cada uma quando aplicada a solo arenoso e solo argiloso. As três metodologias de extração comparadas foram Soxhlet, Micro-ondas e ASE.

2.3.4.1. Extração por Soxhlet

A extração via Soxhlet com bateria de sebelin marca Solab foi realizada de acordo com a metodologia US EPA 3540 C. Foram pesados 5g da amostra em um béquer de vidro com o auxílio de uma balança analítica marca Toledo. À amostra pesada, foram adicionados 5 g de sulfato de sódio anidro grau PA marca Vetec, previamente calcinado em forno mufla marca Quimis, a 400 °C por 4h, seguidamente de 2 µl do padrão de recuperação deuterado C₁₂D₅₄ “surrogate” para HPA marca Supelco. A amostra foi transferida para um cartucho de celulose e, por cima do material, foi colocado um pedaço de algodão, previamente descontaminado com diclorometano grau pesticida marca Tédia, para evitar a evaporação do padrão. O cartucho de celulose, com o auxílio de uma pinça previamente descontaminada com diclorometano, foi colocado na coluna de extração do Soxhlet. Em seguida, o mesmo foi acoplado na saída do condensador do sohxlet. Foram adicionados 180 ml de diclorometano e 6 pérolas de vidro, previamente descontaminadas com o mesmo solvente. O extrator foi acoplado ao balão de destilação, e esse à manta de aquecimento com temperatura de 70 °C (Figura 12). O sistema foi ligado e a extração foi conduzida por 16 h. O balão de fundo chato foi levado a um evaporador rotativo, marca Tecnal, em temperatura de 35°C e 70 rpm de agitação, para que o solvente fosse evaporado. O extrato restante no fundo do balão foi ressuspendido e transferido para um balão volumétrico de 10 ml, previamente descontaminado com diclorometano, o qual foi revestido com papel alumínio e vedado na parte superior com parafilme e estocado sob refrigeração até a análise cromatográfica.

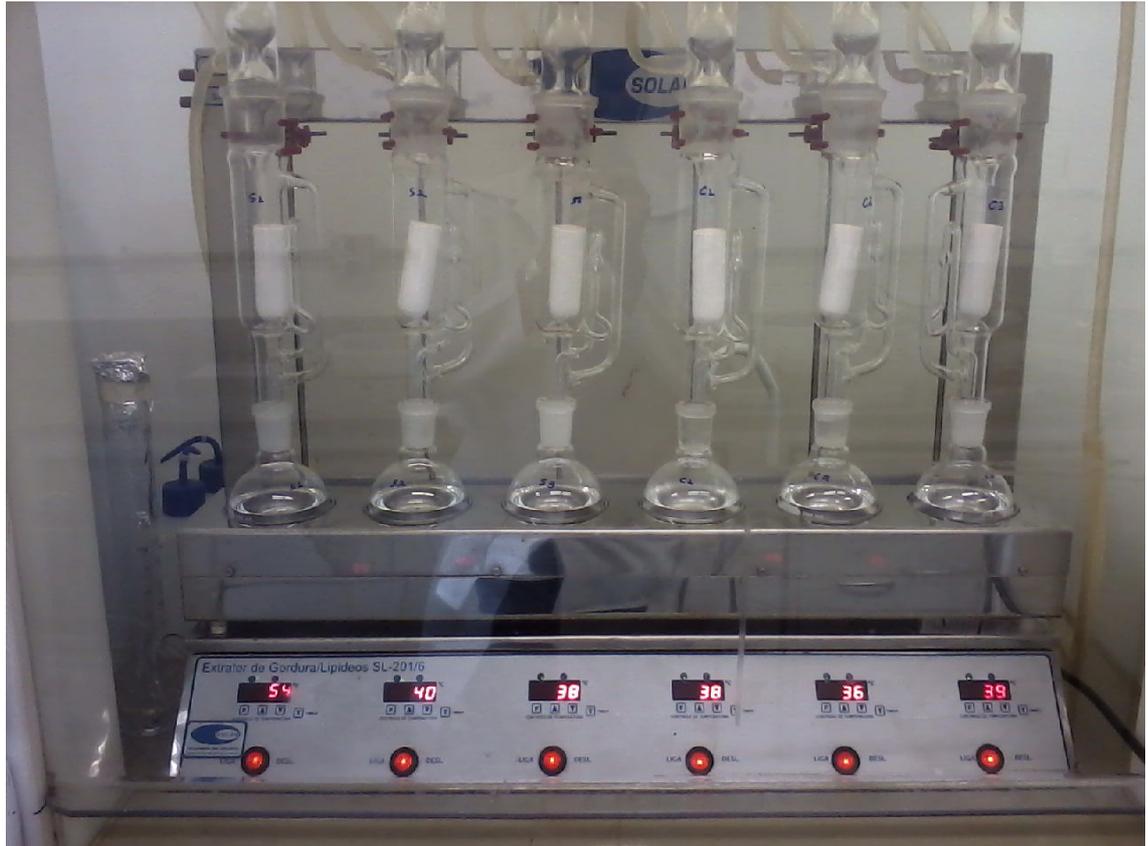


Figura 12: Soxhlet utilizado na extração baseada no método US EPA 3540 C.

2.3.4.2. Extração por Micro-ondas

O equipamento de micro-ondas utilizado foi o MARS da CEM Corporation (Figura 13). A extração ocorreu de acordo com a metodologia 3535 da USEPA. Inicialmente, foi preparado o branco, composto por 5g de pó de quartzo marca Sigma-Aldrich. Foram pesados 5g da amostra em um béquer de vidro. Foram adicionados às amostras pesadas, 5g de sulfato de sódio anidro marca Vetec, misturados em seguida com uma espátula previamente limpa com solvente diclorometano. Aos “vials” do aparelho de micro-ondas foram adicionadas as amostras e a elas foram adicionados 2 μl do padrão de recuperação deuterado $\text{C}_{12}\text{D}_{54}$ “surrogate” para HPA, marca Supelco, inclusive no branco. Em cada “vial” foram vertidos 25 ml de diclorometano e os mesmos colocados em ordem no carrossel localizado dentro da cavidade do forno de micro-ondas. As condições da extração estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11: Condições da extração no Micro-ondas com base no método 3535 da USEPA.

Temperatura (°C)	100-115
Pressão (psi)	50-150
Tempo de aquecimento (min)	10-20
Resfriamento	Temperatura ambiente
Filtração/Lavagem	Mesmo solvente utilizado na extração



Figura 13: Extração realizada por micro-ondas.

Após a extração e resfriamento dos “vials”, foi realizada a filtração do extrato. Para tal, foi acoplado um sistema de filtração (funil analítico + papel de filtro) a um balão de fundo chato. Agitou-se o “vial”, ainda fechado, para uma boa homogeneização da mistura, em seguida, verteu-se o extrato ao sistema de filtração. Para facilitar a transferência, foi rinsado o “vial” com diclorometano, com um auxílio de uma pipeta pasteur de vidro, previamente descontaminada com DCM. O extrato foi filtrado somente uma vez e o balão de fundo chato foi levado a um evaporador rotativo marca Tecnal, em temperatura de 35°C e 70 rpm de agitação, para que

fosse evaporado o solvente. O extrato foi avolumado a 10 ml no balão volumétrico, o qual foi revestido com papel alumínio e vedado na parte superior com parafilme. Os balões foram acondicionados sob refrigeração para posterior análise cromatográfica.

2.3.4.3. Extração por Solvente Acelerada (ASE)

O equipamento utilizado foi o modelo 350 da Dionex (Figura 14). A extração foi realizada de acordo com a metodologia descrita por 3445 da USEPA. Foram pesados 5g da amostra de solo em um bquer de vidro. Foram adicionadas às amostras pesadas, 5g de sulfato de sódio anidro marca vetec e misturados com uma espátula previamente limpa com solvente diclorometano. As peças do aparelho foram rinsadas com diclorometano e montadas com a membrana de filtração, marca Dionex. Às amostras foram acrescentados 2 µl do padrão de recuperação deuterado C₁₂D₅₄ “surrogate” para HPA, marca Supelco, e as amostras foram adicionadas as pecas e as mesmas foram colocadas em suas posições no aparelho e proseguiu a extração de acordo com as condições descritas na Tabela 12.

Tabela 12: Condições da extração no ASE Dionex.

Temperatura (°C)	140
Pressão (psi)	1500
Tempo de aquecimento (min)	7
Tempo estático (min)	5
Volume de descarga (%)	60
Tempo de purga (seg)	60

Como solvente, foram utilizados na extração 17 ml de uma mistura de acetona: diclorometano 1:1. O extrato foi avolumado a 10 ml no balão volumétrico, o qual foi revestido com papel alumínio e vedado na parte superior com parafilme. Os balões foram acondicionados sob refrigeração para posterior análise cromatográfica.



Figura 14: Extração por solvente acelerada (ASE).

2.3.5. Quantificação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP)

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram analisados por GC/MS utilizando como referência o método 8015 da USEPA. As análises foram realizadas em cromatógrafo da marca Agilent, modelo 7890 A (Figura 15) acoplado ao espectômetro de massas de mesma marca. A tabela 13 mostra as informações da análise de HTP no GC/MS. A quantificação das amostras foi realizada através de padronização externa, tendo como referência a metodologia da USEPA 8000. Foi feita uma curva de calibração com 6 pontos abrangendo a faixa de 0,10 a 50 ppm com o padrão HTP Mix 1, marca Supelco. O software utilizado para a quantificação foi fornecido pelo fabricante e é denominado Chemstation.

Tabela 13: Características e condições de análise de HTP do sistema GC/MS.

Cromatógrafo Gasoso com espectrômetro de massa (GC/MS) HTP				
Modelo	7890A Agilent acoplado a Espectrômetro de Massas 5975C Triplo Axis Detector			
Gás de arraste	Hélio (He) 5.0			
Coluna	DB-1MS(Agilent Technologies) com diâmetro interno de 0,25mm, comprimento de 30m e espessura de fase de 0,25 μ m			
Programação de temperatura	Parâmetros	Taxa ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
	T _{injetor}	-	290	-
	T _{detector} (FID)	-	310	-
	T _{coluna}	-	60	-
		15	310	14
Tempo de corrida	30,7 minutos			
Pressão na coluna	15,381psi			
Vazão do gás de arraste	1,31mL. min ⁻¹			
Volume de Injeção	2 μ L			
Modo de Injeção	Splitless			

2.3.6. Quantificação dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram analisados por GC/MS utilizando como referência o método 8015 da USEPA. As análises foram realizadas em cromatógrafo da marca Agilent, modelo 7890 A (Figura 15) acoplado ao espectrômetro de massas de mesma marca, modelo 5975 C. A tabela 14 mostra as informações da análise de HPA no GC/MS. A quantificação foi realizada por padronização interna para o HPA utilizando o padrão HPA Mix 3, contendo os 16 HPA, o padrão de deuterados Semivolatile Internal Standard Mix e o padrão de recuperação Base Neutral Surrogate Mix 1, todos da marca Supelco. O software utilizado para a quantificação (Chemstation) foi fornecido pelo fabricante.



Figura 15: Cromatógrafo GC/MS Agilent7890A.

Tabela 14: Características e condições de análise de HPA do sistema GC/MS.

Cromatógrafo Gasoso com espectrômetro de massa (GC/MS) HPA				
Modelo	7890A Agilent acoplado a Espectrômetro de Massas 5975C Triplo Axis Detector			
Gás de arraste	Hélio (He) 5.0			
Coluna	HP-5MS (Agilent Technologies) com diâmetro interno de 0,25mm, comprimento de 30m e espessura de fase de 0,25 μ m			
Programação de temperatura	Parâmetros	Taxa ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
	T _{injetor}	-	290	-
	T _{detector}	-	230	-
	T _{coluna}	-	50	1
		40	130	2
		15	320	5.3
Tempo de corrida	23 minutos			
Pressão na coluna	8.606 psi			
Vazão do gás de arraste	1,08 mL. min ⁻¹			
Volume de Injeção	1 μ L			
Modo de Injeção	Splitless			

2.4. Ensaio de Ecotoxicidade

Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados no Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) localizado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) na cidade do Rio de Janeiro. Foram utilizadas as seguintes normas:

- ✓ ISO 11268-1: Soil Quality – Effects of Pollutants on Earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate (ISO, 1993);
- ✓ ISO 11268-2: Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction (ISO, 1998);
- ✓ OECD - Guideline for testing of chemicals nº 207: Earthworm acute toxicity test (OECD, 1984);
- ✓ OECD - Guideline for testing of chemicals nº 222: Earthworm reproduction test (OECD, 2004) com algumas modificações.

Para realização dos ensaios foram utilizadas minhocas adultas da espécie *Eisenia andrei*, obtidas de cultura aclimatada nas condições especificadas na norma. As minhocas são proveniente do Minhocário *Arborem* na cidade do Rio de Janeiro. Para avaliar a qualidade da cultura, é realizado simultaneamente aos ensaios de ecotoxicidade, um teste de sensibilidade com uma substância de referência no papel de filtro.

2.4.1. Cultura de minhocas

Na cultura as minhocas são separadas por idade – ovos; jovens (até 150 mg); sub-adultas (entre 150 mg e 300 mg) e; adultas (acima de 300 mg) – e acondicionadas em bandejas plásticas contendo esterco bovino. As minhocas foram depositadas na superfície da bandeja e deixada para escavar o esterco. As culturas foram mantidas em sala com temperatura controlada entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH próximo de 7, umidade entre 40-60% e iluminação constante.

2.4.2. Ensaio de sensibilidade

Para avaliar a sensibilidade das minhocas foi feito o ensaio de sensibilidade com a substância de referência Cloroacetamida, considerada um controle positivo.

Foi utilizado o teste no papel de filtro que consiste em contaminar o papel de filtro com diferentes concentrações de cloroacetamida, a saber: 0,6; 0,3; 0,15; 0,12 0,10; 0,06; e 0 mg ml⁻¹. O papel de filtro foi cortado de modo que envolvesse todo o béquer de 50 ml e o mesmo foi contaminado com as concentrações descritas acima. Após o preparo dos recipientes, foi adicionado um organismo por béquer, sendo, ao final, dez réplicas para cada concentração. Os recipientes foram fechados com papel alumínio que foi perfurado com a agulha para favorecer a oxigenação. Os recipientes foram mantidos no escuro e, após 24 h, foram contabilizados os organismos vivos e mortos.

2.4.3. Desenho experimental

Para o ensaio de letalidade, o solo foi preparado em lotes de 600g, quantidade necessária para as réplicas. As minhocas foram previamente coletadas nas caixas de cultura, lavadas e pesadas para confirmar seu peso como adultas (entre 300 mg e 600 mg). Para cada réplica foram utilizadas 10 minhocas adultas (Figura 17). Após a introdução dos indivíduos foram colocados oito gramas de esterco bovino para alimentação das minhocas. Cada béquer foi coberto com plástico filme e foram feitos furos com agulha permitindo a aeração durante o experimento. A umidade do solo foi padronizada em 50% da capacidade de campo e era corrigida semanalmente pelo peso do béquer. Os béquers foram dispostos aleatoriamente em uma estante com iluminação contínua de 450 lux e ciclo claro/escuro de 16h:8h além de temperatura controlada de 22±2°C (Figura 16).



Figura 16: Disposição dos béquers com solo em estante para realização dos ensaios de toxicidade.

O ensaio teve duração de dois meses e aos 14, 28, 42 e 56 dias, as minhocas eram retiradas dos béquers, lavadas, contadas, pesadas e ocorrências de alterações morfológicas eram verificadas. Para o ensaio de reprodução foram observados e contados ovos e juvenis. Após a verificação as minhocas vivas, ovos e juvenis retornavam para os béquers e eram adicionados oito gramas de esterco bovino como fonte de alimento.

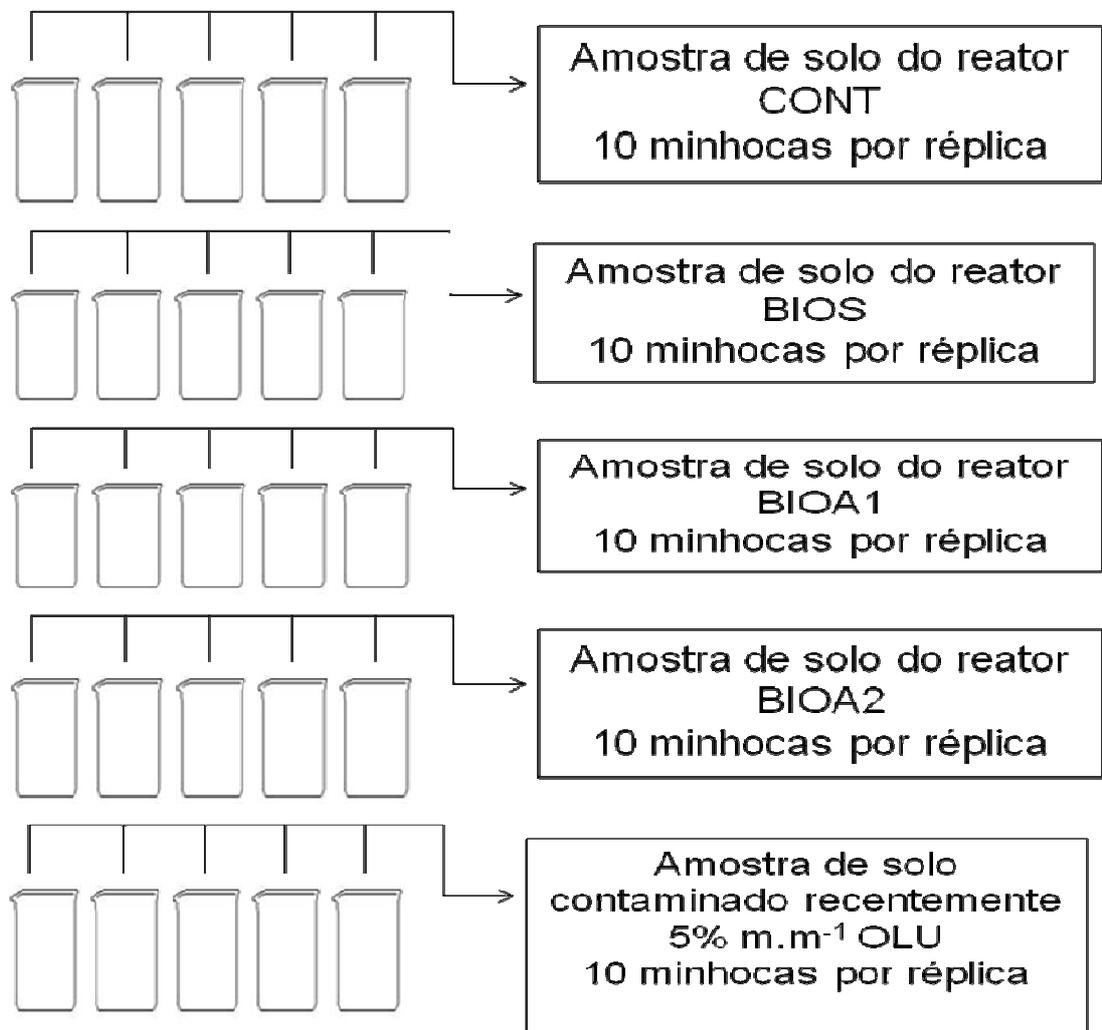


Figura 17: Descrição esquemática da montagem do experimento.

2.4.4. Extração, contagem e viabilidade celular de anelídeos expostos

Nas mesmas condições descritas para os ensaios de mortalidade e reprodução, foram preparadas duas réplicas contendo 10 minhocas cada. No mesmo tempo mencionado, eram retiradas duas minhocas aleatoriamente das duas réplicas de cada tratamento. Para a coleta de coleomócitos por extrusão foi utilizada a metodologia descrita por Eyambe *et al.* (1991).

Tabela 15: Reagentes e concentrações necessários para solução de extrusão.

Reagentes	Volume da solução (250 ml)	Concentração final
Etanol	12 ml (etanol 100%)	5%
Solução salina	2,12 g	95%
EDTA	625 mg	2,5 mg/ml
*GGE	2,5 g	10 mg/ml

*Guaiacol Glicerol Éter Fonte: Eyambe *et al.* (1991).

Cada minhoca foi transferida para tubos de vidro no qual foram adicionados 200 µL de solução de extrusão (Tabela 15) reagindo por três min. Após o período, foi adicionada ao tubo a 800 µl da solução tampão *Lumbricus Balanced Salt Solution* (LBSS) (Tabela 16). O material foi deixado em repouso para sedimentação por 20 minutos. Após a sedimentação, a minhoca era retirada do tubo e a suspensão foi agitada em vórtex (marca quimis). Em um tubo eppendorf 30 µL da suspensão celular foi misturada com 30 µL da solução corante Trypan Blue Stain (0,4%) marca sigma. Em seguida a homogeneização, 10 µL da suspensão celular corada foram transferidos para a câmara de Neubauer (marca New Optik) para a contagem da densidade celular. Todo o procedimento ocorreu com os reagentes e amostras em contato direto com gelo.

Tabela 16: Reagentes para a solução de tampão *Lumbricus Balanced Salt Solution* (LBSS).

Reagentes	Volume da solução (1L)	Concentração final (mM)
NaCl	4,18 g	71,5
KCl	0,35 g	4,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,27 g	1,1
KH ₂ PO ₄	0,054 g	0,4
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,08 g	0,3
NaHCO ₃	0,353 g	4,2

Fonte: Eyambe *et al.* (1991).

Para a contagem em câmara de Neubauer, a mesma deve ser observada em microscópio óptico utilizando objetiva de 40x. Devem ser contadas as células do quadrante central (E) seguindo o sentido da seta branca na Figura 18.

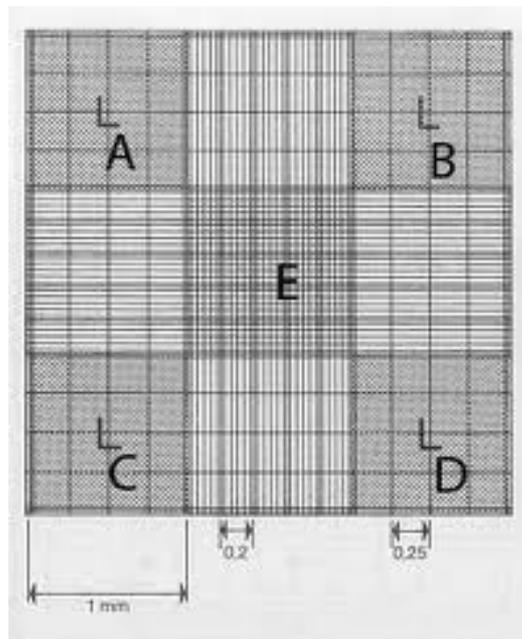


Figura 18: Câmara de Neubauer utilizada para contagem de coleomócitos.

A contagem deve ser realizada apenas com células viáveis, ou seja, as células que não estiverem coradas em azul, pois são células danificadas. Células em processo de deteriorização, observadas brilhantes e coradas, não devem ser contadas. Para chegar ao valor da viabilidade e da densidade celular deve-se realizar as Equações 3 e 4 abaixo descritas:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\sum \text{células viáveis} / \sum \text{células totais}) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Densidade celular (células/ml)} = (\sum \text{células viáveis} / \text{n}^{\circ} \text{ de áreas contadas}) \times \text{fator de diluição} \times 10000 \quad (4)$$

Para a observação de micronúcleos, 10 μL da suspensão celular corada foram colocados em uma lâmina de microscopia, previamente limpa com etanol, e foi realizado o esfregaço com o auxílio de outra lâmina nas mesmas condições. As lâminas foram identificadas e deixadas em repouso para secagem por 24 h. Após secagem, foram colocadas de molho no metanol por 10 min, secas e colocadas para corar na solução Giemsa (marca Sigma) por 10 min. Em seguida, as lâminas eram lavadas em água corrente, secas e levadas para visualização em microscópio óptico (marca Olympus Digital Camera modelo C5060WZ) em objetiva de 100x. Os micronúcleos observados eram registrados por fotografia.

2.5. Análises estatísticas

Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Como os valores seguiam distribuição normal, para a comparação das médias foi utilizado o teste one-Way ANOVA e o teste pós-hoc de Tukey e o software GrafPad Prism versão 5, adotando-se um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Foi utilizado teste Probit para análise da CL 50 da substância de referência através do software Minitab versão 15.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos solos controle e biorremediados

3.1.1. Propriedades físicas e químicas

A caracterização física e química do solo controle e dos biorremediados encontra-se na Tabela 17.

Tabela 17: Caracterização física e química do solo controle e biorremediados utilizados no experimento de toxicidade.

Parâmetros	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2
Granulometria				
Argila (%)	13	43	33	29
Silte (%)	17	9	9	9
Areia (%)	70	48	58	38
pH (H ₂ O)	5,5	6,5	6,7	6,4
pH (KCl)	5,4	6,6	6,6	6,1
Umidade (%)	8,7	8,5	8,4	8,6
Capacidade de campo (%)	20	28	33	35
Micronutrientes				
Cu (mg/dm ³)	1,57	0,71	1,88	1,26
Fe (mg/dm ³)	104,0	18,0	32,0	33,4
Mn (mg/dm ³)	15,2	24,3	18,5	27,3
Zn (mg/dm ³)	4,87	28,5	39,9	43,1
Densidade do Solo (g.cm ⁻³)	1,69	1,54	1,43	1,4
Densidade de Partícula (g.cm ⁻³)	2,7	2,5	2,6	2,5
Macroporosidade (m ³ .m ⁻³)	32,7	34,7	39,4	40,5
Microporosidade (m ³ .m ⁻³)	4,6	3,7	5,4	4,9
Matéria Orgânica (g/kg)	7,9	56,2	49,2	37,5
Carbono (g/kg)	4,6	32,7	28,6	21,8
Nitrogênio (g/kg)	0,4	0,7	1,1	1,2
Fósforo (mg/kg)	65	72	104	365

A composição granulométrica do solo controle evidencia sua textura predominante arenosa, apresentando uma proporção de areia de 70%. Essa textura é favorável para a biodegradação, por apresentar maiores taxas de aeração e uma distribuição mais uniforme de água e nutrientes (Silva, 2010). Os solos biorremediados apresentaram um incremento considerável da fração argila e de carbono orgânico. Tal aumento provavelmente reflete o crescimento de biomassa microbiana ao longo do processo em solos que receberam condições adequadas para tal e fonte de carbono. Silva (2010) destacou o incremento da matéria orgânica, após 180 dias de tratamento dos solos utilizados nesse estudo, devido o aumento da biomassa microbiana.

A textura do solo pode influenciar a viabilidade das minhocas por causa de seus efeitos sobre as propriedades do solo, tais como: retenção de umidade, estado nutricional e capacidade de troca catiônica (CTC) do solo, as quais podem ter influencia importante sobre a população de minhocas (Edwards & Bohlen, 1995).

O pH dos solos biorremediados estavam próximos da neutralidade não sendo necessária a sua correção. Já para o solo controle, em que o pH encontrava-se ligeiramente ácido, foi necessária realizar a correção para os ensaios de toxicidade. Para que a mortalidade encontrada no ensaio não seja decorrente de um valor baixo de pH não tolerado pelas minhocas, a ASTM (1995) recomenda que o pH do solo esteja em torno de 7 (neutro). Para a correção, foi feita uma curva de neutralização de acordo com a metodologia recomendada pela EMBRAPA (1997), com carbonato de cálcio (CaCO_3). De acordo com a curva apresentada abaixo (Figura 19) foi estimado o valor necessário de CaCO_3 para conferir pH 7 (neutro) ao solo, que foi de 2,3 g a uma massa de 1200 g de solo. O solo recém contaminado manteve seu pH em 7,5 não sendo necessária a calagem.

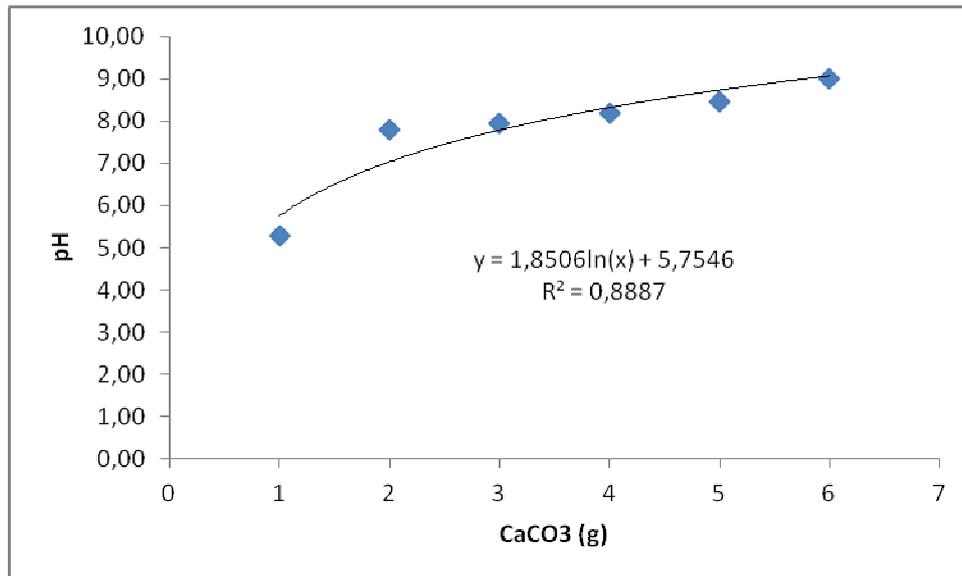


Figura 19: Curva de neutralização do CaCO₃.

A umidade dos solos, para o ensaio de toxicidade, também foi ajustada. Segundo a ASTM (1995), a umidade ideal para os ensaios de toxicidade deve estar entre 35% a 45%. Foi ajustada a umidade para 45% adicionando-se água Milli-Q de acordo com a capacidade de campo de cada tratamento, que é o teor máximo de água que o solo é capaz de reter (Chagas-Spinelli, 2007; Seabra, 2005). Esse ajuste foi realizado, da mesma maneira, para o solo recém contaminado. A umidade é importante para as minhocas, pois a água constitui 75 a 90% do seu peso corporal. Aparentemente as minhocas possuem um mecanismo para manter a quantidade de água interna, no entanto, esse mecanismo é fortemente influenciado pelo potencial de água do solo (Edwards & Bohlen, 1996).

Foi observado um incremento nas taxas de carbono e fósforo dos solos biorremediados em relação ao solo controle. Para o carbono, a taxa chegou a aumentar de 6 a 8 vezes dependendo do solo. Para o fósforo o aumento mais expressivo foi no solo BIOA₂ chegando a aumentar 5 vezes (Tabela 17). Esse aumento pode ser decorrente do aumento da matéria orgânica observada, também, na análise textural. O aumento de matéria orgânica no solo pode alterar a biodisponibilidade de metais à biota do solo (Ramos, 2007).

Em relação aos micronutrientes foi observada uma diminuição nas taxas de Ferro e um aumento nas taxas de Zinco dos solos biorremediados em relação ao controle. A densidade do solo e a densidade das partículas não tiveram grandes

alterações dos solos biorremediados para o controle. A densidade do solo foi calculada para facilitar no processo de contaminação simulando o solo no início do processo de biorremediação.

3.1.2. Metais

Os metais (Tabela 18) foram analisados na Embrapa Solos pela técnica ICP-OES, sendo que os metais cobalto (Co), níquel (Ni), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) estavam abaixo do limite de detecção desta técnica e foram analisados pela técnica ICP-MS.

Tabela 18: Valores encontrados para os metais nos solos em estudo.

Metal (mg/kg)	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2	OLU
Cr	2,33	2,55	2,93	3,21	2,75
Co	0,89	0,90	0,92	1,02	1,47
Ni	0,61	0,78	1,96	3,25	2,27
Cd	0,03	0,04	0,09	0,10	0,04
Pb	5,11	6,26	9,81	12,9	5,61

Os valores orientadores em solo e água subterrânea estabelecidos pela Resolução Conama 420/09 (Conama, 2009) para os metais analisados são: chumbo (Pb): 72 mg/kg; cobalto (Co): 25 mg/kg; níquel (Ni): 30 mg/kg; cádmio (Cd): 1,3 mg/kg; e cobre (Cu): 60 mg/kg, ficando todos abaixo do limite de prevenção da norma.

3.1.3. Comparação das técnicas de extração de HTPs e HPAs

3.1.3.1 Extração dos HTPs

As tabelas 19, 20, 21, 22 e 23 apresentam respectivamente os resultados em termos de médias e desvios-padrão dos valores de n-alcanos, hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP), mistura complexa não resolvida (MCNR) e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) obtidos com as três técnicas de extração

aplicadas (Soxhlet, Microondas-MARS e Extração acelerada por solvente-ASE) para os diferentes solos: arenoso com contaminação antiga de origem desconhecida utilizado no experimento de biorremediação-CONT (Tabela 19); arenoso contaminado por OLU e biorremediado por Bioestímulo-BIOS (Tabela 20); arenoso contaminado por OLU e biorremediado por bioaumento-BIOA1 (Tabela 21); arenoso contaminado por OLU e biorremediados por bioaumento-BIOA2 (Tabela 22) e; arenoso da mesma origem que o CONT recém-contaminado por óleo lubrificante usado-OLU (Tabela 23).

O solo controle CONT (Tabela 19) apresentou quantidades baixas de HTP, mas foi o único com teores mensuráveis de n-alcanos apresentando diferença significativa entre as três técnicas utilizadas e para todas as frações de HTP (n-alcanos, HRP e MCNR) ($p < 0,001$), sendo que o método de extração pelo ASE foi o que resultou na maior quantidade extraída de HTP (16,3 mg/kg), em grande parte pela sua superioridade em recuperar os n-alcanos presentes. A contaminação do solo controle é provavelmente decorrente de deposição atmosférica, devido à proximidade da área de agricultura orgânica com estradas de movimento relativamente intenso. Uma segunda hipótese, seria de vazamento de combustível de maquinário usado na agricultura orgânica. Tal contaminação por HTP foi anteriormente relatada por pesquisadora do grupo BioProcess que utilizou solo de mesma área para seus estudos de biorremediação (Cianella, 2010). O tipo de HTP presentes nesse solo CONT (basicamente n-alcanos) sugere que a deposição atmosférica e/ou derrame de combustíveis e não de óleo lubrificantes responderia por tal contaminação.

Tabela 19. Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com as diferentes técnicas de extração (soxhlet, microondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) do solo CONT (n=3).

CONT	Soxhlet	Microondas	ASE
n-alcenos (d.p.)	1,9 a (0,2)	0,07 b (0,01)	9,6 c (0,0)
HRP (d.p.)	4,2 d (0,3)	0,07 e (0,03)	6,7 f (0,1)
MCNR (d.p.)	<LD	<LD	<LD
HTP (d.p.)	6,2 j (0,4)	0,14 l (0,01)	16,3 m (0,1)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas.

LD = Limite de detecção

Os solos biorremediados BIOS (Tabela 20) e BIOA₁ (Tabela 21) não apresentaram diferenças significativas entre os métodos soxhlet e micro-ondas para as frações HRP e, conseqüentemente, HTP ($p > 0,0001$) e os dois métodos apresentaram diferenças significativas para ASE. No entanto, para a fração MCNR o solo BIOS não apresentou diferença significativa entre micro-ondas e ASE. Já a técnica soxhlet apresentou diferença significativa para as técnicas micro-ondas e ASE ($p = 0,0144$). Para BIOA₁ a fração MCNR apresentou diferenças significativa entre as três técnicas ($p < 0,0001$). A superioridade das técnicas soxhlet e micro-ondas em relação ao ASE decorre principalmente da maior extração da fração HRP, algo não verificado no solo CONT, pois os solos biorremediados não apresentaram n-alcenos em quantidade possível de detecção.

Tabela 20. Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcanos, HRP, MCNR e HTP obtidos com as diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) do solo BIOS.

BIOS	Soxhlet	Microondas	ASE
n-alcanos (d.p.)	<LD	<LD	<LD
HRP (d.p.)	4022,4 b (192,8)	3911,0 b (0,0)	1445,3 c (58,0)
MCNR (d.p.)	367,43 d (48,0)	159,5 e (59,5)	200,4 e (76,4)
HTP (d.p.)	4389,8 f (11,3)	4070,6 f (59,6)	1748,9 g (214,0)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas.

LD = Limite de detecção

Tabela 21. Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcanos, HRP, MCNR e HTP obtidos com as diferentes técnicas de extração (soxhlet, microondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) do solo BIOA1.

BIOA1	Soxhlet	Microondas	ASE
n-alcanos (d.p.)	<LD	<LD	<LD
HRP (d.p.)	3911,0 b (0,0)	3911,0 b (0,0)	1215,0 c (274,8)
MCNR (d.p.)	188,2 d (11,3)	137,2 e (15,5)	62,5 f (0,0)
HTP (d.p.)	4099,3 g (11,3)	4048,3 g (15,5)	1333,9 h (372,3)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas.

LD = Limite de detecção

O solo biorremediado BIOA₂ (Tabela 22) não apresentou diferenças significativas entre as três técnicas de extração para a fração HRP ($p=0,4481$) e, por consequência, para o HTP foi observado o mesmo resultado ($p=0,3278$). Já para a fração MCNR foi observada diferença significativa da técnica soxhlet para micro-

ondas e ASE ($p=0,0032$), já micro-ondas e ASE não apresentaram diferenças entre si.

Tabela 22. Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com as diferentes técnicas de extração (soxhlet, microondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) do solo BIOA2.

BIOA2	Soxhlet	Microondas	ASE
n-alcenos (d.p.)	<LD	<LD	<LD
HRP (d.p.)	3911,1 b (0,0)	3881,4 b (51,3)	3540,5 b (641,8)
MCNR (d.p.)	153,3 c (19,1)	72,5 d (20,5)	62,9 d (22,2)
HTP (d.p.)	4064,4 e (19,1)	3953,9 e (38,2)	3603,5 e (619,6)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas.

LD = Limite de detecção

As extrações a partir do solo recém contaminado OLU (Tabela 23) apresentou diferenças significativas entre os três métodos ($p<0,0001$) para as frações HRP e HTP, sendo a extração através do Soxhlet a que apresentou maior recuperação dos HTP. Já para a fração MCNR, a extração por micro-ondas apresentou diferença significativa para soxhlet e ASE ($p=0,0050$) e soxhlet não apresentou diferença para ASE.

Comparando com o estudo em reatores que deu origem aos solos biorremediados aqui testados (Silva, 2010), a técnica que mais se aproximou do valor encontrado na análise inicial do OLU foi a obtida com o Soxhlet.

O método que apresentou maior coeficiente de variação (e, portanto, menor reprodutibilidade) foi o ASE, algo particularmente evidenciado na extração de HRP dos solos BIOS, BIOA1 e BIOA2. Os resultados ainda sugerem que em caso de solo arenoso, como o utilizado no presente estudo, para extração de n-alcenos de solo com contaminação antiga (n-alcenos de solo com contaminação recente não foi possível avaliar pela ausência deste grupo no óleo lubrificante usado), o ASE é superior aos demais métodos. Para extração das frações HRP e MCNR, o soxhlet foi na maioria dos casos superior, tanto em contaminação antiga como recente.

Tabela 23. Médias (desvio-padrão) dos valores (mg/kg) de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP obtidos com as diferentes técnicas de extração (soxhlet, microondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) do solo OLU.

OLU	Soxhlet	Microondas	ASE
n-alcenos (d.p.)	<LD	<LD	<LD
HRP (d.p.)	13911,0 b (0,0)	8911,0 c (0,00)	3911,1 d (0,0)
MCNR (d.p.)	1023,5 e (43,6)	695,9 f (193,4)	1245,0 e (89,3)
HTP (d.p.)	14934,6 g (43,6)	9607,0 h (193,4)	5156,0 i (89,3)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas.

LD = Limite de detecção

3.1.3.2. Extração dos HPAs

Foram utilizadas as mesmas técnicas de extração para os HPA. As tabelas 24, 25, 26, 27 e 28 apresentam respectivamente os resultados em termos de médias e desvios-padrão dos valores para os 16 HPA extraídos dos solos: CONT (Tabela 24); BIOS (Tabela 25); BIOA1 (Tabela 26); BIOA2 (Tabela 27) e; OLU (Tabela 28).

Tabela 24. Médias (desvio-padroao) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo CONT.

HPA (Nº de anéis aromáticos)	SOHXLET	MARS	ASE
	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)
Fluoranteno (4)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)	0,01 (0,01)
Pireno (4)	<LD	<LD	<LD
Benzo(a)antraceno (4)	0,07 (0,01)	0,01 (0,00)	0,02 (0,01)
Criseno (4)	0,07 (0,01)	0,00 (0,00)	0,01 (0,01)
Benzo(b)fluoranteno (5)	0,09 (0,01)	0,01 (0,00)	0,02 (0,01)
Benzo(k)fluoranteno (5)	0,10 (0,02)	0,02 (0,00)	0,02 (0,00)
Benzo(a)pireno (5)	0,09 (0,02)	0,02 (0,00)	0,04 (0,02)
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,06 (0,01)	0,03 (0,00)	0,04 (0,02)
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,15 (0,04)	0,09 (0,00)	0,11 (0,01)
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,07 (0,01)	0,02 (0,00)	0,04 (0,02)
TOTAL	0,78 (0,08) a	0,28 (0,00) b	0,40 (0,12) a

Letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) LD = Limite de detecção

Tabela 25. Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo BIOS

HPA (N^o de anéis aromáticos)	SOHXLET Média (d.p.)	MARS Média (d.p.)	ASE Média (d.p.)
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0,12 (0,00)	0,12 (0,00)	0,12 (0,00)
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0,07 (0,01)	0,07 (0,01)	0,07 (0,00)
Fluoranteno (4)	0,05 (0,01)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)
Pireno (4)	0,05 (0,00)	0,04 (0,00)	0,04 (0,00)
Benzo(a)antraceno (4)	0,12 (0,01)	0,11 (0,00)	0,11 (0,00)
Criseno (4)	0,03 (0,00)	0,02 (0,00)	0,03 (0,01)
Benzo(b)fluoranteno (5)	0,13 (0,00)	0,13 (0,00)	0,14 (0,01)
Benzo(k)fluoranteno (5)	0,15 (0,00)	0,15 (0,00)	0,16 (0,01)
Benzo(a)pireno (5)	0,20 (0,00)	0,20 (0,01)	0,30 (0,11)
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,32 (0,00)	0,31 (0,00)	0,41 (0,01)
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,91 (0,00)	0,89 (0,00)	0,90 (0,02)
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,16 (0,00)	0,16 (0,00)	0,16 (0,01)
TOTAL	2,79 (0,03) a	2,73 (0,02) a	2,96 (0,19) a

Letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) LD = Limite de detecção

Tabela 26. Médias (desvio-padroao) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes tecnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo BIOA1

HPA (N ^o de anéis aromáticos)	SOHXLET Média (d.p.)	MARS Média (d.p.)	ASE Média (d.p.)
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0,12 (0,00)	0,12 (0,00)	0,12 (0,00)
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0,07 (0,01)	0,07 (0,01)	0,07 (0,00)
Fluoranteno (4)	0,05 (0,00)	0,05 (0,01)	0,05 (0,00)
Pireno (4)	0,04 (0,00)	0,04 (0,00)	0,05 (0,00)
Benzo(a)antraceno (4)	0,11 (0,00)	0,11 (0,01)	0,11(0,00)
Criseno (4)	0,02 (0,00)	0,02 (0,00)	0,03 (0,00)
Benzo(b)fluoranteno (5)	0,13 (0,00)	0,13 (0,00)	0,13 (0,00)
Benzo(k)fluoranteno (5)	0,15 (0,00)	0,15 (0,00)	0,15 (0,00)
Benzo(a)pireno (5)	0,20 (0,00)	0,20 (0,00)	0,21 (0,00)
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,32 (0,00)	0,31 (0,00)	0,31(0,00)
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,90 (0,00)	0,89 (0,01)	0,88 (0,01)
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,16 (0,00)	0,16 (0,00)	0,16 (0,00)
TOTAL	2.75 (0,01) a	2,73 (0,04) b	2,76 (0,01) c

Letras iguais não apresentam diferenças significativas (p>0,05) LD = Limite de detecção

Tabela 27. Médias (desvio-padroao) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo BIOA2.

HPA (N ^o de anéis aromáticos)	SOHXLET Média (d.p.)	MARS Média (d.p.)	ASE Média (d.p.)
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0,12 (0,00)	0,12 (0,00)	0,12 (0,00)
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0,07 (0,00)	0,07 (0,00)	0,07 (0,00)
Fluoranteno (4)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)
Pireno (4)	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)
Benzo(a)antraceno (4)	0,11 (0,00)	0,12 (0,01)	0,11 (0,00)
Criseno (4)	0,02 (0,00)	0,01 (0,00)	0,01(0,00)
Benzo(b)fluoranteno (5)	0,14 (0,00)	0,14(0,00)	0,13 (0,00)
Benzo(k)fluoranteno (5)	0,15 (0,00)	0,15 (0,00)	0,15 (0,00)
Benzo(a)pireno (5)	0,20 (0,00)	0,20 (0,00)	0,20 (0,00)
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,32 (0,01)	0,32 (0,01)	0,31 (0,00)
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,16 (0,00)	0,16 (0,00)	0,16 (0,00)
TOTAL	2,74 (0,01) a	2,73 (0,03) a	2,73 (0,01) a

Letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) LD = Limite de detecção

Tabela 28. Médias (desvio-padrão) de valores (mg/kg) dos 16 HPA prioritários obtidos com diferentes técnicas de extração (Sohxlet, micro-ondas-MARS, acelerada por solvente-ASE) para o solo OLU.

HPA (N ^o de anéis aromáticos)	SOHXLET	MARS	ASE
	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0,15 (0,00)	0,14 (0,00)	0,14 (0,00)
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0,08 (0,00)	0,07 (0,00)	0,07 (0,00)
Fluoranteno (4)	0,09 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)
Pireno (4)	0,14 (0,01)	0,09 (0,01)	0,10 (0,01)
Benzo(a)antraceno (4)	24,4 (0,00)	12,3 (3,6)	12,0 (4,4)
Criseno (4)	40,1 (0,01)	17,2 (6,4)	24,6 (1,0)
Benzo(b)fluoranteno (5)	12,4 (2,6)	3,8 (1,3)	8,1 (0,5)
Benzo(k)fluoranteno (5)	4,2 (1,0)	3,2 (0,5)	2,2 (0,3)
Benzo(a)pireno (5)	28,4 (3,2)	29,0 (8,9)	30,6 (8,6)
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	11,3 (1,0)	2,3 (1,0)	0,32 (0,01)
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	6,7 (1,7)	2,8 (0,7)	0,89 (0,01)
Benzo (g,h,i)perileno (6)	29,6 (6,9)	4,0 (1,1)	0,16 (0,00)
TOTAL	158,04 (18.4) a	74,60 (23.6) b	79,74 (14,9) c

Letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) LD = Limite de detecção

A Tabela 29 mostra a concentração dos HPA dividido por número de anéis aromáticos evidenciando a presença de HPA de maior número de anéis nos solos biorremediados, os quais são considerados mais recalcitrantes.

Tabela 29: Concentração dos HPA de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis aromáticos encontrados nos solos em estudo.

HPAs (mg/kg)	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2	OLU
2 anéis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3 anéis	0.07	0.67	0.67	0.67	0.7
4 anéis	0.15	0.24	0.22	0.22	64.7
5 anéis	0.28	0.48	0.48	0.49	45.0
6 anéis	0.28	1.39	1.38	1.37	47.6
HPA_{tot}	0,8	2,8	2,8	2,8	158,0

A Tabela 30 mostra a média da recuperação do surrogate para as amostras nas três técnicas de extração.

Tabela 30: Média da recuperação do surrogate para as três técnicas de extração em todos os solos estudados.

Surrogate	Soxhlet	MARS	ASE
2 Fluorbiphenyl	2,5	0,8	1,5
Terphenyl D14	3,5	3,1	2,5
Recuperação (%)	75,5	49,5	49,5

Para o solo CONT houve diferença significativa entre os métodos Soxhlet e Microondas e entre Microondas e ASE ($p < 0,0001$), sendo que a melhor recuperação foi observada com o método Soxhlet. Já os métodos Soxhlet e ASE não apresentaram diferenças significativas entre si. Nos solos biorremediados, BIOS e BIOA₂ os teores de HPA extraídos não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,3532$ e $p = 0,3476$, respectivamente) entre os métodos de extração. No solo biorremediado BIOA₁, a concentração dos HPAs apresentaram diferenças significativas entre as três técnicas ($p = 0,0450$). A diferença significativa também foi observada no solo recém contaminado, o qual a extração por soxhlet apresenta a maior concentração de HPAs ($p = 0,0010$).

O intervalo de recuperação aceitável para determinação de compostos orgânicos traço, em geral, devem estar na faixa de 70-120 % (Ribani *et al.*, 2004 em

Ferreira, 2010), sendo a extração por soxhlet a única dentro do limite aceitável, no presente trabalho (Tabela 30).

Wang *et al.* (2007), comparando as técnicas de Soxhlet, MARS e ASE, observaram que a extração de HPA presente em solo por ASE foi a que apresentou melhor eficiência e que as eficiências de MARS e Soxhlet eram comparáveis. No entanto, Saim *et al.* (1997), comparando a extração de HPAs em solo (não foi informado no artigo as características granulométricas), pelas mesmas técnicas, observaram que a melhor taxa de recuperação foi apresentada pelo Soxhlet. No presente estudo, o método por soxhlet também foi superior e MARS e ASE apresentaram eficiências de extração semelhantes.

As diferenças encontradas podem ser em decorrência das diferentes condições de extração dos outros estudos mas principalmente às diferentes características dos solos, que apresentavam maior teor da fração argila do solo podendo favorecer processos de adsorção dos contaminantes (Sheffer, 1998).

O apêndice A apresenta os cromatogramas das análises de HTP e HPA. O apêndice C apresenta artigo referente a estudo preliminar realizado com o objetivo de avaliar e comparar a eficiência das três técnicas de extração para solos diferentes, no caso arenoso e argiloso.

3.2. Ensaios de Toxicidade

3.2.1. Ensaio de sensibilidade

No ensaio de sensibilidade realizado com a substância de referência 2-cloroacetamida em papel de filtro, após 24h de exposição foram observados os resultados apresentados na Tabela 31.

Para o cálculo da CL 50 foram utilizadas apenas as concentrações nas quais observou-se letalidade. Através do resultado do programa (Apêndice B) foi identificado o valor da CL 50 de 1,10 mg/ml. A Figura 20 apresenta a relação dose-resposta para a substância de referência.

Tabela 31: Resultados do ensaio de sensibilidade com *E. andrei* e a substância de referência 2-cloroacetamida.

Concentração (mg/ml)	Organismos testados	Organismos mortos	% de letalidade
6,0	10	10	100
3,0	10	10	100
1,5	10	6	60
1,0	10	4	40
0,06	10	0	0
0,0	10	0	0

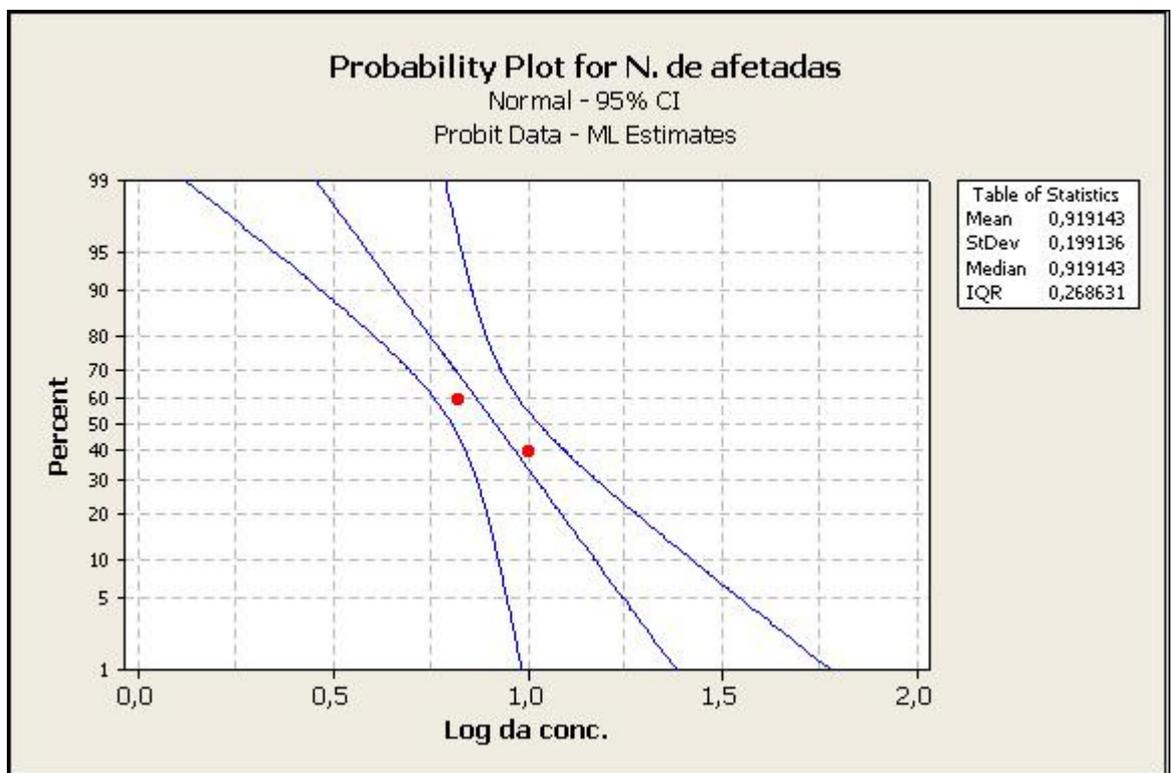


Figura 20: Relação dose-resposta para *E. andrei* a substância de referência 2-cloroacetamida.

3.2.2. Avaliação dos efeitos letais

A Tabela 32 apresenta os resultados do ensaio de mortalidade dos solos CONT, BIOS, BIOA1, BIOA2 e OLU. O ensaio de toxicidade foi considerado válido, pois no controle ocorreu a quantidade máxima de mortalidade permitida de 10% após os 14, 28, 42 e 56 dias de teste.

Tabela 32: Resultado do ensaio de letalidade após 14, 28, 42 e 56 dias (n=30).

Tempo (dias)	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2	OLU
14	3	6	28	30	22
28	3	29	30	30	30
42	3	30	30	30	30
56	3	30	30	30	30

A Figura 21 mostra a média e o desvio-padrão em porcentagem do ensaio de letalidade.

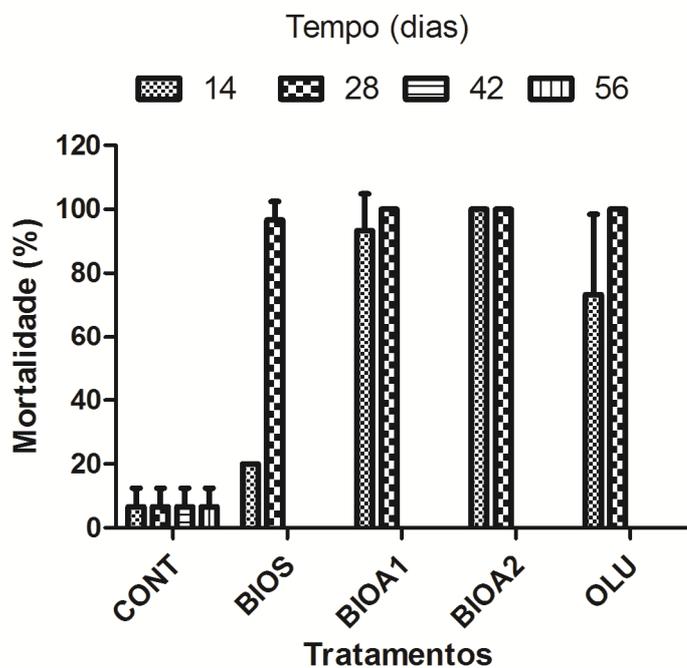


Figura 21: Média e desvio-padrão da mortalidade, em porcentagem, durante os 14, 28, 42 e 56 dias de ensaio de letalidade.

Aos 14 dias foram observadas mortalidades de $93\% \pm 12\%$ e $100\% \pm 0\%$ nos tratamentos BIOA1 e BIOA2, respectivamente. O tratamento BIOS apresentou uma taxa de mortalidade de $20\% \pm 0\%$. O solo recém-contaminado apresentou mortalidade de $75\% \pm 25\%$. Já o solo controle apresentou mortalidade de $7\% \pm 2\%$. Todos os tratamentos, exceto BIOS, apresentaram diferenças significativas em relação ao CONT ($p < 0,05$). O BIOS apresentou diferenças significativas em relação a BIOA1, BIOA2 e OLU ($p < 0,05$). Os tratamentos BIOA1, BIOA2 e OLU não apresentaram diferenças significativas entre si.

Aos 28 dias, houve um incremento na mortalidade no tratamento BIOS para $97\% \pm 6\%$. Ambos os tratamentos BIOA1 e OLU apresentaram mortalidade de $100\% \pm 0\%$. Aos 28 dias todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas para CONT e não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

Silva (2010), que realizou a biorremediação dos solos no presente estudo, observou que os tratamentos que apresentaram maior biodegradação dos HTP, em 120 dias de biorremediação, foram BIOA1 e BIOA2. No entanto, aos 180 dias, valores consideráveis de HTP foram observados nos dois tratamentos, o que sugere biodegradação de cadeias maiores em menores, algo não alcançado nos primeiros 120 dias de biodegradação.

No presente estudo, após 22 meses de biorremediação, os solos que haviam apresentado melhor eficiência na remoção de HTP (Tabelas 19, 20 e 21) foram os que apresentaram as maiores taxas de letalidade, já aos 14 dias de exposição. Desse modo, a toxicidade encontrada nos solos remediados pode estar associada às concentrações remanescentes de HTP e HPA. No caso dos HPA, especialmente, os de 5 e 6 anéis são particularmente mais recalcitrantes (Tabela 26). Além disso, uma fração residual do contaminante permanece mesmo quando ocorre uma biodegradação ótima. Isso sugere que nem todos os componentes da mistura têm o mesmo destino durante a degradação (Nocentini; Pinelli; Fava, 2000). Lopes et al. (2010), avaliando a toxicidade de óleo lubrificante, após 90 dias de biodegradação, também observou que o óleo que apresentou maior biodegradação foi o que também apresentou maior taxa de mortalidade das minhocas expostas. Chaîneau et al. (2003) sugerem que o processo de biodegradação, apesar de reduzir a quantidade do composto alvo, no caso os hidrocarbonetos, mantém ou aumenta a toxicidade proveniente de hidrocarbonetos persistentes no solo.

Dorn & Salanitro (1999), comparando respostas de toxicidade de diferentes organismos, dentre eles *E. foetida*, para solo contaminado com óleo cru antes e após biorremediação, ressaltaram que *E. foetida* foi o organismo mais sensível dentre os utilizados. Esse fato havia sido observado anteriormente por Dorn et al. (1998).

3.2.3. Avaliação dos efeitos subletais

3.2.3.1. Avaliação da biomassa

Foi observada diminuição da biomassa dos indivíduos em todos os tratamentos (Figura 22). No CONT, foi observada uma diminuição da biomassa de 48% ao final do experimento (56 dias). Os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparados ao CONT ($p < 0,0001$), exceto BIOS aos 14 dias.

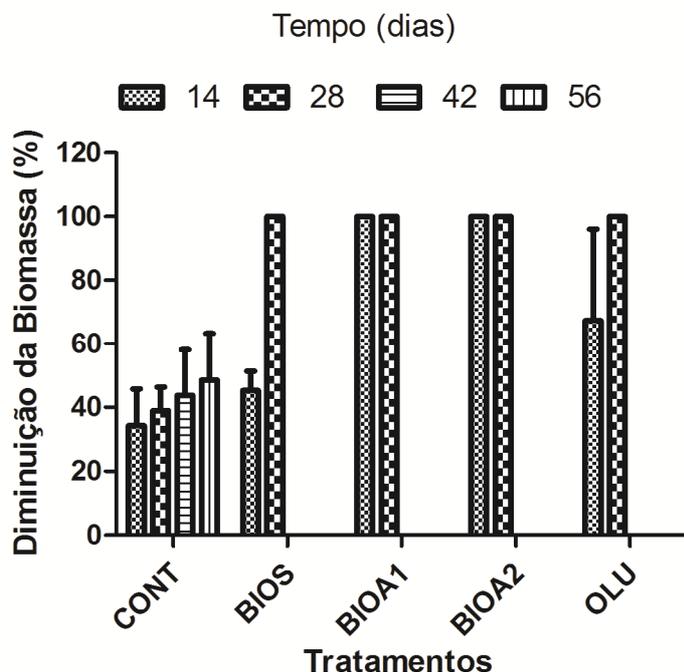


Figura 22: Diminuição de biomassa dos organismos expostos aos solos CONT, BIOS, BIOA1, BIOA2 e OLU após 14, 28, 42 e 56 dias de exposição.

3.2.3.2. Deformações anatômicas

Foram observadas, aos 14 dias, deformações anatômicas nos indivíduos expostos aos solos BIOS e OLU, respectivamente (Figuras 23 e 24). Tais deformações evidenciam que, apesar de não causar mortalidade alta, no caso de BIOS aos 14 dias, os indivíduos expostos não se encontravam saudáveis, sugerindo a presença de indutores de toxicidade.



Figura 23: Estrangulamento no segmento de minhoca exposta ao tratamento BIOS.



Figura 24: Estrangulamento no segmento e inchaço após clitelo de minhoca exposta ao tratamento OLU.

Correia & Moreira (2010) observaram deformações anatômicas em minhocas expostas aos pesticidas 2,4-D e glifosato. Minhocas expostas ao MTBE, presente no petróleo, sofreram várias deformações (An, 2005). Cantelli (2011), em estudo da toxicidade de agrotóxicos Carbofurano e Carbendazim sobre minhocas em solo natural, relatou o aparecimento de fragmentação segmentar e secreção amarelada nas minhocas exposta aos compostos, após 14 dias.

3.2.4. Avaliação dos efeitos crônicos

3.2.4.1. Reprodução – Ovos e formas juvenis

O ensaio de reprodução foi realizado nos mesmo intervalo de tempo do ensaio de reprodução, 14, 28, 42 e 56 dias. Não foi observada a ocorrência de ovos não eclodidos em todos os tratamentos. No entanto, foi observada a ocorrência de formas juvenis (Tabela 33).

Tabela 33: Médias e desvios-padrão do número de formas juvenis de *E. andrei* durante o ensaio de reprodução.

Tratamentos	14 dias	28 dias	42 dias	56 dias
CONT	0,0 ± 0,0	6,3 ± 1,2	17,3 ± 2,5	32,3 ± 2,5
BIOS	0,7 ± 0,0	18 ± 5,2	21 ± 4,4	10 ± 3,6
BIOA1	1,7 ± 0,5	7,7 ± 4,0	4,3 ± 1,2	1,3 ± 0,2
BIOA2	0,3 ± 0,0	15,7 ± 2,9	3,3 ± 0,6	2,0 ± 0,2
OLU	0,0 ± 0,0	38,7 ± 13,6	15,7 ± 7,8	4,7 ± 2,1

Aos 28 dias, o tratamento que apresentou maior número de formas juvenis (Figura 25) foi o solo recém-contaminado (OLU), com $38,7 \pm 13,6$ indivíduos. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparados ao CONT ($p < 0,05$). Os solos biorremediados BIOS, BIOA1 e BIOA2 apresentaram diferenças significativas quando comparados ao solo recém-contaminado OLU ($p < 0,05$). Os solos BIOS e BIOA2 apresentaram diferenças significativas para o solo BIOA1 ($p < 0,05$), mas não apresentaram entre si ($p > 0,05$). Esse fato pode ser explicado, pois as minhocas expostas à ambientes contaminados, normalmente produzem mais

ovos para sobreviver às condições adversas (Edwards & Bohlen, 1996). No entanto, aos 56 dias, ou seja, no final do experimento, houve uma diminuição expressiva de formas juvenis nos solos biorremediados (BIOS, BIOA1 e BIOA2) e recém-contaminado (OLU) sendo que o maior número foi encontrado no solo CONT com $32,3 \pm 2,5$. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em comparação com o CONT ($p < 0,05$). O tratamento BIOS apresentou diferenças significativas para os outros tratamentos BIOA1, BIOA2 e OLU ($p < 0,05$). Os tratamentos BIOA1, BIOA2 e OLU não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Shin & Kim (2001), observando a toxicidade de solo remediado após contaminação com diesel, do HPA fenantreno, e de um biosurfactante para as minhocas *Eisenia foetida*, ressaltaram que o solo contaminado com diesel apresentou toxicidade quanto à reprodução mostrando pequena quantidade de juvenis. Saterbak et al. (2000) avaliaram a toxicidade antes e após a biorremediação de solos contaminados com HTP (3.000 a 5.000 mg/kg), com minhocas (*E. foetida*) e com germinação de plantas. Eles observaram que após a biorremediação, apesar de não afetar a sobrevivência, as médias de ovos e formas juvenis diminuíram em alguns solos em relação ao solo controle.

Foram estudados os efeitos genotóxicos e reprodutivos sobre minhocas em solo de uma área industrial de carvoaria contaminada com HPA (Bonnard *et al.*, 2009). No tocante à reprodução, os autores observaram que após 56 dias de exposição, a produção de juvenis em contato com o solo com 20% (527 mg/kg) e 40% (1.053 mg/kg) de HPA diminuíram 90% em relação ao controle (Bonnard *et al.*, 2009).



Figura 25: Forma juvenil encontrada no solo do tratamento BIOS.

3.2.5 Avaliação de efeitos genotóxicos

3.2.5.1. Viabilidade e densidade celular

O ensaio de densidade celular só pode ser realizado nos tratamentos CONT, BIOS e OLU, pois já aos 14 dias, os indivíduos dos tratamentos BIOA1 e BIOA2 haviam morrido. Além disso, para os tratamentos BIOS e OLU o teste em questão só pode ser realizado aos 14 dias, pois aos 28 dias, os indivíduos representantes desses tratamentos também haviam morrido. A Tabela 34 apresenta os resultados do teste.

Tabela 34: Densidade e viabilidade celular de *E. andrei* após 14 dias de exposição solo controle, bioestimulado e recém contaminado (n=4).

Tratamentos	CONT	BIOS	OLU
	Média (d.p)	Média (d.p)	Média (d.p)
Densidade celular (células/ml)	361.600,0 (54.779,0)	185.200,0 (21.746,4)	138.400, 0 (15.654,6)
Viabilidade (%)	98,6 (1,0)	92,8 (1,0)	88,5 (2,0)

Foi observada aos 14 dias, uma queda na densidade e na viabilidade das células imunológicas das minhocas (coleomócitos) tanto no BIOS quanto no OLU em relação ao controle. Todas as amostras, tanto de viabilidade quanto de densidade, apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,0001$). Aos 28 dias, não havia organismos vivos em BIOS ou em OLU e o monitoramento continuou sendo realizado apenas no CONT até os 56 dias de experimento, sendo que os resultados não apresentaram diferenças significativas entre si. O resultado sugere que os compostos presentes no solo contaminado e remediado primeiramente e, em segundo lugar, no solo recém contaminado podem causar alterações celulares.

Bonnard et al. (2009), em estudo sobre efeitos na reprodução e genotoxicidade em uma área industrial de carvoaria contaminada com HPA observaram que, após 4 e 10 dias de exposição aos solos de maior concentração de HPA (20% = 527 mg/kg e 40% = 1.053 mg/kg), havia uma diminuição no número de coleomócitos em *E. foetida*. Sforzini et al. (2012), investigaram a genotoxicidade, através de danos nos coleomócitos, de minhocas expostas a solo artificial contaminado com Benzo(a)pireno e constataram que a presença do Benzo(a)pireno causou danos aos coleomócitos dos indivíduos, sem no entanto, afetar a taxa de mortalidade.

Coleomócitos são células circulatórias presentes no fluido celomático e desempenham importante papel fisiológico no sistema imunológico das minhocas (Sforzini et al., 2012; Wu et al., 2012). Portanto, pode ser considerada uma boa abordagem para a observação de danos causados às minhocas por poluentes presentes no solo (Lourenço et al., 2011).

3.2.5.2. Micronúcleo

Micronúcleo é um pequeno núcleo formado do núcleo principal pela perda de um fragmento da cromatina ou quebra do cromossomo durante a divisão celular. Esse fato ocorre devido à presença de substância que induzam essa quebra (Lionetto, Calisi & Schettino, 2012; Leet & Richards, 2009).

Não foram observados micronúcleos nas células das minhocas expostas aos tratamentos CONT, BIOS e OLU.

A diferença entre os resultados de micronúcleo e viabilidade e densidade celular podem estar ligada a natureza dos testes que refletem eventos biológicos

diferentes, pois o micronúcleo está ligado a genotoxicidade acumulada durante o ciclo de vida da célula e, eventualmente, pela presença de substâncias tóxicas (Sforzini *et al.*, 2012). Já os coleomócitos são um indicador mais sensível, pois ficam, em sua maioria, no aparelho digestivo das minhocas e em contato direto com o solo contaminado e o contaminante no momento da ingestão do solo por esses organismos, surgindo como uma importante ferramenta para testes ecotoxicológicos (Lionetto, Calisi & Schettino, 2012; Lett & Richards, 2009). As figuras 26, 27. 28 mostram, respectivamente, os coleomocitos nos tratamentos CONT, BIOS e OLU não apresentando micronúcleo.

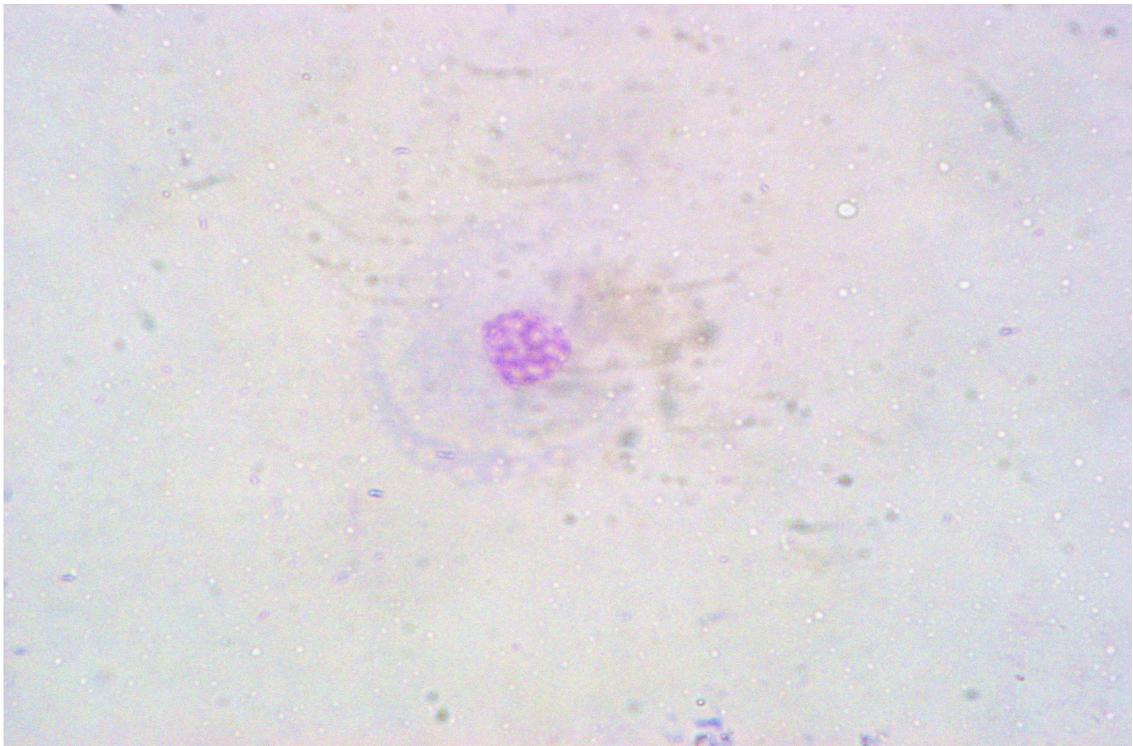


Figura 26: Coleomócito de *E. andrei* no tratamento CONT, aos 14 dias de exposição.

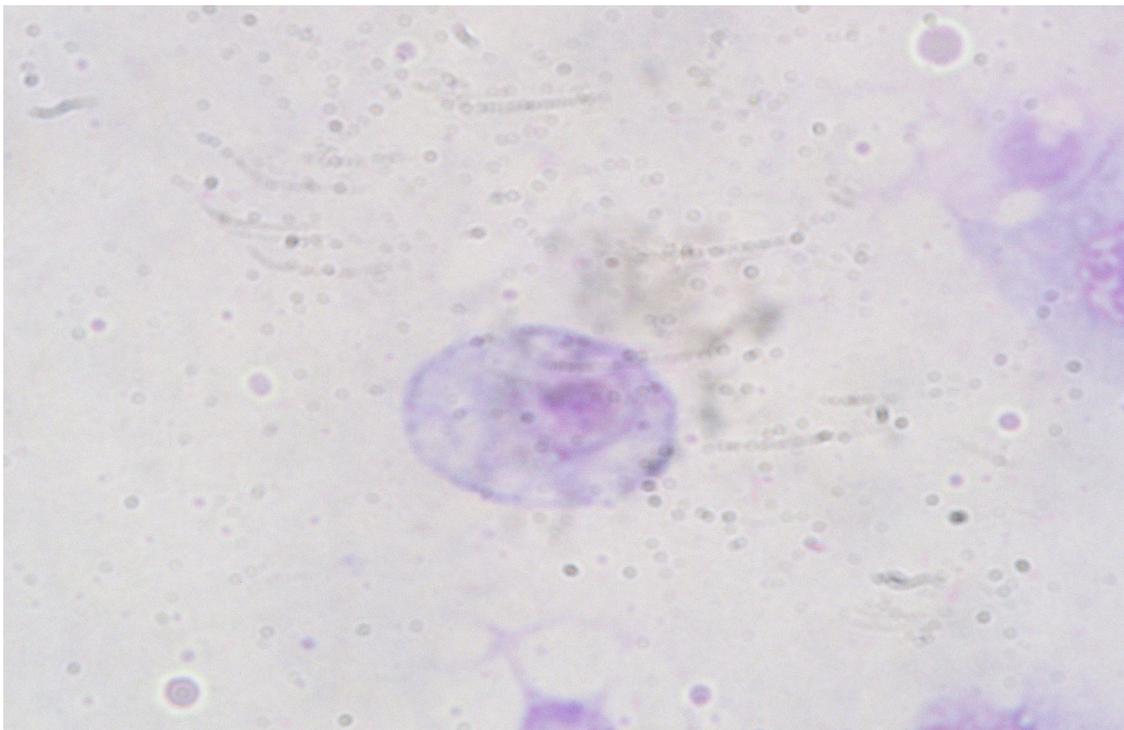


Figura 27: Coleomóculo de *E. andrei* no tratamento BIOS, aos 14 dias de exposição.

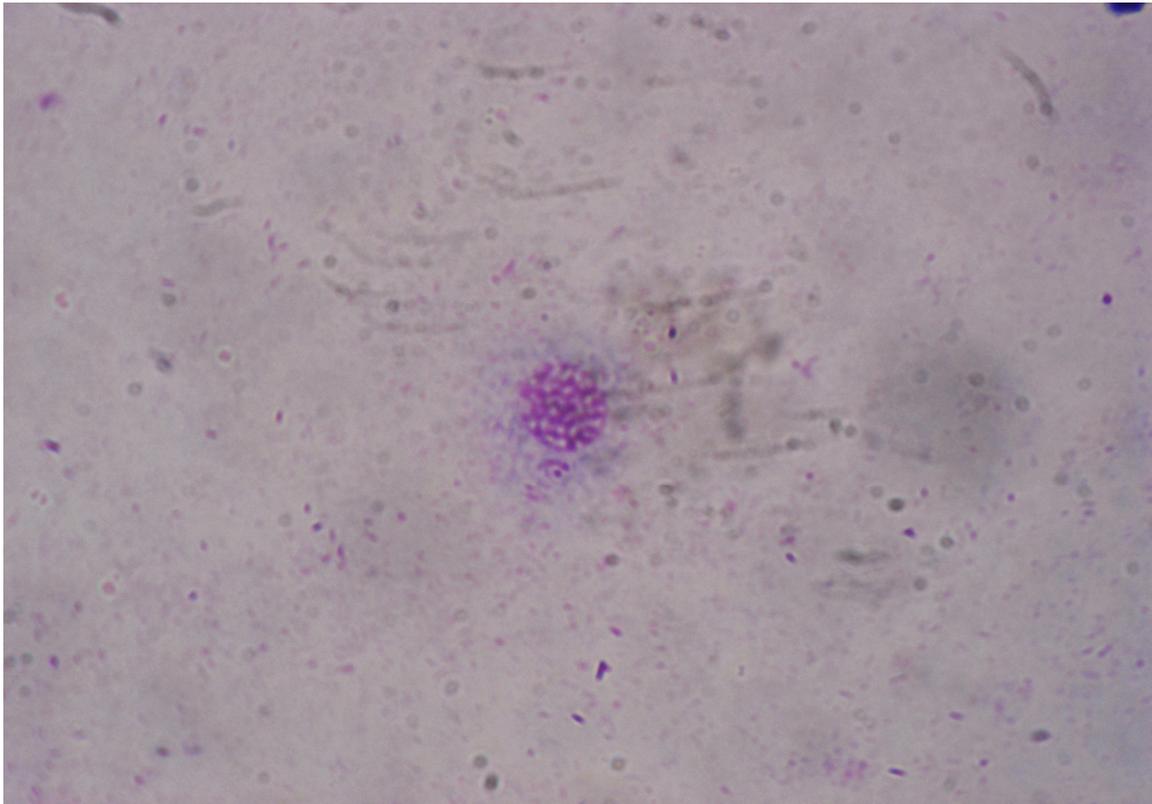


Figura 28: Coleomóculo de *E. andrei* no tratamento OLU, aos 14 dias de exposição.

O apêndice D apresenta artigo referente ao trabalho apresentado na presente dissertação e o apêndice E apresenta artigo referente a estudo preliminar com objetivo de testar a espécie *E. Andrei* como bioindicador para solos contaminados com petroderivados.

4. CONCLUSÃO

No presente estudo foi avaliada a toxicidade aguda, subletal, crônica e genotóxica de solos recém-contaminados e solos contaminados e biorremediados após 22 meses tendo por contaminante, o óleo lubrificante usado e como organismo indicador, a minhoca *E. andrei*. Além disso, avaliou-se a eficiência de três diferentes técnicas de extração (soxhlet, micro-ondas e extração acelerada por solvente) para HTP e HPA do solo arenoso, com vistas à análise por cromatografia e espectrometria de massas. A comparação das técnicas de extração evidenciou que as características texturais do solo, a idade da contaminação e, principalmente, a fração de hidrocarbonetos de interesse, podem influenciar a eficiência de extração, resultando em superioridade desta ou daquela técnica. A técnica que apresentou melhor recuperação de HPA (equivalente a uma contaminação recente) foi o soxhlet. Para HTP, a fração de n-alcanos foi mais bem recuperada por ASE e as frações HRP e MCNR apresentaram recuperações similares nas técnicas soxhlet e MARS.

A avaliação da toxicidade demonstrou que solos biorremediados geraram alta toxicidade em exposição por períodos curtos. E exposições por períodos mais longos resultaram em toxicidade subletal e com efeitos deletérios quanto ao crescimento, reprodução e genotoxicidade. Esse fato deve-se à presença de HTP, assim como de HPA de alto peso molecular (estes, os mais recalcitrantes). Uma interpretação adicional baseia-se no fato de que subprodutos da biodegradação dos hidrocarbonetos podem ser mais tóxicos do que os compostos originais presentes em contaminações recentes.

Nesse sentido, os ensaios ecotoxicológicos, se mostram como uma importante ferramenta para avaliar a qualidade de áreas remediadas e a eficiência das técnicas de descontaminação se observando a necessidade da introdução desses estudos nas normas e legislações vigentes para solos no Brasil.

Fica demonstrada que a combinação das análises químicas e biológicas, utilizando organismos bioindicadores como as minhocas, constitui-se em uma abordagem mais completa na avaliação de áreas contaminadas e serve como embasamento mais adequado para a avaliação de risco e da eficácia real da tecnologia de remediação que venha a ser aplicada, tendo em vista que nem sempre a redução dos compostos contaminantes de interesse é acompanhada por uma redução na toxicidade, podendo haver inclusive o aumento da mesma.

5. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

- Ampliar o número de bioindicadores, com vistas a uma avaliação mais abrangente da ecotoxicidade dos solos biorremediados. Uma estratégia recomendável no caso de estudos em áreas contaminadas seria a seleção de espécies presentes nas imediações da área de interesse;
- Utilização de outros biomarcadores como inibição de enzimas e teste cometa para uma avaliação mais completa dos efeitos crônicos aos quais as minhocas estão expostas;
- Tendo em vista o número relativamente reduzido de bioindicadores para solo, a produção de lixiviados para testes em matriz líquida pode ser uma estratégia adotada;
- O tratamento por biorremediação com o uso de surfactantes que resultasse em menores teores remanescentes de compostos de alto peso molecular auxiliaria a identificação dos principais responsáveis pela toxicidade dos solos biorremediados.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). *Toxicological profile polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)*, Department of Health and Human Service, Public Health Service, Atlanta, 1995. Disponível em: <[HTTP://www.atsrd.cdc.gov/toxiprofiles](http://www.atsrd.cdc.gov/toxiprofiles)> Acessado em: 25/02/12.

AGUIAR, C.R.C. *Desempenho de soja e braquiária na fitorremediação de solos contaminados com petróleo*, 2006, 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Faculdade de Engenharia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

ALVES, S.D. *Estudo comparativo da sensibilidade de dois organismos expostos a efluentes líquidos*, 2010, 129 p., Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Faculdade de Engenharia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

AN, Y.J. Assessing soil ecotoxicity of methyl tert-butyl ether using earthworm bioassay: closed soil microcosm test for volatile organic compounds. *Environmental Pollution*, v. 134, p. 181-186, 2005.

ANDRADE, V.T. *Avaliação de toxicidade de água produzida tratada por processo evaporativo com a finalidade de reuso em solo*, 2009, 164 p., Tese (Doutorado em Engenharia Química), COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados com petróleo e seus derivados, *Eclética Química*, São Paulo, v. 35, n. 3, p.17-43, 2010.

ANDREA, M.M.D. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos, *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), n. 2, p. 95-107, 2010.

ARAUJO, R.P.A. *Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo*, 2005, 283p, Tese (Doutorado em Ciências na área de Ecologia), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). *Standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with lumbricid earthworm Eisenia foetida*, Standard Designation E1676-95, 1995.

AZEVEDO, F.A. & CHASIN, A.A.M. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*, São Paulo, Ed. Rima, 2003, 340p.

BAIRD, C. *Química Ambiental*, 2ª Ed. Porto Alegre, Ed. Bookman, 2002.

BARROS, D.D. *Avaliação da ecotoxicidade de solos contaminados por hidrocarbonetos*, 2007, 62p., Monografia (Graduação em Engenharia Química), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

BIGORGNE, E.; COSSU-LEGUILLE, C.; BONNARD, M.; NAHMANI, J. Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm, *Chemosphere*, v. 80, p. 1109-112, 2010.

BONNARD, M.; EOM, I.C.; MOREL, J.L.; VASSEUR, P. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia foetida*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 50, p. 60-67, 2009.

BRESOLA, R.C. *Avaliação de toxicidade de mananciais em áreas degradadas pela mineração com a utilização do bioindicador Scenedesmus subspicatus e implementação de metodologia de toxicidade com o peixe Danio rerio popular "Zebrafish"*, 2007, 84p., Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental), Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. *Aquatic ecotoxicology: fundamentals concepts and methodologies*, 2 ed., Boca Raton, Ed. CRC Press, Boca Raton, 1989, 320 p.

BUCH, A.C. *Pontosclex corethrurus (Müller, 1857), e Eisenia andrei, Bouché 1972, como bioindicadoras de solos contaminados com agrotóxicos*, 2010, 64p., Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba.

CALISI, A; LIONETTO, M.G.; SCHETTINO, T. Polutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 1369-1377, 2009.

CANADIAN SOIL QUALITY GUIDELINES – *Carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): Environmental and human health effects*, Canadian Council of Ministers of the Environmental, Vancouver, 2008, 229p.

CANTELLI, K.B. *Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural*, 2011, 43p., Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba.

CASSARET, L.J.; AMDUR, M.O.; KLAASSEN, C.D.; DOULLS, J. *Cassaret and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, 7th Ed, Kansas, Ed. McGraw Hill, 2008, 1331p.

CAVALCANTI, V.A. *Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando Chironomus xanthus e Daphnia similis*, 2010, 78p., Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

CECCANTI, B.; MASCIANDARO, G.; GARCIA, C.; MACCI, C.; DONI, S. Soil Bioremediation: combination of earthworms and compost for ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil, *Water, Air and Soil Pollution*, v. 177, p. 383-397, 2006.

CESAR, R.G.; EGLER, S.G.; POLIVANOV, H.; CASTILHOS, C.Z.; RODRIGUES, A.P.C.; ARAUJO, P.C. Biodisponibilidade de metilmercurio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*, *Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ*, v.31-2, p.33-41, 2008.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O. *Biorremediação de solo argiloso contaminado com hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel*, 2007, 184p., Tese (Doutorado em Geociências), Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CHAINEAU, C.H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J.F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. Bioremediation of crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessment, *Water, Air and Soil Pollution*, v.144, p. 419-440, 2003.

CHEN, C.; ZHOU, Q.; LIU, S.; XIU, Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia foetida* exposed to polycyclic musks, *Chemosphere*, v. 83, p. 1147-1154, 2011.

CIANELLA, R.C. *Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado com diesel B5*, 2010, 182p., Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). *Análise Estatística de Resultados de Testes de Toxicidade Aguda*, São Paulo, 1992.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Decisão da diretoria nº 195-2005-E, de 23 de Novembro de 2005 – *Dispõe sobre valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo e dá outras providências*, São Paulo, 2005.

COIMBRA, M.A.C. *Avaliação dos resultados analíticos de hidrocarbonetos como instrumento jurídico em casos de derrame de petróleo: mangue de Bertioga*, 2006, 110p., Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica), Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 420, de 28 de Dezembro de 2009 – *Dispõe sobre critérios e valores orientadores da qualidade do solo quanto a presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas*, Brasil, 2009.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de Maio de 2011 – *Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de Março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA*, Brasil, 2011.

CORDEIRO, L.F. *Avaliação da toxicidade aguda de Irgarol 1051 e Diuron sobre o copépodo calanóide Arcatia tonsa*, 2008, 31p., Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas.

CORREIA, F.V. & MOREIRA, J.C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 85, p. 264-268, 2010.

CORTET, J.; VAUFLERYA.G.D.; POINSOT-BALAGUER, N.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects, *Eur. J. Soil. Biol.*, v. 35, n. 3, p.115-134, 1999.

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

COTELLE, S. & FÉRARD, J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 34, p. 246-255, 1999.

DAWSON, J.J.C.; GODSIFF, E.J.; THOMPSON, I.P.; RALEBITSO-SENIOR, T.K.; KILLHAM, K.S.; PATON, G.I. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbons impacted soils, *Soil Biology & Biochemistry*, v. 39, p.164-177, 2007.

DI MARZIO, W.D.; SAENZ, M.E.; LEMIÈRE, S.; VASSEUR, P. Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 46, p. 246-252, 2005.

DI PAOLO, C. *Aplicação de ensaio cometa a estudos de danos ao DNA de robalos, Centropomus parallelus (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona*, 2006, 103p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Oceanografia Biológica), Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

DITTBRENNER, N.; SCHMITT, H.; CAPOWIEZ, Y.; TRIEBSKORN, R. Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology, *J. Soil Sediments*, v. 11, p. 1000-1010, 2011.

DOMÍNGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) e *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) diferente biological species?, *Pedobiologia*, v. 49, p. 81-87, 2005.

DORN, P.B.; VIPOND, T.E.; SALANITRO, J.P.; WISNIEWSKI, H.L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox and plants, *Chemosphere*, v. 37, n. 5, p.845-860, 1998.

DORN, P.B.; SALANITRO, J.P. Temporal Ecological Assessment of Oil Contaminated Soils Before and After Bioremediation, *Chemosphere*, v.40, p. 419-426, 1999.

DUTCH STANDARD SOIL QUALITY, 2009. Disponível em: <<http://www.contaminatedland.co.uk/std-guid/dutch-l.htm#KEYWORD-FOUR>> Acessado em: 25/01/2012.

EDWARD, C.A.; BOHLEN, P.J. The Effects of Contaminants on the Structure and Function of Soil Communities. *Acta Zool. Fenn.*, v.196, p.284-289, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). *Manual de Métodos de Análise de Solos*, 2ª ed, Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisas de Solo, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). *O solo*. Disponível em: <http://cnpab.embrapa.br/solo>. Acessado em 22 de Agosto de 2012.

ENVIRONMENTAL PROTECY AGENCY UNITED STATES (USEPA). *Method 3540C – Soxhlet extraction*, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECY AGENCY UNITED STATES (USEPA). *Method 3545 – Pressurized fluid extraction (PFE)*, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECY AGENCY UNITED STATES (USEPA). *Method 3535 – Solid-phase extraction (SPE)*, 1996.

EOM, I.C.; RAST, C.; VEBER, A.M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67, p.190-205. 2007.

EYAMBE, G.S.; GOVEN, A.J.; FITZPATRICK, L.C.; VENABLES, B.J.; COOPER, E.L. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies, *Laboratory animals*, v. 25: 61-67, 1991.

FARIA, F.D.; GONÇALVES, D.S.; VASCONCELOS, A.P.D. Determinação quantitativa da distribuição dos hidrocarbonetos de petróleo e frações pesadas por cromatografia gasosa, *Boletim Técnico da Petrobrás*, v. 52, n.1/3, p.89-97, Rio de Janeiro, 2009.

FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowel*, *Chemosphere*, v. 56, p.457-463, 2004.

FERREIRA, V.R. *Otimização de protocolo analítico para extração e fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em sedimentos*, 2010, 75p., Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba.

GUERIN, T.F. The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from Clay soil using sonication and a soxhlet procedure: a comparative study, *J. Environ. Monit.*, v.1, p. 63-67, 1999.

GUIMARÃES, A.A. *Eisenia fetida* ou *andrei*?, *Jornal da Minhoca*, v. 53, 2006.

HAMADA, N. *Ensaio de toxicidade empregados na avaliação de efeitos no sistema de tratamento de esgotos e efluentes, ETE Suzano, e seu entorno, utilizando organismos aquáticos*, 2008, 75p., Dissertação, (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

HANNA, S.H.S. & WEAVER, R.W. Earthworm survival in oil contaminated soil, *Plant and Soil*, v. 240, p.127-132, 2002.

HARMEL, V.C. *Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente Vibrio fischeri para análise da qualidade de águas superficiais*, 2004, 100p., Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau.

HIRMANN, D.; LOIBNER, A.P.; BRAUN, R.; SZOLAR, O.H.J. Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils, *Chemosphere*, v.67, p.1236-1242, 2007;

HOBOLD, V. *Avaliação de metodologias para análise toxicológica utilizando algas do tipo Scenedesmus subspicatus e Daphnia magna*, 2007, 104p., Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental), Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma.

HODGSON, E. *A textbook of modern toxicology*, 3rd Ed, New Jersey, Editora Wiley-Interscience, 2004, 584p.

HOMA, J.; STÜRZENBAUM, S.R.; MORGAN, A.J.; PLYTYCZ, B. Disrupted homeostasis in coleomocytes of *Eisenia fetida* and *Allolobophora chlorotica* exposed dermally to heavy metals, *European Journal of Soil Biology*, v. 43, p. 273-280, 2007.

HUBALEK, T. VOSÁHLOVÁ, S.; MATEJU, V.; KOVÁCOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.52, p.1-7, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 11268-1. *Soil Quality: effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1. Determination of acute toxicity using soil substrate*, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 11268-2. *Soil Quality: effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2. Determination of effects on reproduction*, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 17512-1. *Soil Quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behavior. Part 1. Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*, 2008.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC *Monograph Volume 92 – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, p. 754-773, 2000. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr> Acessado em: 15/01/12;

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.D.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

JEFFERIES, I.R.; AUDSLEY, E. A Population Model for Earthworm *Eisenia foetida*. *Earthworms*. In: EDWARDS, C.A.; NEUHAUSER, E.F (Eds), *Waste and Environmental Management*, Ed. SBP Academic Publishing, 1988, p.119-134.

JUNIOR, O.F. *Distribuição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos na região catarinense: comparação entre metodologias de extração e avaliação do impacto ambiental*, 2006, 76p., Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau.

KOCI, V.; MOKOVÁ, K.; KULOVANÁ, M.; VOSÁHLOVÁ, S. Phytotoxicity tests of solid wastes and contaminated soils in the Czech Republic, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 17, p.611-623, 2010.

KOLESNIKOVAS, C. *Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial*, 2006, 250p., Tese (Doutorado do Programa de Pós Graduação em Recursos Minerais e Hidrologia), Instituto de Geociências (IG) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

LEET, J.K.; RICHARDS, S.M. Genetic Ecotoxicology. In: SANTOS, E.B. *Ecotoxicology Research Developments*, Ed. Nova Science Publishers, 2009, 340p.

LEPSCH, I.G. *Solos – Formação e conservação*, 1ª Ed., São Paulo, Ed. Melhoramentos, 1993, 216p.

LIONETTO, M.G.; CALISI, A.; SCHETTINO, T. Earthworms biomarkers as tools for soil pollution assessment, *Soil Health and Land Use Management*, v.16, p.305-331, 2012.

LOPES, P.R.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; DOMINGUES, R.F.; BIDÓIA, E.D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricants oils, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 84, p. 454-458, 2010.

LOUREIRO, S.; FERREIRA, A.L.G.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, A.J.A. Evaluation of the toxicity of two soils from Jales Mine (Portugal) using aquatic bioassays, *Chemosphere*, v. 61, p. 168-177, 2005.

LOURENÇO, J.I.; PEREIRA, R.O.; SILVA, A.C.; MORGADO, J.M.; CARVALHO, F.P.; OLIVEIRA, J.M.; MALTA, M.P.; PAIVA, A.A.; MENDO, S.A.; GONÇALVES, F.J. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides, *Journal of Hazardous Materials*, v.186, p. 788-795, 2011.

MAGALHÃES, D.P. & FERRÃO-FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos, *Oecologia Brasilienses*, v.12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANERIKAR, R.S.; APTE, A.A.; GHOLE, V.S. In vitro and in vivo genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.25, p. 63-68, 2008.

MANZO, S.; NICOLA, F.D.; PICIONE, F.D.L.; MAISTO, G.; ALFANI, A. Assessment of the effect of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests, *Chemosphere*, v.71, p.1937-1944, 2008.

MARIANO, A.P. *Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel*, 2006, 162p., Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro.

MARQUES, M. Phytoremediation. In: Proceedings of Kalmar Eco-Tech'05: Waste to Energy, Bioremediation and Leachate Treatment, v. 1, 2005, Kalmar, p. 19-26.

MARQUES, M.; ROSA, G.S.; AGUIAR, C.C.R. Plants with potential for phytoremediation of oil-contaminated soil based on germination and biomass growth. In: Proceeding of the 4th NATO/CCMS Workshop on Management of Industrial Toxic Waste, Ioannina, 2006.

MARTINS, L.R.R. *Métodos de ensaio de toxicidade em organismos aquáticos*, [S.l, s.n], 2010. Disponível em: <http://pessoal.utfpr.edu.br/luciaregi/> Acessado em: 04/04/12.

MEIER, J.R.; CHANG, L.W.; JACOBS, S.; TORSELLA, J.; MACKES, M.C.; SMITH, M.K. Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.16, n. 5, p.928-938, 1997.

MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, *Oecologia Brasilienses*, v. 11, n. 2, p.188-201, 2007.

MILLIOLI, V.S. *Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo*, 2009, 200p., Tese, (Doutorado em Ciências), Escola de Química (EQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

MOLINA-BARAHONA, L.; VEJA-LOYO, L.; GUERRERO, M.; RAMÍREZ, S.; ROMERO, I.; VEJA-JARQUÍN, C.; ALBORES, A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after bioremediation process, *Wiley Periodicals Inc.*, p. 100-109, 2005.

NETO, A.C.N. *Avaliação da toxicidade aguda e crônica em águas do rio Jundiaí e em afluentes e efluentes da ETE Novo Horizonte, Jundiaí, São Paulo*, 2009, 75p.,

Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEM), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

NETTO, A.D.P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica, *Química Nova*, v. 23, n. 6, p.765-773, 2000.

NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem, *Chemosphere*, v.41, p. 1115-1123, 2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guideline for testing of chemicals n° 207: Earthworm acute toxicity test*, 1984.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guideline for testing of chemicals n° 222: Earthworm reproduction test*, 2004.

OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*, 3ª Ed., São Paulo, Editora Atheneu, 2008, 474p.

PASSARELLI, M.C.; RODRIGUES, F.B.; SANTOS, A.R.; CORTEZ, F.S.; CÉSAR, A. Avaliação comparativa de distintas metodologias aplicadas em testes de toxicidade com ouriço-do-mar empregando fase sólida (interface sedimento-água), *Revista Ceciliansa*, v.1, n.2, p.166-169, 2009.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo, *Cadernos de referências ambientais*, v. 12, 246 p, Salvador, 2002.

PEREIRA, P.F.S. *Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru*, 2008, 233p., Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. (PETROBRÁS). Disponível em: www.petrobras.br
Acessado em: 20 de Maio de 2012.

PLATTE, E.B.; AMIGO, A.A.; OLIVEIRA, F.F.d.; RIBEIRO, G.F. Avaliações da toxicidade e da biodegradabilidade do fluorene R2 (fluoresceína), *Comunicação Técnica BIO n° 12/2002*, CENPES/PDB/BIO, Rio de Janeiro, 2002.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation, *Chemosphere*, v. 59, p. 289-296, 2005.

PLYTYCZ, B.; KLIMEK, M.; HOMA, J.; TYLKO, G.; KOLACZKOWSKA, E. Flow cytometric measurement of neutral red accumulation in earthworm coleomocytes:

novel assay for studies on heavy metals exposure, *European Journal of Soil Biology*, v.43, p. 116-120, 2007.

PRICE, R.C.; SAMBASIVAM. Bioremediation of Petroleum Wastes from the Refining of Lubricants oils. *Environmental Progress*, v.12, p. 5-11, 1993.

QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V.L.; SOUZA, D.R.C.D. Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo, *Documentos Embrapa Meio Ambiente*, v.79, Jaguariúna, 2009, 15p.

RAMOS, A.S. *Eisenia foetida* como bioindicador na avaliação da toxicidade de solos contaminados por óleo cru e solos biorremediados, 2007, 96p., Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

REGINATTO, V. *Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga Scenedesmus subspicatus para o estudo de efluentes industriais*, 1988, 137p. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

REID, B.J.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soil and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment, *Environ. Pollut.*, v. 108, p. 103-112, 2000.

RESGALLA Jr., C. & LAITANO, K.S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil, *Notas Téc. Facimar*, v.6, p. 153-163, 2002.

RIBERA,D.; NARBONNE, J.F.; ARNAUD, C.; SAINT-DENIS, M. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p.1123-1130, 2001.

RILA, J.P.; HUND-RINKE, K.; PFEIFER, F.; DOTT, W.; EISENTRAEGER, A. Validation of microplate bioassays for the assessment of contaminated and remediated sites, *J. Soils & Sediments*, v.3, n.4, p.273-283, 2003.

RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U.; SANTOS, R.L.C.; SOBRAL, L.G.S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorretores, *Tecnologia Ambiental (CETEM)*, v. 37, Rio de Janeiro, 2006, 76p.

RODRIGUES, N.L.V.B. *Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A – não inertes e classe II B – inertes*, 2005, 123p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba.

ROSA, G.S. *Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo*, 2006, 160p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

SAIM, N.; DEAN, J.R.; ABDULLAH, Md. P.; ZAKARIA, Z. Extraction of PAHs from Contaminated Soil Using Soxhlet Extraction Pressurized and Atmospheric MAE, SFE and ASE. *J. Chromatogr. A*, v. 791, p. 361-366, 1997.

SATERBAK, A.; TOY, R.J.; MCMAIN, B.J.; WILLIAMS, M.P.; DORN, P.B. Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.11, p.2643-2652, 2000.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: evaluation of different test systems in soil toxicity assessment, *J. Soil & Sediments*, v.3, n.2, p.79-84, 1998.

SEABRA, P.N.C. *Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo*, 2005, 183p., Tese (Doutorado em Ciências na área de Engenharia Química), COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

SFORZINI, S., BOERI, M., DAGNINO, A., OLIVERI, L.; BOLOGNESI, C.; VIARENGO, A. Genotoxicity assessment in *Eisenia Andrei* coelomocytes: a study of induction of DNA damage and micronuclei in earthworm exposed to B[a]P and TCDD spiked soils, *Mutation Research*, v.746, p.35-41, 2012.

SHIN, K.H. & KIM, K.W. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia foetida*), *Environmental Monitoring and Assessment*, v.70, p.93-103, 2001.

SILVA, G. *Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado – escala piloto*, 2010, 144p., Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

SILVA, M.G. *Biorremediação de solo contaminado por petróleo por diferentes técnicas de bioestimulação*, 2007, 115p, Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Departamento de Geociências, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande.

SISSINO, C.L.; MOREIRA, J.; BULUS, M.; RIZZO, A. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos, *Nota Técnica ao Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.1, n.2, p.41-44, 2006.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.; LUCHINI, L.C. ANDREA, M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. *Embrapa Meio Ambiente. Documentos 42*, Jaguariúna, 2004, 29p.

SPURGEON, D.J.; SVENDSEN, C.; RIMMER, V.R.; HOPKIN, S.P.; WEEKS, J.M. Relative sensitivity of life-cycle and biomarkers responses in four earthworm species exposed to zinc, *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.7, p.1800-1808, 2000.

TRINDADE, P.V.O. *Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo*, 2002, 127p. Dissertação (Mestrado em Química), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Development of Risk based Clean-up Goals for Hydrocarbons – Contaminated Soils*. Houston, 1998.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview, *Pure Appl. Chem.*, v.73, n.7, p.1163-1172, 2001;

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques, *Analytica Chimica Acta*, v. 602, p.211-222, 2007.

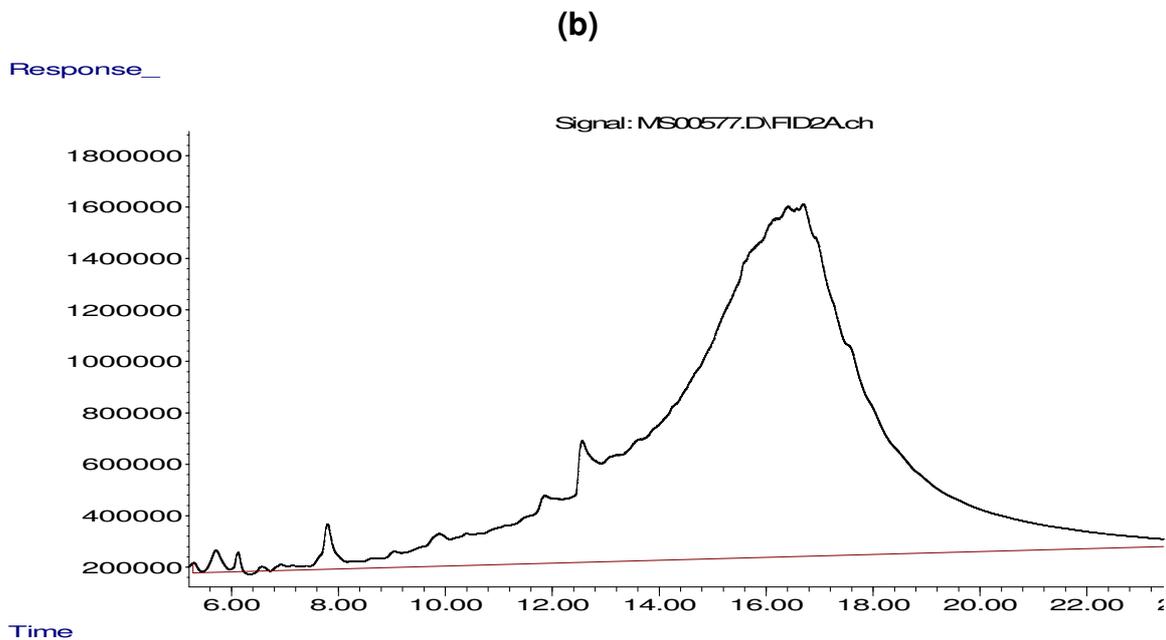
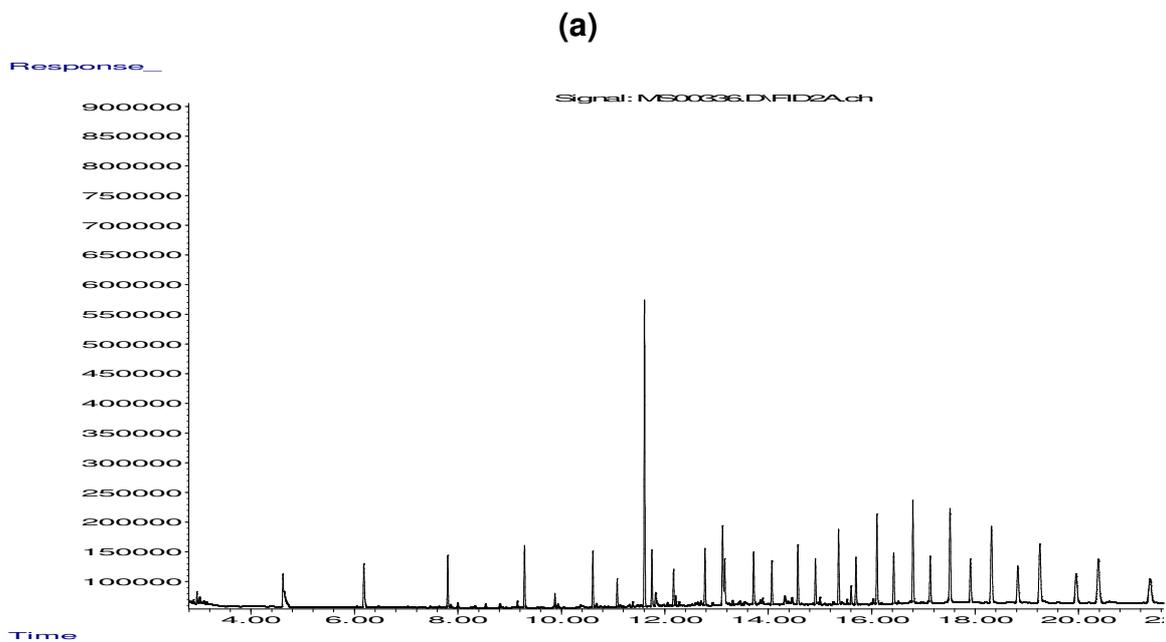
WOLFF, C.M. *Alterações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas de Mentha villosa (LAMIACEAE) cultivada em solo contaminado com petróleo e o seu uso na fitorremediação*, 2011, 96p., Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

WU, S.; ZHANG, H.; ZHAO, S.; WANG, J.; LI, H.; CHEN, J. Biomarker responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to phenanthrene and pyrene both singly and combined in microcosms, *Chemosphere*, v.87, p. 285-293, 2012.

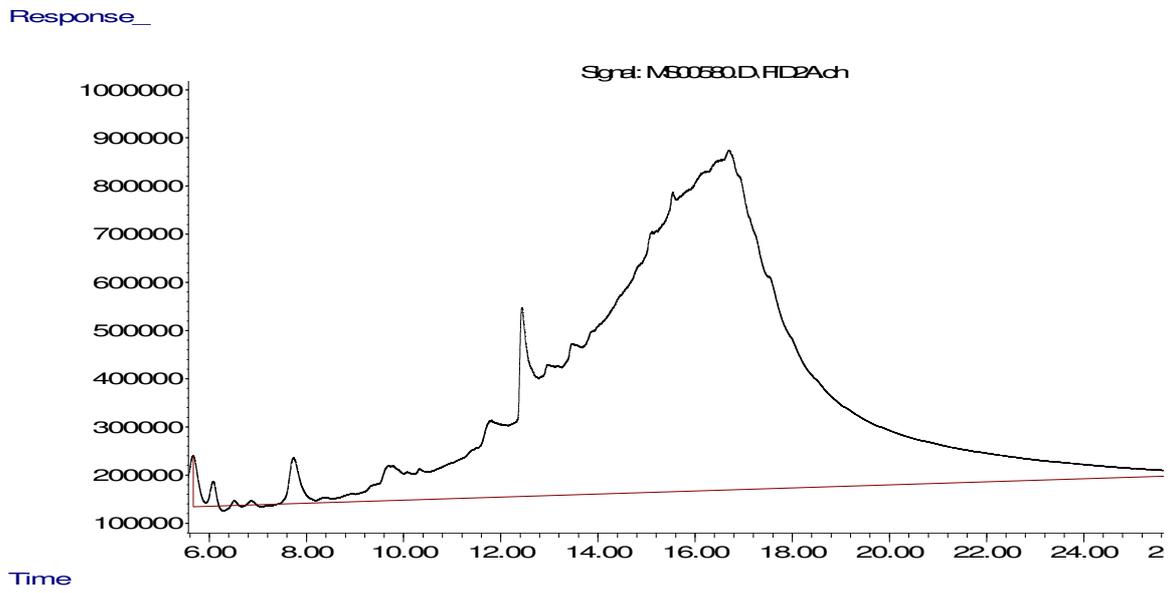
ZANG, Y.; ZHONG, Y.; LUO, Y.; KONG, Z.M. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*, *Environmental Pollution*, v.108, p.271-278, 2000.

ZHU, J.; ZHAO, Z.Y.; LU, Y.T. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm, *Journal of Environmental Sciences*, v. 18, n.6, p.1210-1215, 2006.

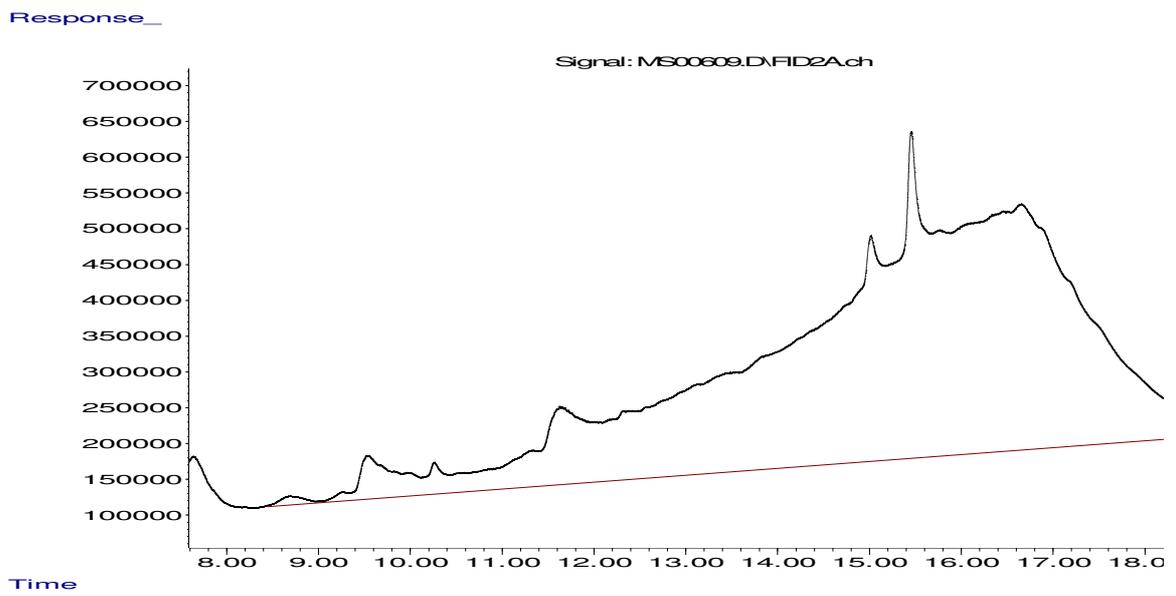
APÊNDICE A - Análises cromatográficas de HTP e HPA resultantes de diferentes técnicas de extração (Soxhlet, MARS, ASE) realizadas no LABIFI.



(c)



(d)



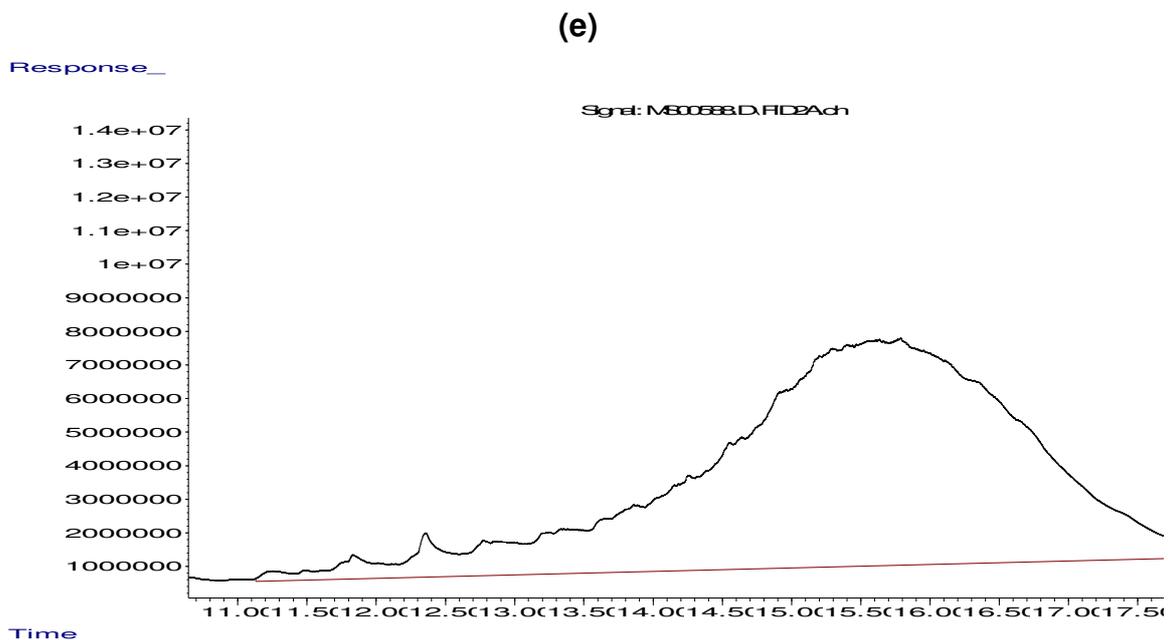
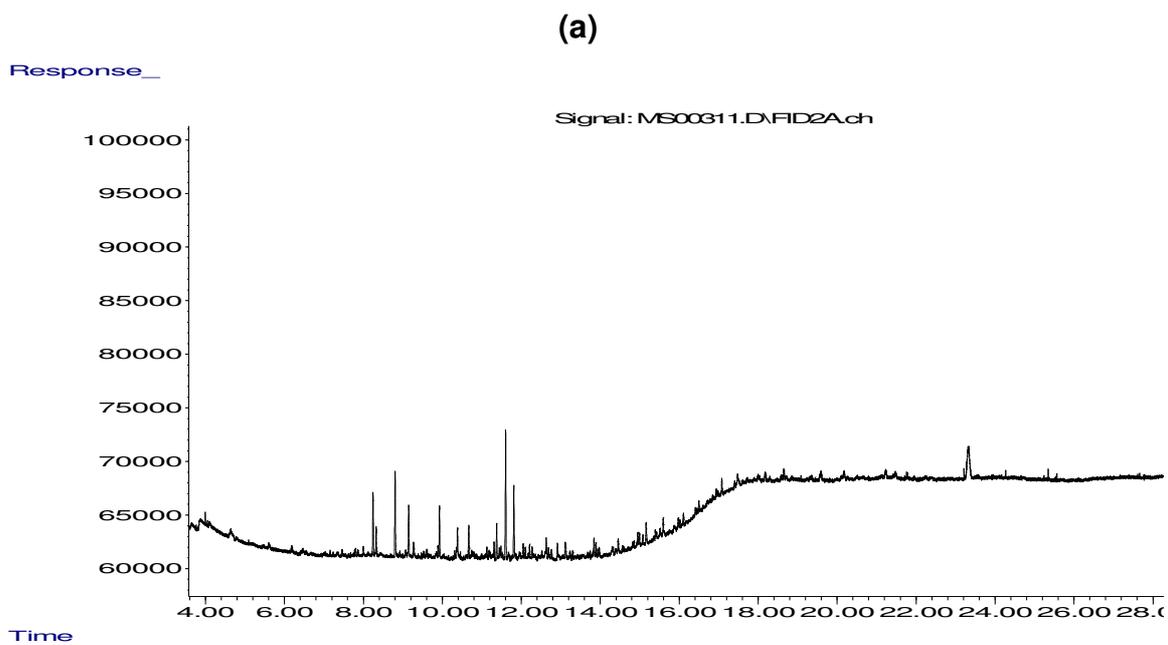
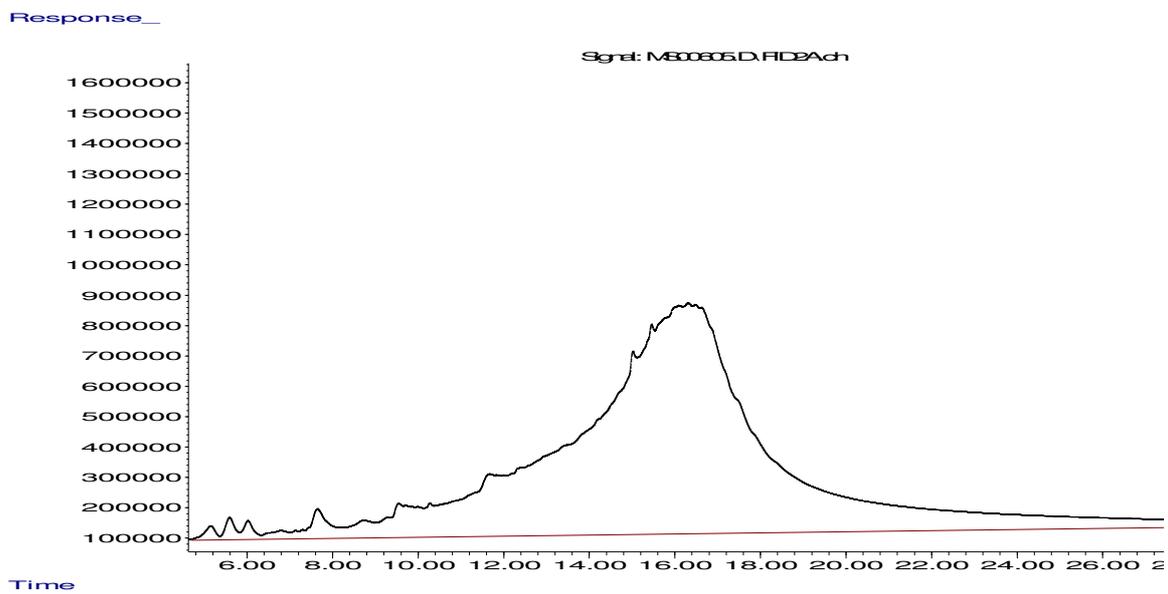


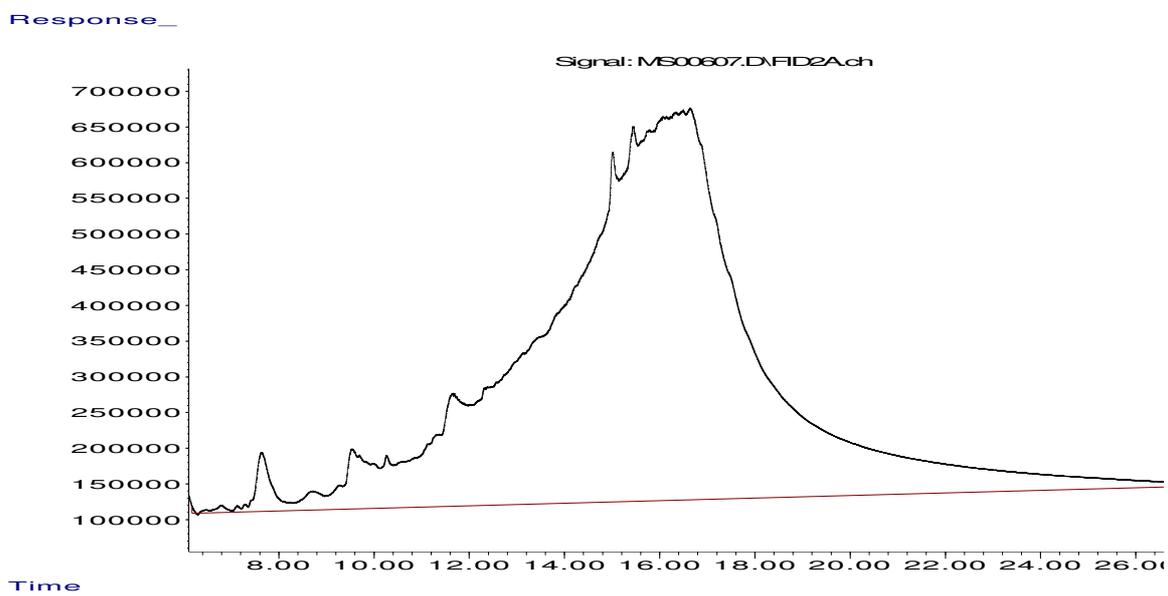
Figura 29: Cromatogramas das análises de HTP extraídas pela técnica do soxhlet para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA₁, (d) BIOA₂ e (e) OLU.



(b)



(c)



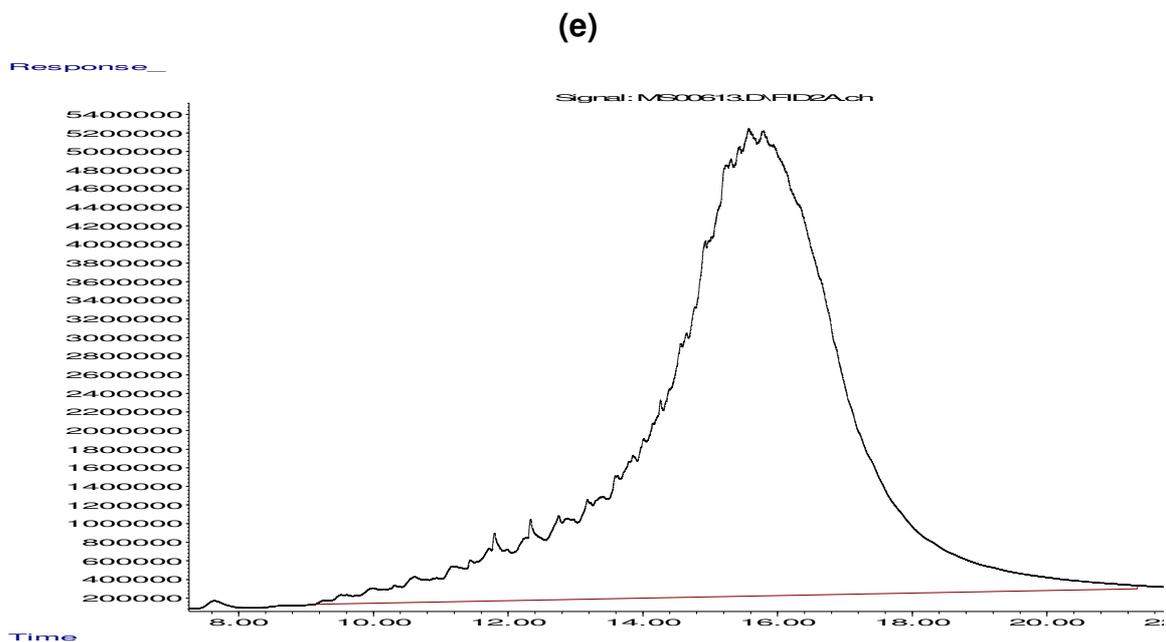
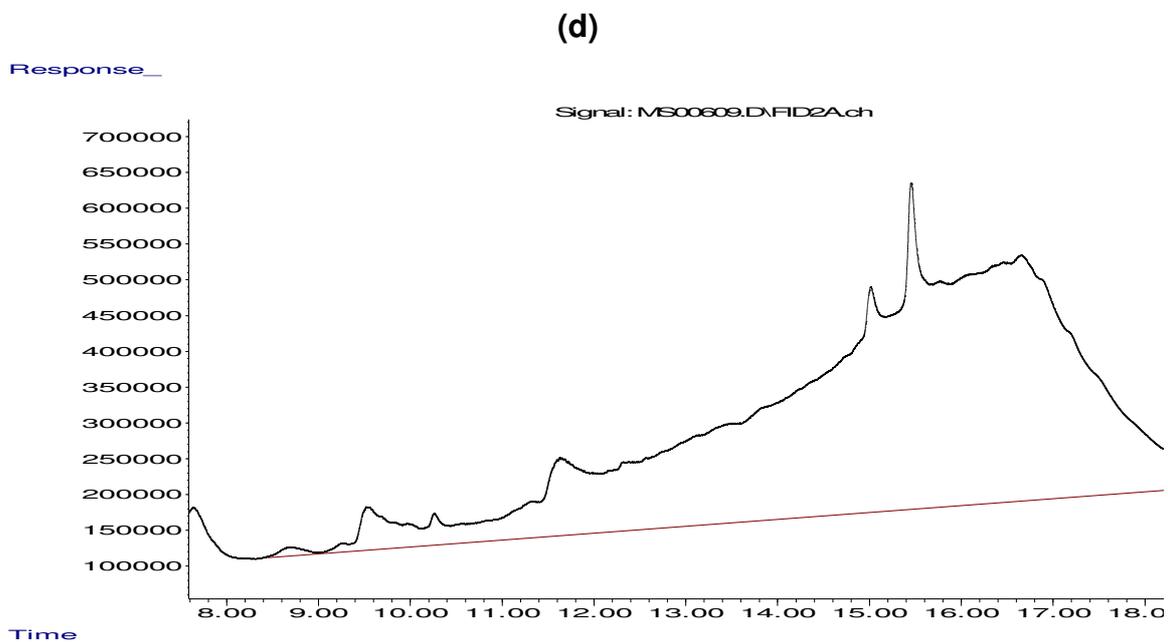
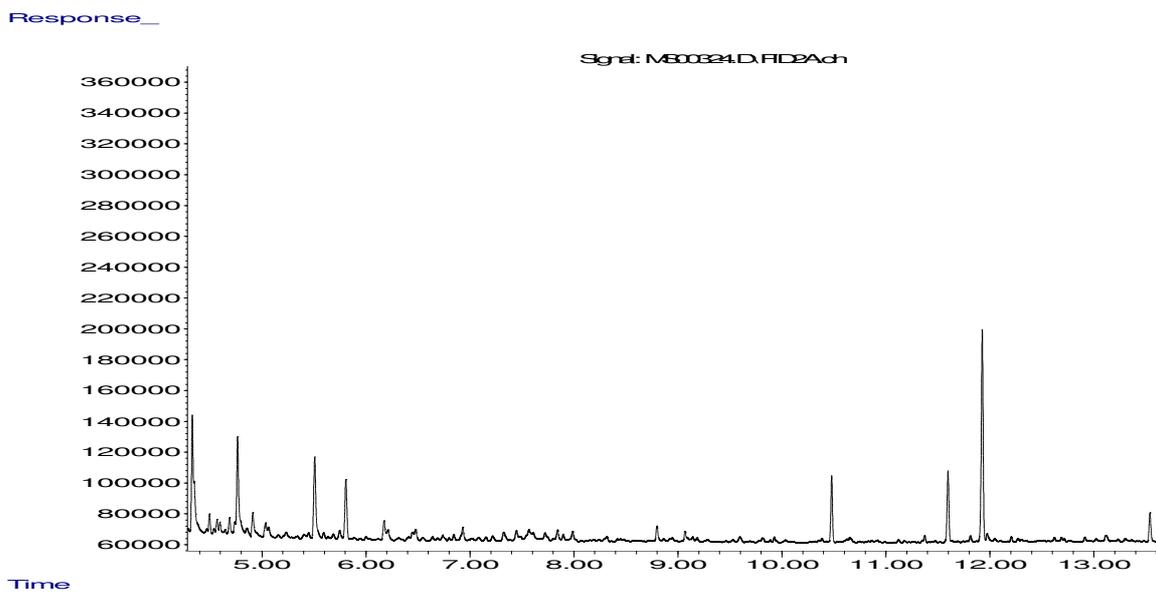
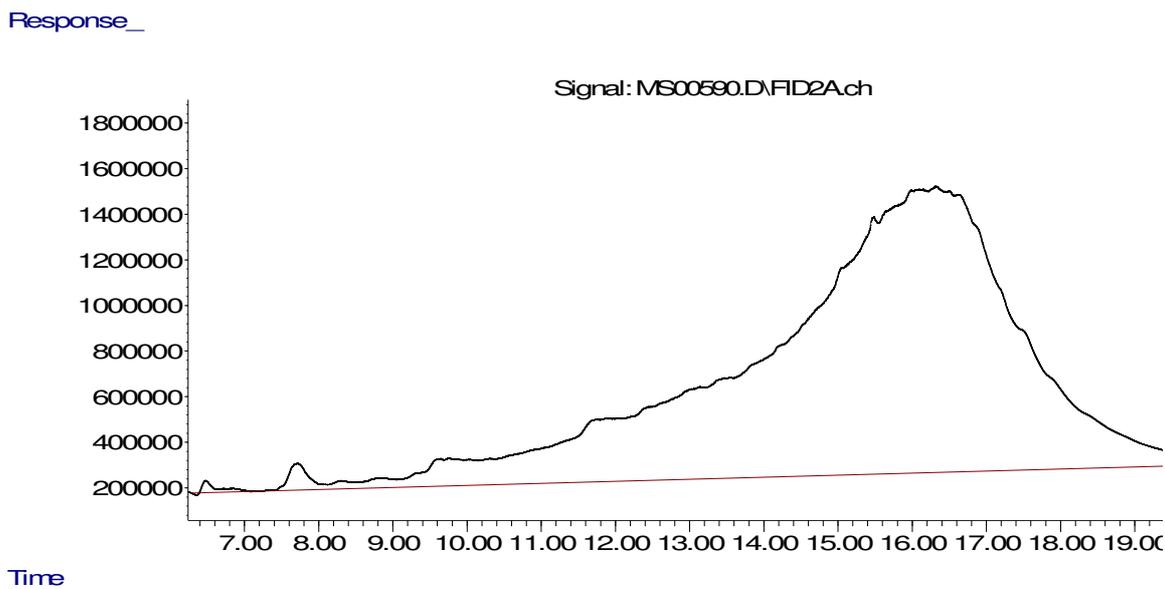


Figura 30: Cromatogramas das análises de HTP extraídas pela técnica do micro-ondas (MARS) para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA₁, (d) BIOA₂ e (e) OLU.

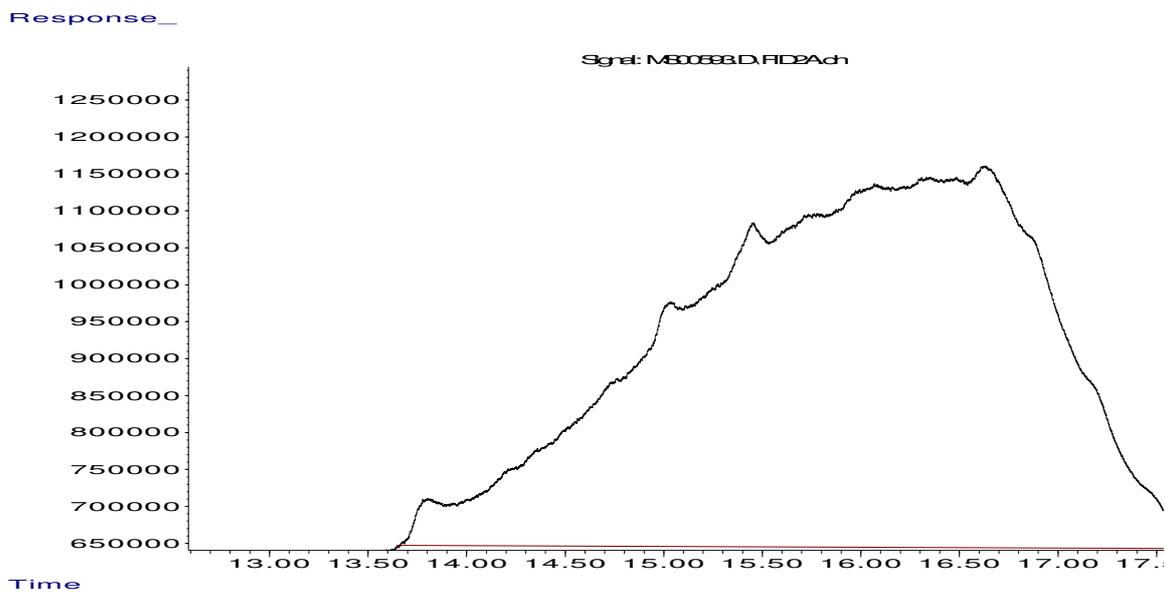
(a)



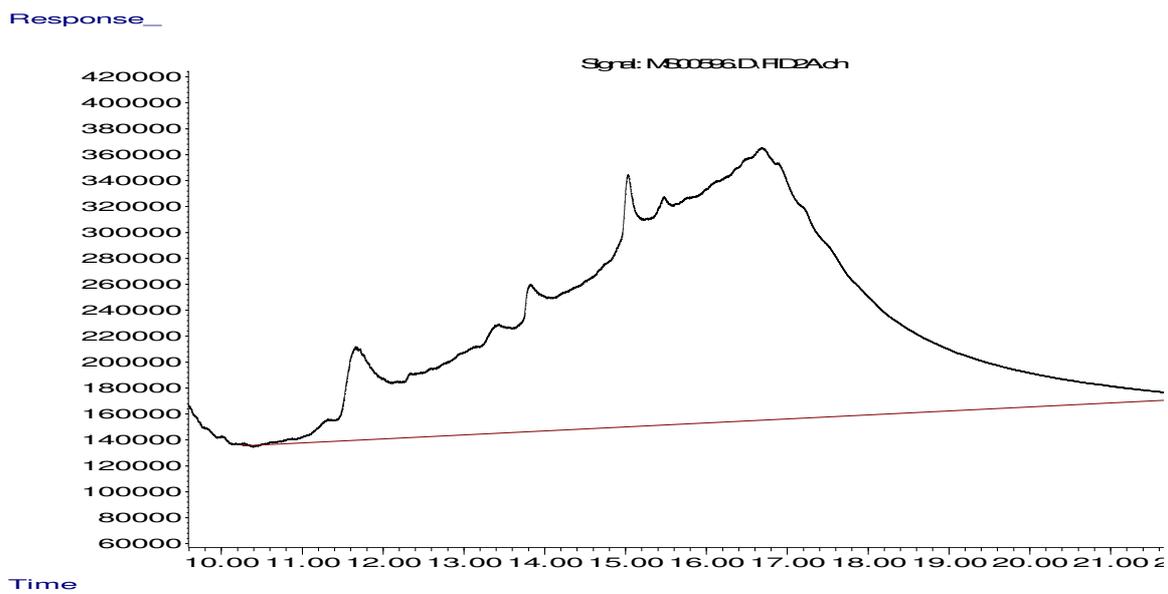
(b)



(c)



(d)



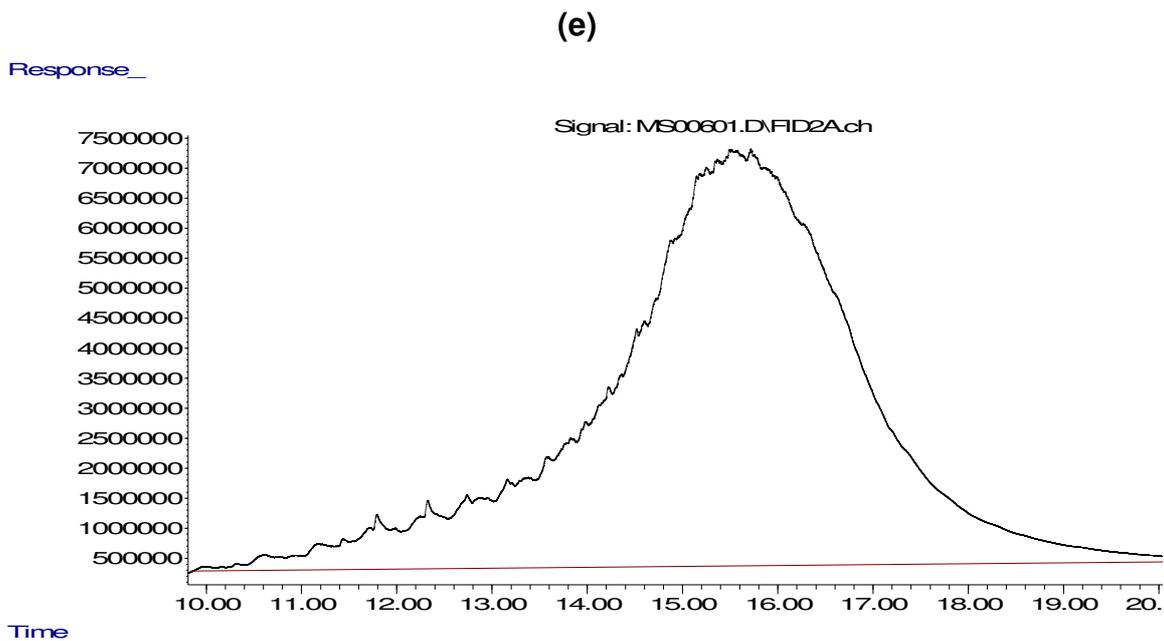
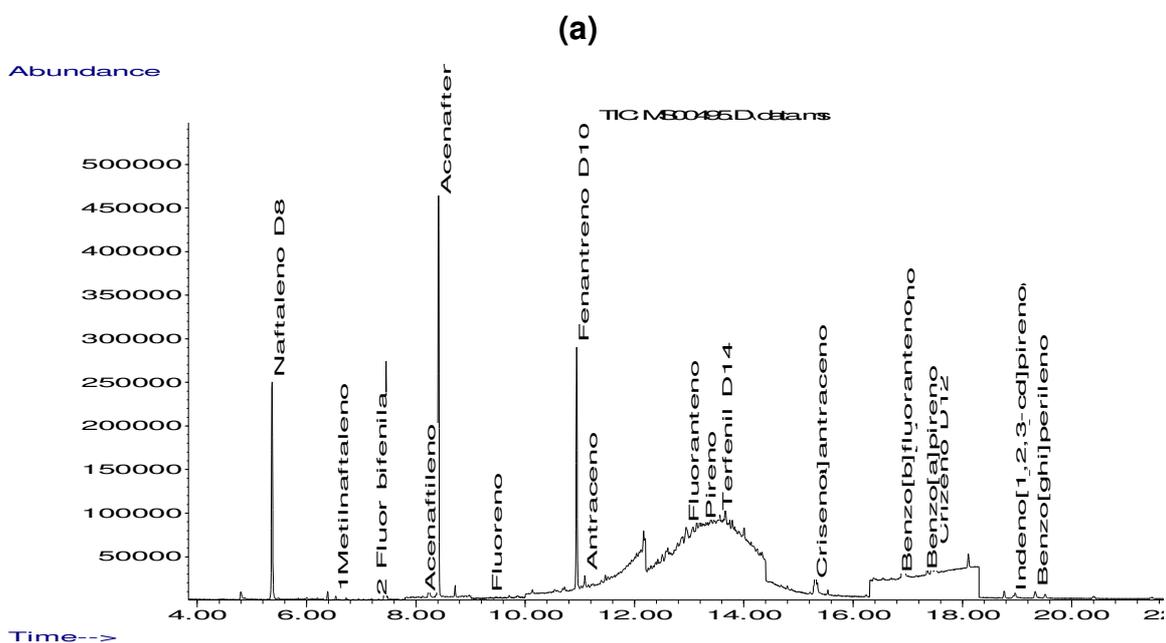
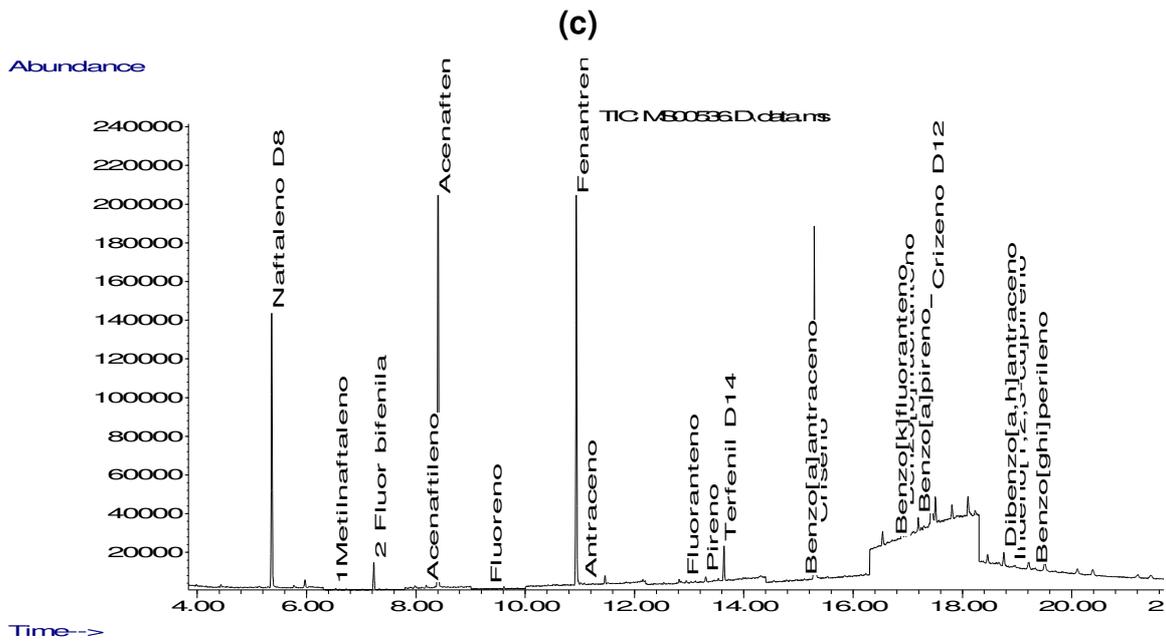
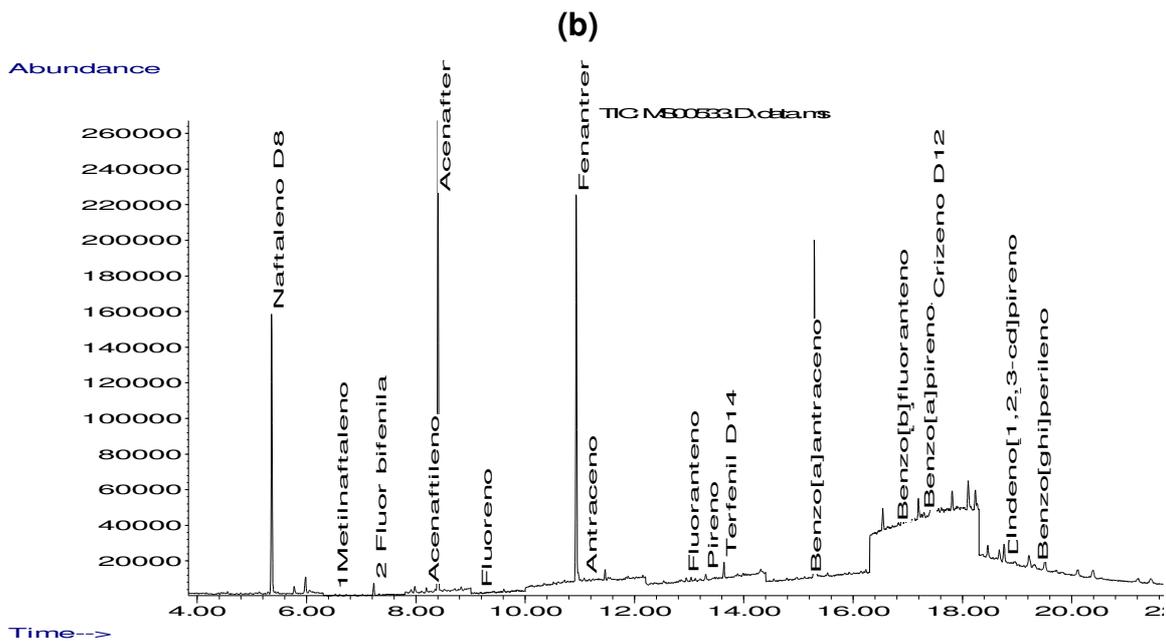


Figura 31: Cromatogramas das análises de HTP extraídas pela técnica de extração acelerada por solvente para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA₁, (d) BIOA₂ e (e) OLU.





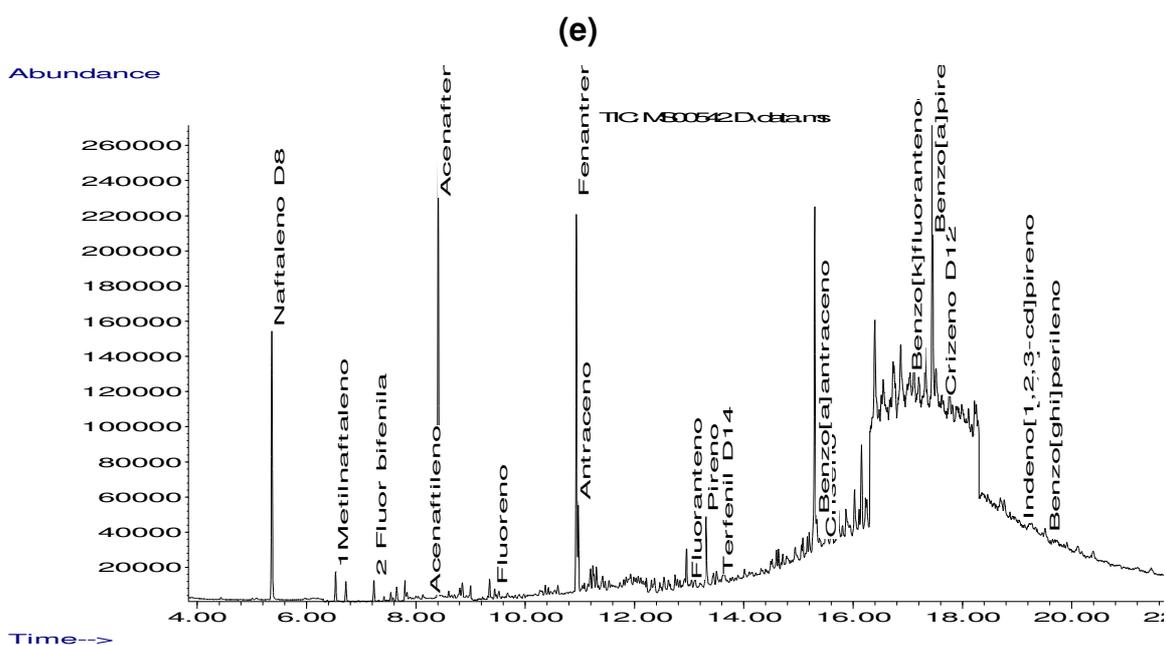
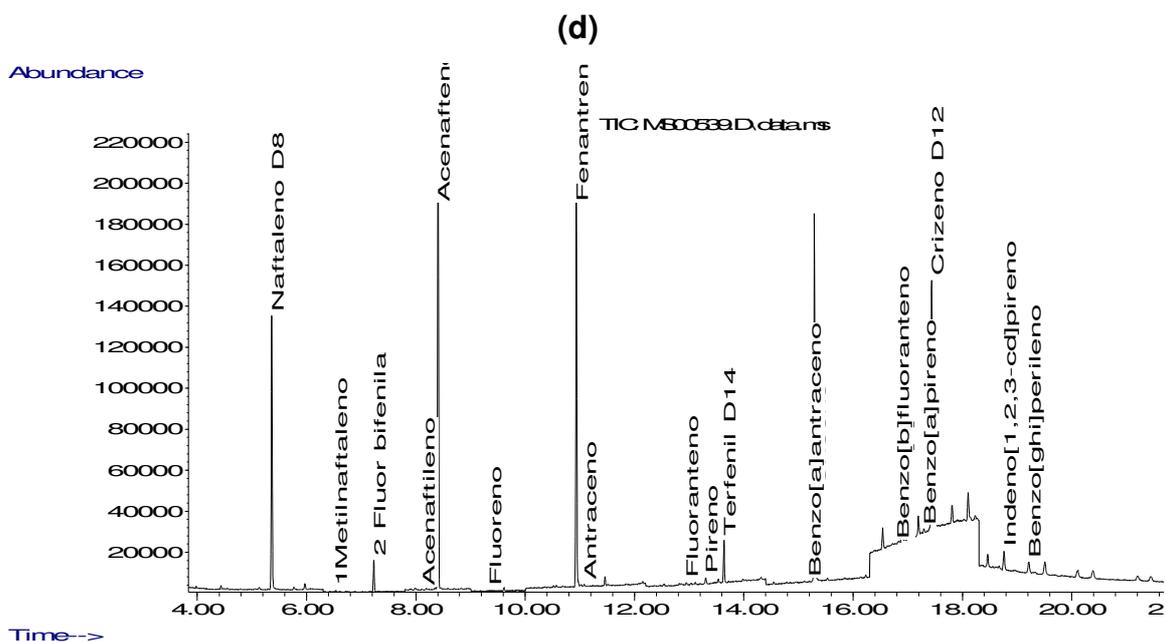
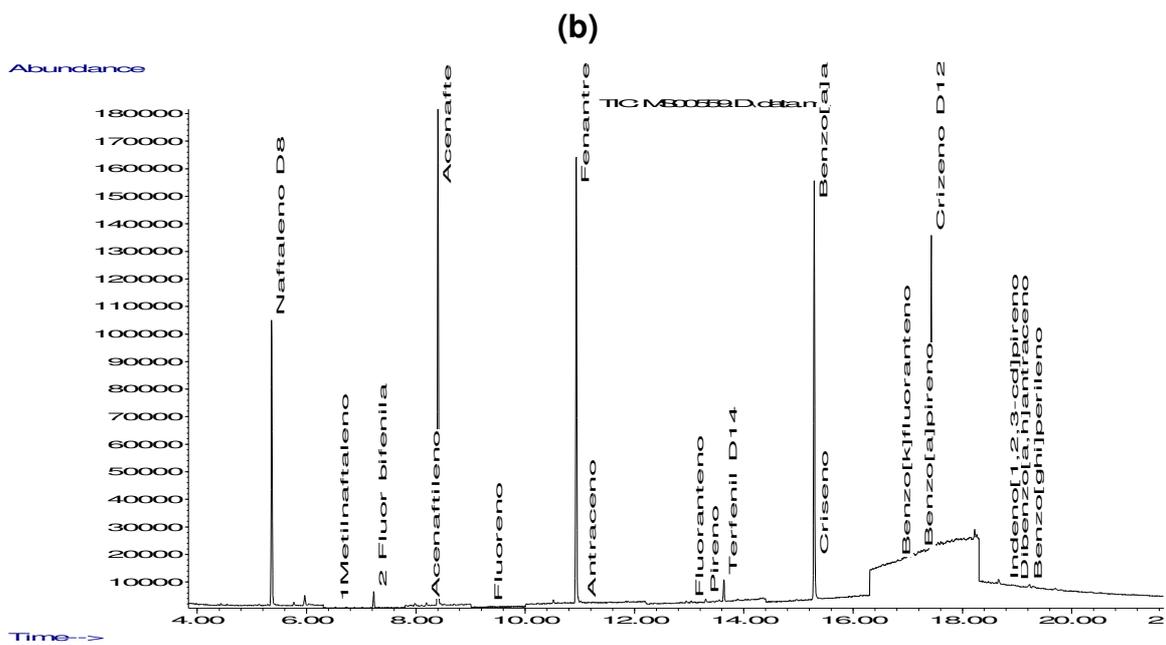
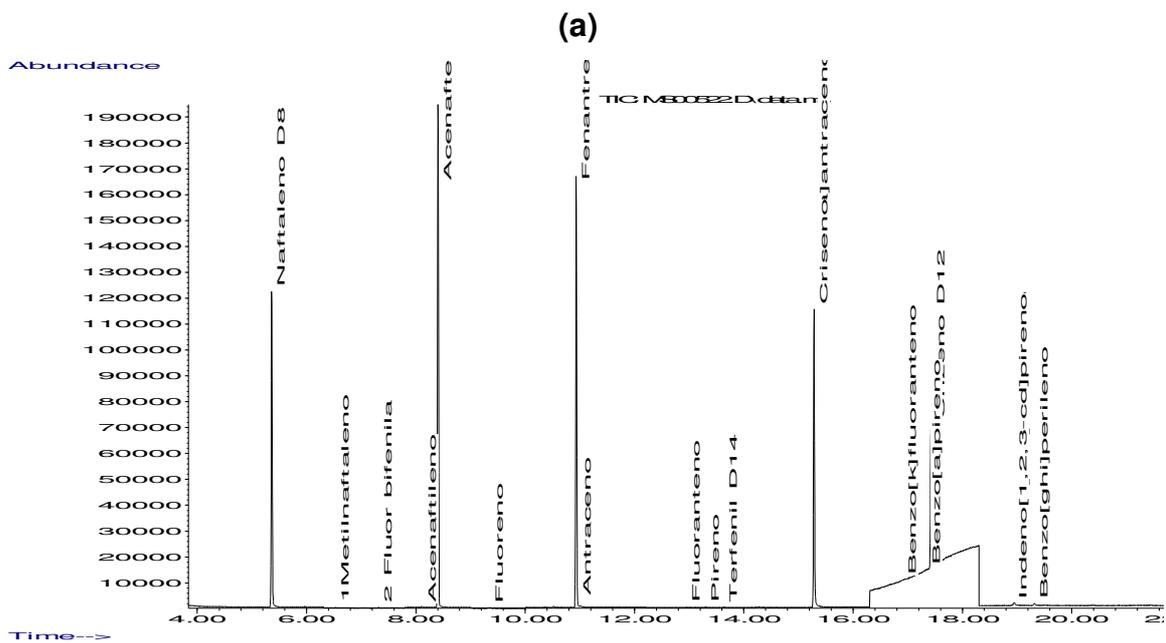
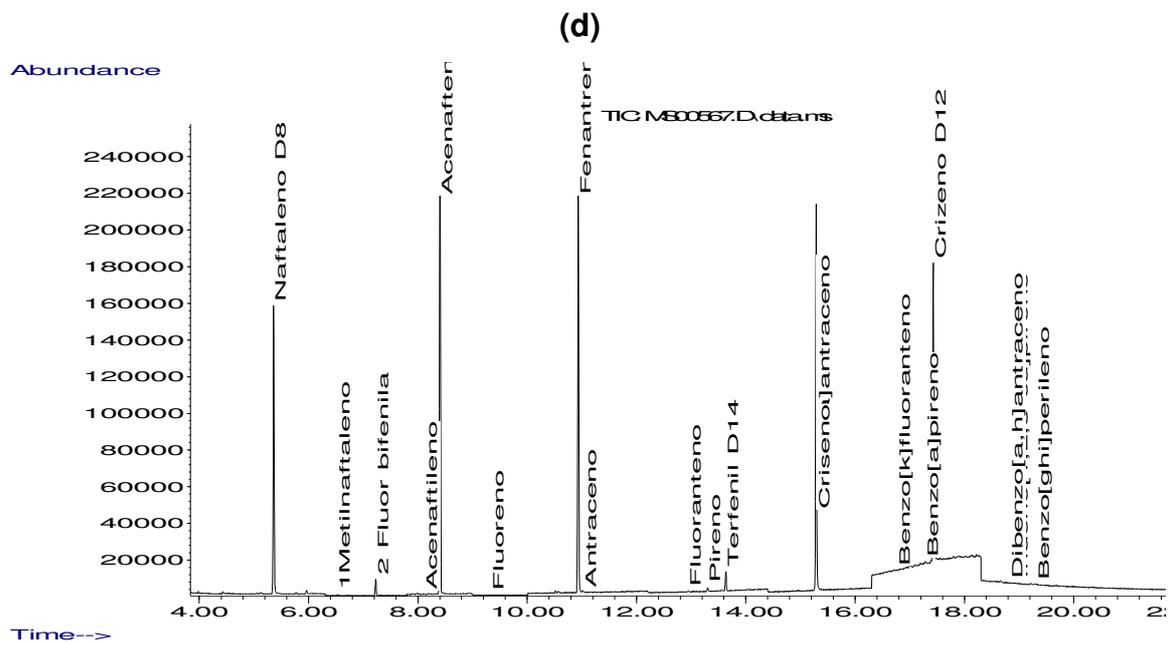
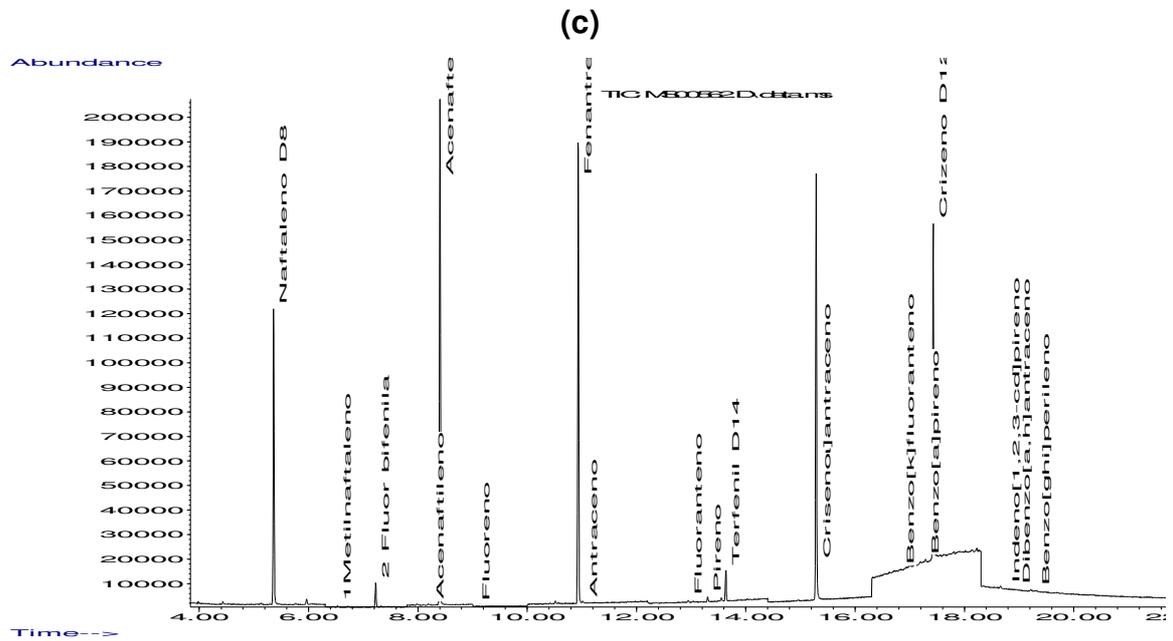


Figura 32: Cromatogramas das análises de HPA extraídas pela técnica soxhlet (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA₁, (d) BIOA₂ e (e) OLU.





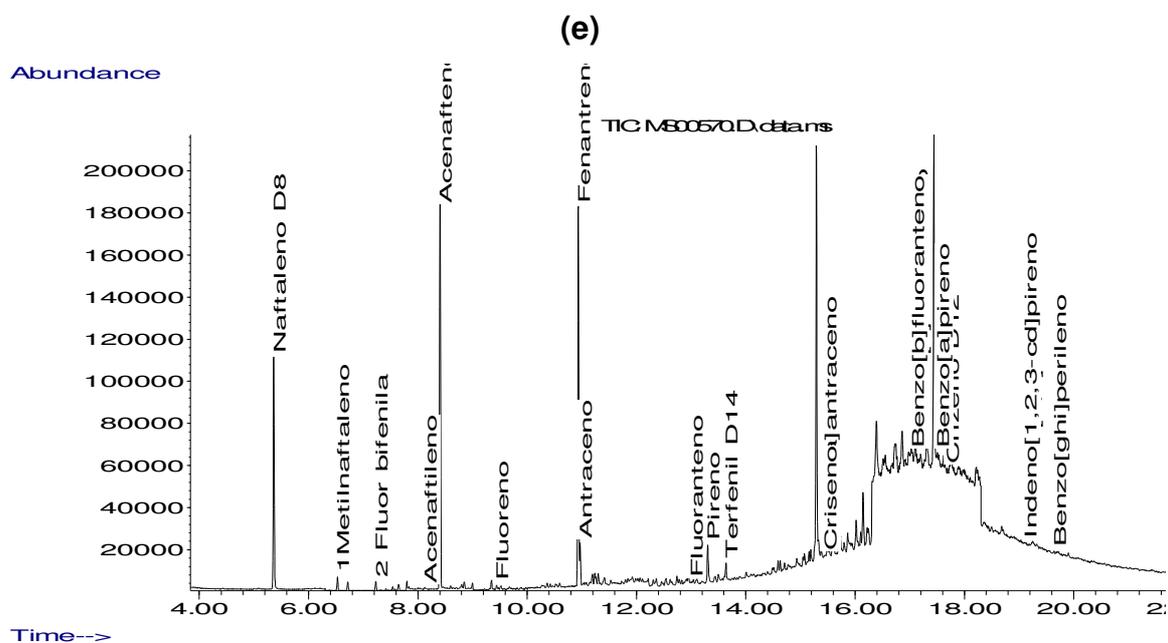
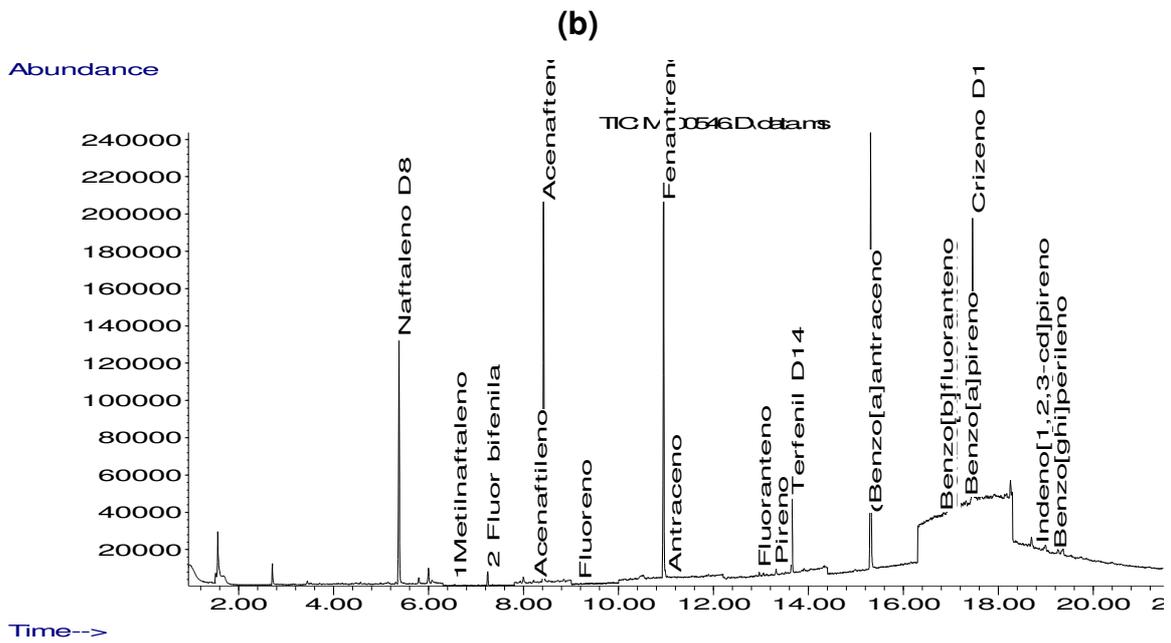
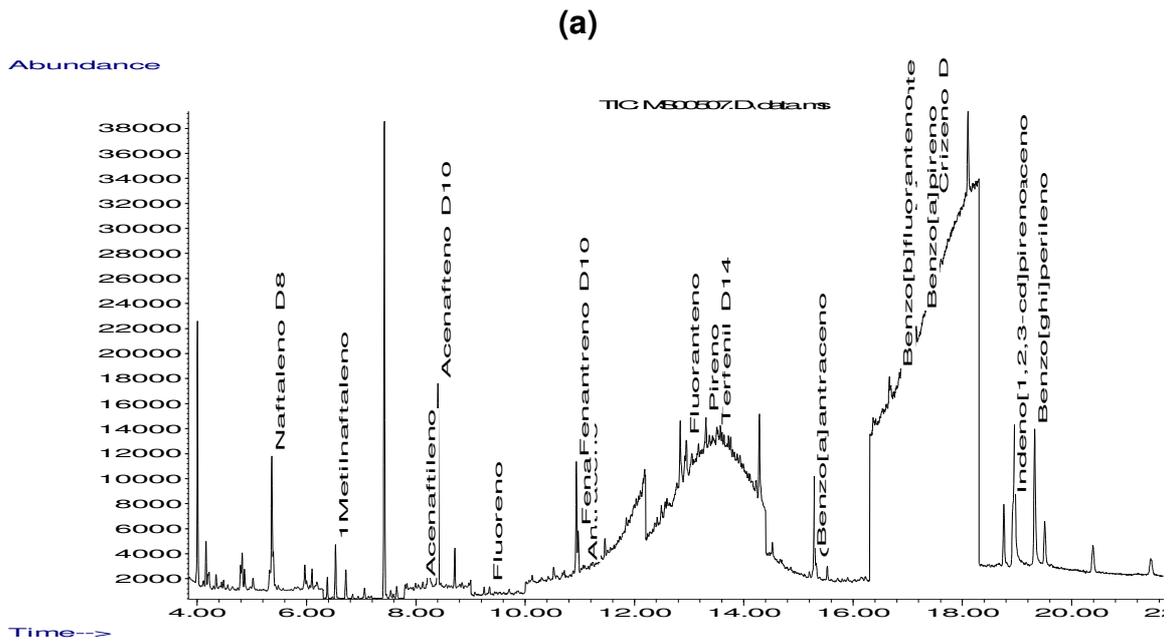
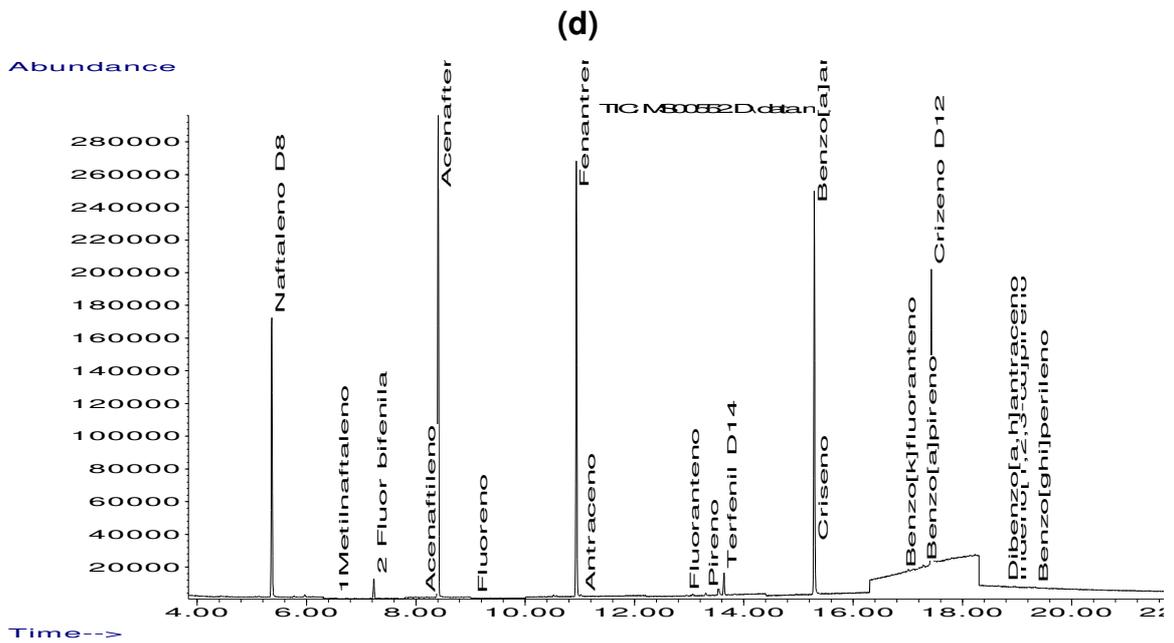
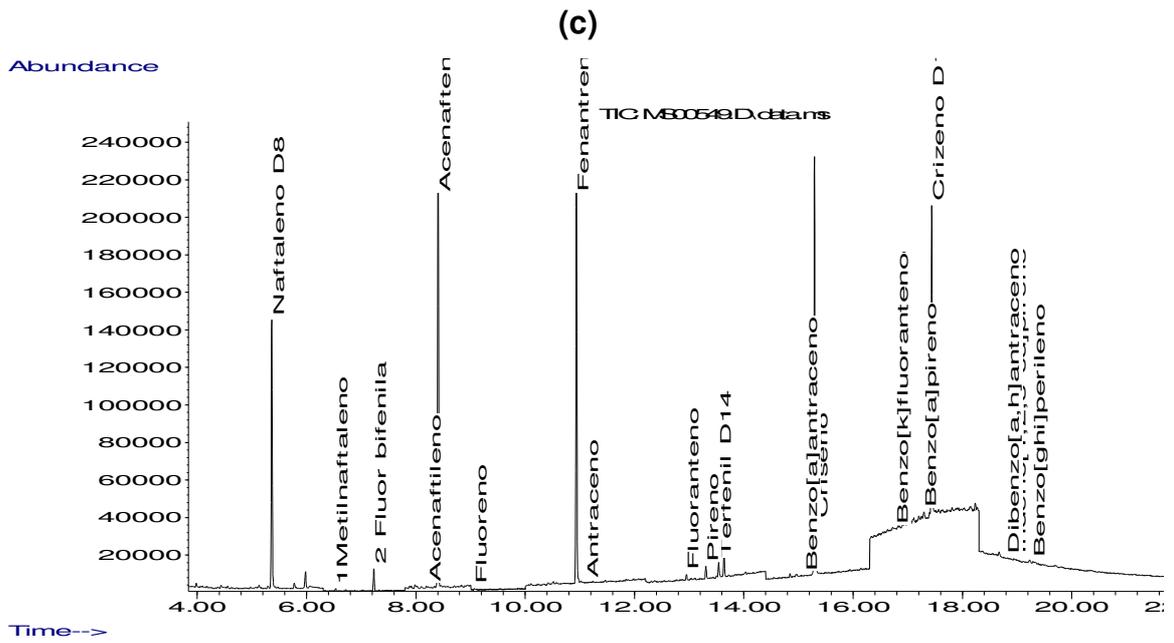


Figura 33: Cromatogramas das análises de HPA extraídas pela técnica do micro-ondas (MARS) para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA₁, (d) BIOA₂ e (e) OLU.





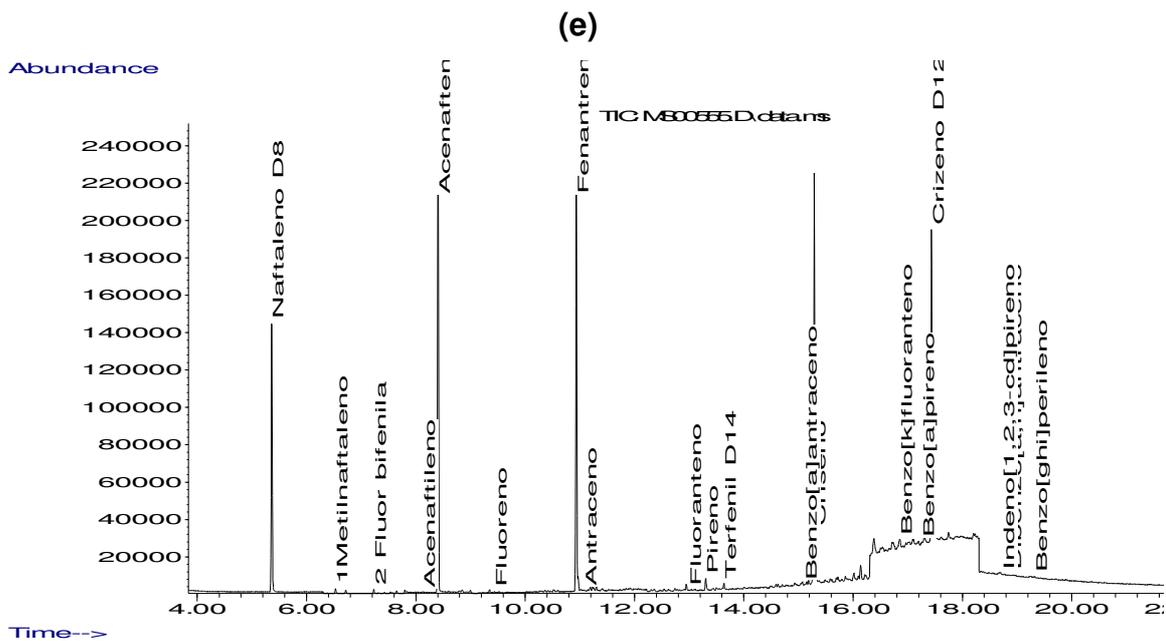


Figura 34: Cromatogramas das análises de HPA extraídas pela técnica de extração acelerada por solvente para os solos (a) CONT, (b) BIOS, (c) BIOA₁, (d) BIOA₂ e (e) OLU.

APÊNDICE B - Análise estatística da LC50 de *E. Andrei* para a substância de referência 2-cloroacetamida através do método Probit utilizando o software Minitab 15

----- 31/03/2012 08:24:41 -----

Welcome to Minitab, press F1 for help.

Executing from file: C:\Program Files\Minitab 15\English\Macros\Startup.mac

This Software was purchased for academic use only.

Commercial use of the Software is prohibited.

Distribution Plot

Probit Analysis: N. de afetadas; N. de minhocas versus Log da conc.

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
N. de afetadas	Event	30
	Non-event	20
N. de minhocas	Total	50

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Standard			
	Coef	Error	Z	P
Constant	0,0735116	0,304329	0,24	0,809
Log da conc.	0,352602	0,479912	0,73	0,463
Natural Response		0		

Log-Likelihood = -33,379

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	28,9568	3	0,000

Deviance 39,8374 3 0,000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

	Standard	95,0% Normal CI		
Parameter	Estimate	Error	Lower	Upper
Mean	-0,208483	1,10477	-2,37380	1,95684
StDev	2,83606	3,86004	0,196871	40,8553

Table of Percentiles

95.00%

	Standard	Fiducial CI		
Percent	Percentile	Error	Lower	Upper
1	-6,80614	9,97275	*	*
2	-6,03303	8,92205	*	*
3	-5,54252	8,25562	*	*
4	-5,17353	7,75442	*	*
5	-4,87338	7,34684	*	*
6	-4,61791	7,00001	*	*
7	-4,39391	6,69598	*	*
8	-4,19335	6,42383	*	*
9	-4,01094	6,17638	*	*
10	-3,84304	5,94866	*	*
20	-2,59537	4,25927	*	*
30	-1,69571	3,04713	*	*
40	-0,926990	2,02322	*	*
50	-0,208483	1,10477	*	*
60	0,510024	0,510203	*	*
70	1,27875	1,16226	*	*
80	2,17840	2,32544	*	*
90	3,42607	3,99960	*	*
91	3,59397	4,22636	*	*
92	3,77638	4,47291	*	*
93	3,97694	4,74421	*	*
94	4,20094	5,04742	*	*
95	4,45642	5,39347	*	*
96	4,75656	5,80028	*	*
97	5,12555	6,30071	*	*
98	5,61607	6,96634	*	*
99	6,38917	8,01613	*	*

APÊNDICE C - Estudo Comparativo de Técnicas de Extração de HTP e HPA de solos argiloso e arenoso: Soxhlet, Micro-ondas e Extração Acelerada por Solvente

**Sanye Soroldoni Guimarães¹, Jorge Antonio Lopes², Graciane Silva³,
Marcia Marques^{1,1}**

¹*Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias-LABIFI, Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente-DESMA, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ*

²*Transpetro*

³*Estre Ambiental*

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi comparar as técnicas de soxhlet (SOX), microondas (MARS) e extração acelerada por solvente (ASE), quanto à eficiência na extração de diferentes frações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), a partir das matrizes solo arenoso e solo argiloso com contaminação antiga. Além da eficácia do método de extração, para fins comparativos foram considerados o consumo de solvente, de água e o tempo de preparo e de extração. Para extração de HTP de solo argiloso, o uso do ASE resultou em melhor recuperação dos n-alcanos e hidrocarbonetos resolvidos de petróleo-HRP; já o uso do SOX e do MARS resultou em melhor recuperação para a fração mais pesada (mistura complexa não resolvida-MCNR). Para extração de HTP de solo arenoso o uso do ASE apresentou melhor resultado para todas as frações. No caso dos HPA a extração por ASE foi a que apresentou melhor resultado, tanto para solo argiloso quanto para solo arenoso. Quanto aos outros fatores considerados (economia de solvente, água e tempo), o MARS é o método mais econômico, particularmente quando o HTP é o grupo de interesse e os n-alcanos são relativamente menos importantes. Dessa forma, em contaminações antigas, a classe textural de solo além

¹ *Corresponding author: Rua São Francisco Xavier, 524, sl 5024E, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, CEP Brasil. E-mail: marciam@uerj.br; tel: +5521-23340959.*

da fração de hidrocarbonetos de interesse em primeiro lugar e a disponibilidade de tempo/recursos financeiros além da possibilidade de recuperação do solvente em segundo lugar devem ser consideradas para a escolha do método de extração.

Palavras-chave: métodos de extração; cromatografia gasosa; solo contaminado; HTP, HPA

Abstract

The objective of this study was to compare three extraction methods (soxhlet-SOX, microwave-MARS and accelerated solvent extraction-ASE), regarding the extraction efficiency for different fractions of total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from aged-contaminated sandy and clayey soils. Besides the extraction efficiency, the methods were compared regarding consumption of solvent, water and time during preparation and extraction procedures. For extraction of n-alkanes and Resolved Petroleum Hydrocarbons-RPH fractions of TPH from clayey soil, ASE was more efficient; SOX and MARS performed better for TPH heavier fraction (Unresolved Complex Mixture-UCM). For sandy soil, ASE performed better for all fractions. In the case of PAH, ASE performed better for both clayey and sandy soil. Regarding other criteria (solvent, water and time savings), MARS was the most economic method, particularly when TPH is the group of interest and when n-alkanes are not the main focus. Therefore, regarding aged-contaminated soils, the textural class of the soil, the group of hydrocarbons of interest, in the first place and, the availability of resources and the possibility of solvent recovery in the second place should be taken into account before selecting the extraction method.

Keywords: extraction methods; gas chromatography; contaminated soil; TPH; PAH

1. Introdução

O petróleo possui compostos que, quando dispostos no meio ambiente de forma incorreta, acarreta danos à saúde e ao meio ambiente (Oga, 1998). Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) é um termo utilizado para descrever vários compostos originados do óleo cru. A determinação de HTP é frequentemente utilizada na avaliação de áreas impactadas por derramamento de petróleo (Ferreira, 2010). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos estando amplamente distribuído nos compartimentos ambientais, sendo considerados poluentes prioritários, pois são conhecidamente tóxicos e carcinogênicos (IARC, 2010; Manzo et al., 2008; Oga, 1998). A análise dos HTP e HPA nas matrizes ambientais passa, obrigatoriamente, pelo processo de extração e separação por cromatografia gasosa. Diferentes métodos são utilizados para a extração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) da matriz solo. A eficiência de uma técnica de extração depende do método de extração, da idade da contaminação, do solvente utilizado, temperatura, dentre outros fatores. Tradicionalmente, a extração de HTP e HPA de solo é realizada através da técnica de Soxhlet, pelo método 3540 US.EPA (EPA,1996), no entanto, essa técnica requer grande tempo de extração (6-24 h), consome um grande volume de solvente e pode resultar da destruição de compostos termo-lábeis (Queiroz et al., 2009; Wang et al., 2007). Nesse sentido, novas técnicas de extração vêm sendo utilizadas com o intuito de diminuir o tempo de extração e o gasto com solvente, além de manter a eficiência na extração dos compostos. Essas técnicas incluem extração assistida por micro-ondas (MARS) e extração acelerada por solvente (ASE).

A técnica de extração assistida por micro-ondas (MARS), método 3535 da U.S. EPA (EPA, 1996) envolve o uso da energia de micro-ondas para produzir condições de elevada temperatura e pressão em um recipiente fechado contendo a amostra e o solvente orgânico. Suas vantagens são o baixo uso de solvente e tempo de extração e a possibilidade de fazer várias amostras

simultaneamente. No entanto, o custo do equipamento é mediano e é necessário um treinamento mais apurado para o operador (Wang et al.200). A técnica de extração por solvente acelerado (ASE) - Método 3445, da U.S. EPA (EPA, 1996), o solvente é aquecido, pressurizado e passado pela amostra. Esse método apresenta eficácia de extração comparada ao soxhlet. Além disso, requer uma quantidade pequena de solvente e curto tempo de extração. A desvantagem é o alto custo do equipamento, além do custo pelo uso do gás nitrogênio (Ferreira, 2010). Berset et al. (1999), afirmam que uma boa técnica de extração é definida como aquela que remove a maior quantidade dos compostos de interesse, quando, para esses solos, não existirem valores de referência.

O presente trabalho tem como objetivo comparar as técnicas de extração por soxhlet, MARS e ASE para HTP e HPA em solo argiloso e arenoso com histórico de contaminação antiga em concentrações relativamente baixas, cenário comum quando uma área contaminada requer avaliação da eficácia de tecnologias de remediação aplicadas e no qual, a eficácia da extração é de grande relevância.

2. Materiais e Métodos

2.1 Solo e substâncias químicas utilizadas

Para efeitos de comparação, foram utilizadas amostras de dois tipos de solo, a saber: (i) solo proveniente de escavação de uma instalação antiga de armazenamento de petróleo e derivados, em funcionamento desde 1951, no Estado de São Paulo, classificado como Franco Argiloso (solo argiloso com contaminação antiga); (ii) solo proveniente de uma área em Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro, com histórico de contaminação identificada e quantificada em estudo anterior (Ciannella, 2010) conduzido pelo grupo de pesquisa, classificado como Planossolo Distrófico Típico (solo arenoso com histórico de contaminação, conforme Ciannella, 2010). As amostras foram

mantidas em refrigeração e para a extração inicialmente foram secas em estufa e peneiradas (2 mm).

Os solventes utilizados no processo de extração foram diclorometano (DCM) e acetona (grau pesticida marca Tedia). O sulfato de sódio anidro (marca Vetec) foi calcinado em mufla por 4 h a 600 °C e permaneceu em dessecador selado até seu uso. Toda a vidraria, peças dos equipamentos e utensílios foram limpos com DCM.

Para HTP foi utilizado Mix 1 de n-alcenos (C_{12} a C_{44}) e para HPA, foi utilizado Mix 3 com os 16 HPA (Naftaleno, Acenaftaleno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno e Benzo(g,h,i)perileno), e como padrão interno o Semivolatile Internal Standard Mix (D10 Acenaphthene, Chrysene D12, Naphthalene D8, Perylene D12, Phenanthrene D10 e 1,4-Dichlorobenzene D4), todos da marca Supelco.

2.2 Extração

As extrações foram em triplicatas para cada solo, método e grupo de hidrocarbonetos. A cada amostra destinada à análise de HPA, foram adicionados 10 µl de HPA mix3. A cada amostra destinada à análise de HTP, foram adicionados 10 µl de HTP mix1.

2.2.1 Extração com soxhlet

A extração por soxhlet foi realizada utilizando 5 g da amostra de solo adicionando-se 5 g de sulfato de sódio. A mistura era então transferida para o cartucho de celulose acoplado à coluna de extração. Em balão de fundo redondo eram vertidos 180 mL de DCM e a extração era realizada por 16 h, em temperatura de 150 °C. Após a extração, o extrato era acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL colocado sob refrigeração até a realização da análise cromatográfica.

2.2.2 Extração por micro-ondas

O equipamento utilizado para extração foi o CEM MARS *Xpress Microwave Reaction System* (CEM Corporation). A extração por MARS foi realizada com 5 g da amostra de solo através da adição de 5 g de sulfato de sódio. A mistura era vertida para um vial de teflon do próprio equipamento sendo que 25 mL de DCM eram adicionados em cada vial antes de colocá-los em ordem no carrossel localizado dentro da cavidade do forno de micro-ondas. A temperatura ia de 110 °C a 115 °C e a pressão de 50 a 150 psi com tempo de aquecimento de 10 a 20 min. Após a extração, o resfriamento ocorria em temperatura ambiente. Os vials eram então abertos e o extrato filtrado em um papel de filtro utilizando-se um piset com DCM para retirar todo o solo do vial. O extrato era acondicionado em balão volumétrico de 100 mL e colocado em ambiente refrigerado até a realização da análise cromatográfica.

2.2.2 Extração por ASE

A extração acelerada por solvente (*accelerated-solvent extraction-ASE*) utilizando-se o modelo de extrator acelerado 350 da Dionex foi realizada com 5 g da amostra de solo com adição de 5 g de sulfato de sódio. A mistura era vertida para o vial de aço do próprio equipamento. A extração era realizada com uma mistura de DCM e Acetona (1:1) a 140 °C e 1500 psi de pressão durante 7 min de aquecimento seguidos de 5 min de extração estática. Os vials eram rinsados com 17 mL da mistura de solventes e o extrato purgado por uma membrana de filtração da mesma marca do equipamento, utilizando-se N₂ pressurizado a 1550 psi. Todo o procedimento de extração durava aproximadamente 30 min. Após extração, o extrato era acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL e colocado em ambiente refrigerado até a realização da análise cromatográfica.

2.3 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram realizadas em um GC/MS Agilent (modelo 7890A) acoplado a um

espectrômetro de massas da mesma marca (modelo 5975C), com detector por ionização de chama (FID), equipado com uma coluna capilar Agilent modelo DB-1MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 μ). O gás de arraste utilizado era o Hélio na vazão de 1 mL min⁻¹, sem divisão de fluxo. O volume de injeção era de 1,0 μ l. A temperatura do injetor era de 290 °C. A quantificação das amostras foi realizada através de padronização externa, tendo como referência a metodologia da U.S. EPA 8000.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram analisados utilizando-se como referência o método 8015 da U.S. EPA. As análises foram realizadas no mesmo cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, com detector de eixo triplo, equipado com coluna capilar marca Agilent modelo DB-5MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 μ). O gás de arraste utilizado também foi o Hélio na mesma vazão de 1 mL min⁻¹, sem divisão de fluxo (splitless). A temperatura do injetor era de 290 °C. O volume de injeção foi de 1,0 μ l. Os HPA foram determinados pelo monitoramento do íon seletivo (SIM).

2.4 Variáveis adicionais utilizadas na comparação dos métodos de extração

Para a escolha do melhor método de extração, além da (i) eficácia da extração e recuperação dos HTP e dos HPA foram analisadas outras variáveis nesta ordem de importância (ii) consumo de solvente por extração; (iii) consumo de água por extração; (iv) tempo de preparação e de extração por amostra. Foram determinadas notas de classificação sendo (1) ruim; (2) regular; (3) bom. Os seguintes pesos foram aplicados para cada variável:(1) menos relevante; (2) relevante; (3) muito relevante.

2.5 Análises estatísticas

Foi utilizado o teste paramétrico one way ANOVA seguido do teste de comparação de Tukey. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.

3. Resultados e Discussão

3.1 Extração de HTP por Soxhlet, MARS e ASE

3.1.1 Solo argiloso: extração de HTP

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para n-alcanos, hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP), mistura complexa não resolvida (MCNR) e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP).

Tabela 1: Médias e desvio padrão para n-alcanos, HRP, MCNR e HTP para solo argiloso com contaminação antiga.

Compostos	Soxhlet	MARS	ASE
n- alcanos	1.58 ± 0.58(a)	1.6 ± 0.6(a)	12.4 ± 1.7(b)
HRP	1.87 ± 0.93(a)	0.7 ± 0.3(a)	8.9 ± 1.4(b)
MCNR	3946.26 ± 7.31(a)	3941.9 ± 23.4(a)	1992.3 ± 17.8(b)
HTP	3949.71 ± 6.64(a)	3944.2 ± 22.8(a)	2013.6 ± 17.5(b)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

No solo argiloso com contaminação antiga, os resultados da extração por Soxhlet e pelo MARS não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 1), mas os resultados foram significativamente diferentes comparados aos obtidos com ASE ($p < 0,0001$). A Figura 1 apresenta média e desvio padrão dos teores extraídos do solo argiloso.

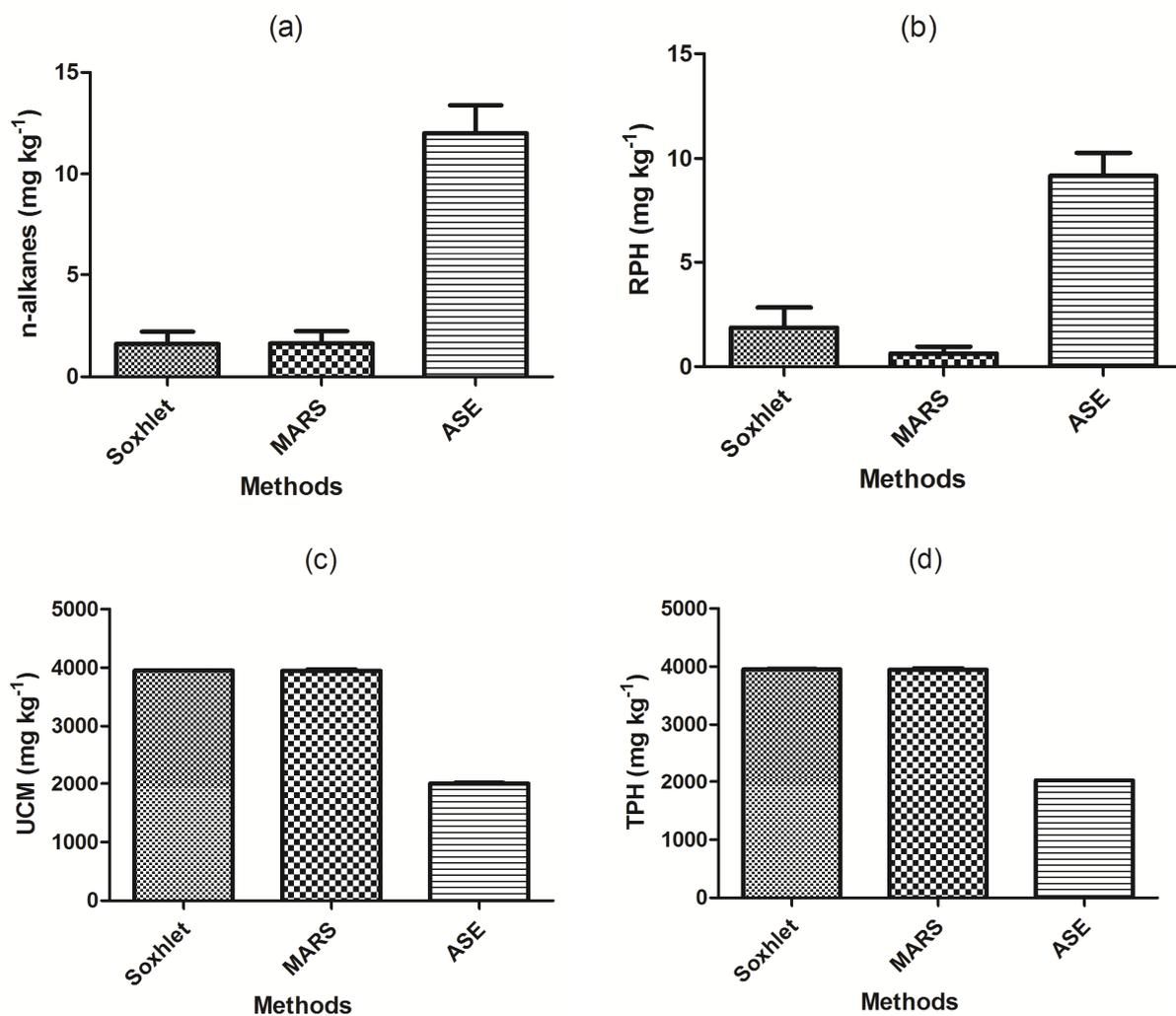


Figura 1: Teores em mg kg⁻¹ (m m⁻¹) extraídos de solo argiloso com contaminação antiga de: (a) n-alcenos; (b) hidrocarbonetos resolvidos de petróleo-HRP; (c) mistura complexa não-resolvida-MCNR e; (d) hidrocarbonetos totais de petróleo-HTP. Frações obtidas a partir da extração pelos três métodos (Soxhlet; extração por micro-ondas MARS; extração acelerada com ASE).

3.1.2 Solo arenoso; extração de HTP

A Tabela 2 apresenta os valores de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para o solo arenoso com histórico de contaminação. No tocante ao solo arenoso, todas as técnicas de extração resultaram em diferenças significativas nos teores de n-alcenos, HRP e HTP ($p < 0.05$) conforme Tabela 2. Entretanto, para MCNR não foi observada diferenças entre os métodos, tendo em vista que os teores de MCNR estavam abaixo dos limites de detecção nos três procedimentos.

Tabela 2: Médias e desvio padrão n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para solo arenoso.

Compostos	Soxhlet	MARS	ASE
n- alcanos	1.90 ± 0.11(a)	0.10 ± 0.01(b)	9.75 ± 0.01(c)
HRP	4.30 ± 0.55(a)	0.10 ± 0.00(b)	6.80 ± 0.08(c)
MCNR	0.00 ± 0,00(a)	0.00 ± 0.00(a)	0.00 ± 0.00(a)
HTP	6.15 ± 0.46(a)	0.14 ± 0.01(b)	16.70 ± 0.18(c)

Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

A Figura 2 apresenta as médias e desvios padrão para solo arenoso.

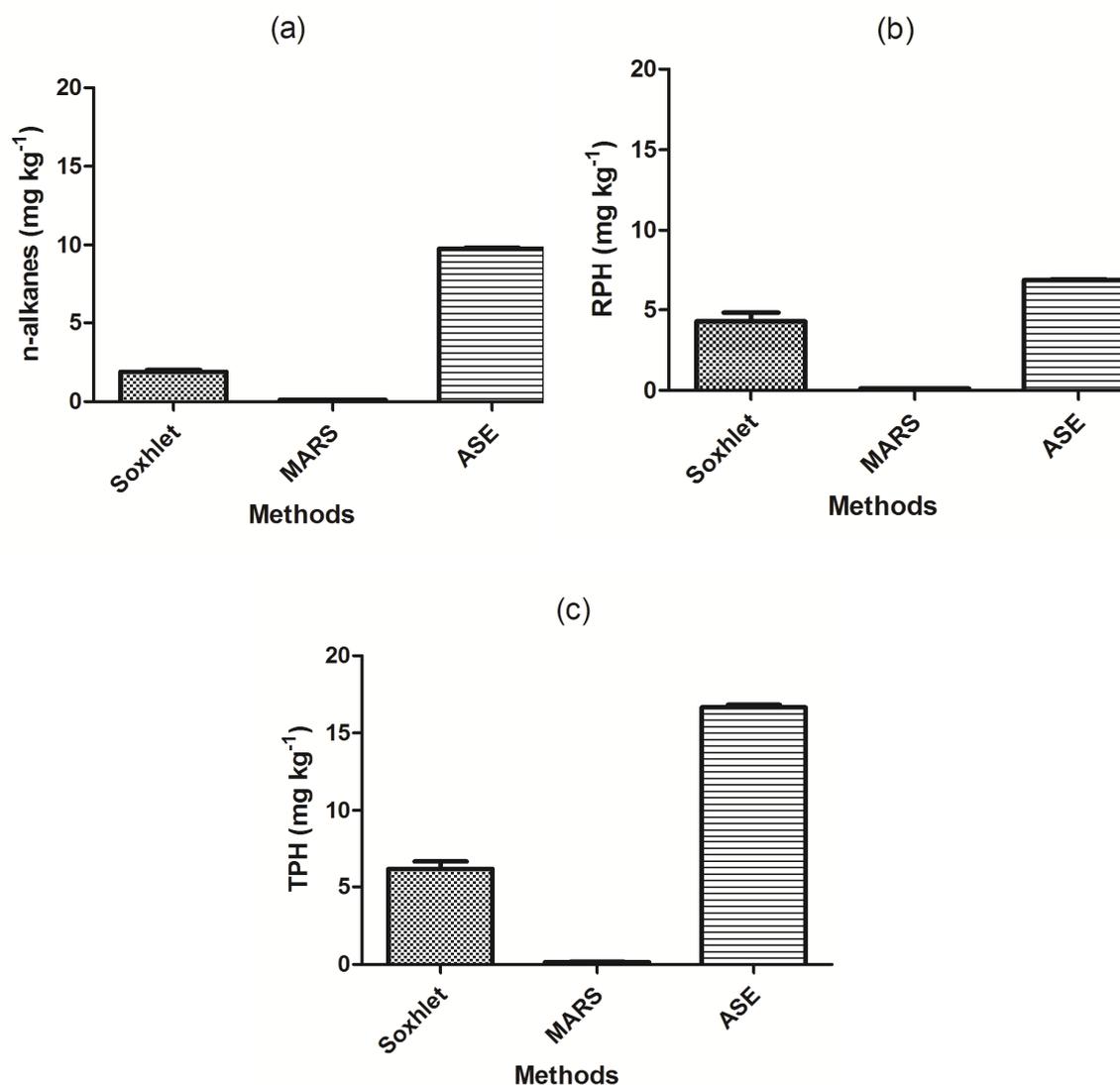


Figura 2: Valores extraídos de solo arenoso com contaminação antiga: (a) n-alcenos; (b) HRP; (c) MCNR e; (d) HTP obtidos a partir da extração pelos três métodos (Soxhlet; extração por micro-ondas; extração acelerada com ASE).

Conclusão sobre extração de HTP: A extração através do ASE foi a que apresentou uma maior recuperação dos n-alcenos, tanto para o solo argiloso quanto para o arenoso. Para o solo argiloso, o Soxhlet e o MARS apresentaram melhor recuperação para as frações mais pesadas, refletido na recuperação superior de MCNR. Tais resultados sugerem que os métodos que promovem melhor extração de compostos pesados presentes no solo argiloso (soxhlet e micro-ondas), provavelmente promovem perdas dos compostos mais leves, motivo da baixa concentração dos n-alcenos no extrato final. É sabido

que o solo argiloso possui uma capacidade de adsorção maior dos contaminantes mais pesados, dificultando tanto a biodisponibilização (Silva, 2010; Mariano, 2006), quanto extração dos mesmos que, por essa razão, permanecem no solo por mais tempo (Kriipsalu *et al.*, 2007).

3.2 Extração de HPA com Soxhlet, MARS e ASE

3.2.1 Solo argiloso; extração de HPA

A Tabela 3 apresenta os valores encontrados para os 16 HPA no solo argiloso.

Tabela 3: Médias e desvio padrão dos HPA extraídos do solo argiloso.

Compostos (nº de anéis)	Soxhlet	MARS	ASE
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0.01 ± 0.02	<LD	<LD
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fluoranteno (4)	<LD	<LD	<LD
Pireno (4)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Benzo(a)antraceno (4)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Criseno (4)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Benzo(k)fluoranteno (5)	<LD	0.01 ± 0.00	<LD
Benzo(a)pireno (5)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Total	0,46 ± 0.06(a)	0.33 ± 0.01(b)	0,29 ± 0.04(b)

Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). LD= limite de detecção

Com relação aos HPA em solo argiloso (Tabela 3 e Figura 3), não houve diferença significativa entre os teores extraídos por MARS e ASE ($p < 0,05$). No entanto, ambos diferiram dos teores obtidos com soxhlet (Tabela 3).

3.2.2 Solo arenoso – extração de HPA

A Tabela 4 apresenta os valores dos HPA encontrados no solo arenoso nas extrações por Soxhlet, MARS e ASE.

Tabela 4: Médias e desvio padrão de HPA extraídos de solo arenoso.

Compostos (nº de anéis)	Soxhlet	MARS	ASE
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fluoranteno (4)	<LD	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Pireno (4)	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Benzo(a)antraceno (4)	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Criseno (4)	0.07 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo(k)fluoranteno (5)	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo(a)pireno (5)	0.09 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.11 ± 0.00
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0.07 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Total	0.54 ± 0.03(a)	0.28 ± 0.00(b)	0,49± 0.01(a)

Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). LD= limite de detecção

Os teores de HPA extraídos com Soxhlet e ASE a partir de solo arenoso foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) e estes, por sua vez, foram significativamente diferentes (superiores) aos teores obtidos com micro-ondas (MARS) (Tabela 3).

A Figura 4 mostra os teores extraídos por cada uma das técnicas investigadas, tanto de solo argiloso quanto arenoso.

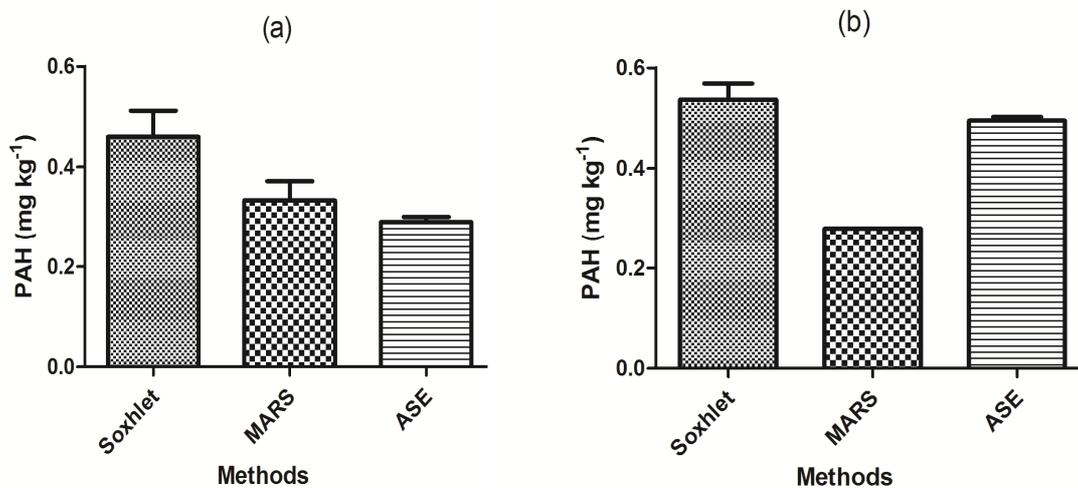


Figura 4: Médias e desvios-padrão dos teores de HPA extraídos de (a) solo argiloso e de (b) solo arenoso pelas técnicas de extração com base no soxhlet (SOX), micro-ondas (MARS) e extração acelerada com solvente (ASE).

3.3 Variáveis adicionais consideradas para a escolha da técnica de extração

O conjunto de variáveis consideradas com uma escala simples selecionada para decisão sobre o melhor método de extração é apresentado na Tabela 5. As diferenças inerentes à aplicação de cada método (temperatura, pressão, o modo de contato com a amostra, dentre outros) fazem com que uma direta comparação entre os métodos não seja possível (Wang *et al.*, 2007). No entanto, a eficiência na recuperação dos compostos de interesse pode ser considerada a variável de maior peso no momento da escolha, sendo as variáveis referentes ao impacto ambiental (consumo de solvente e água) as variáveis com peso médio e o tempo gasto em todo o processo, a variável de peso relativamente menor. Assim, se a eficácia da extração for o único fator, a seleção será baseada nas notas de maior valor apresentadas nas linhas (a) para solo argiloso e (b) para solo arenoso da Tabela 5. Se for baseada na variável eficácia de extração em conjunto com os impactos ambientais, os métodos de maior pontuação nas linhas g e h seriam escolhidos. Se a decisão incluir além destas, a variável tempo consumido, os métodos que obtiveram as maiores notas encontradas nas linhas i e j serão os escolhidos.

Saim *et al.* (1997) comparando outras variáveis, tais como custo do equipamento, além de eficácia de extração, consumo de solvente e tempo de extração, observaram que para cada variável, uma técnica diferente se destacava. Utilizando esse ponto de vista, no nosso estudo, o menor custo seria obtido com o soxhlet, menor gasto de solvente com o ASE e menor tempo de extração, com o MARS. Berset *et al.* (1999) ressaltaram que o consumo de solvente é um importante parâmetro no que tange custos econômicos e ambientais.

Wang *et al.* (2007) comparando a extração por Soxhlet, MARS e ASE para HPA em solo com diferentes teores de matéria orgânica e contaminação recente, observaram que a técnica baseada no ASE apresentou melhor eficiência e que as extrações por Soxhlet e MARS eram comparáveis.

Saim *et al.* (1997) comparando diferentes técnicas de extração (Soxhlet, extração por micro-ondas-MARS, extração por fluido supercrítico-SFE e extração acelerada por solvente-ASE), notaram que para todos os HPA, exceto Benzo(b)fluoranteno, a extração com ASE foi inferior à obtida com o soxhlet. No presente estudo, o soxhlet foi superior ao ASE e mais superior ainda ao MARS particularmente para os HPA de 4 a 6 anéis aromáticos.

Berset *et al.* (1999), confrontaram a eficácia de métodos distintos (Soxhlet, ASE, SFE e mesa agitadora) para extração para HPA, no entanto, não especificando o tipo do solo, e observaram que ASE e SFE mostraram melhores resultados em relação aos outros métodos estudados, considerados clássicos.

Tabela 5: Classificação das variáveis (valor x peso) para a escolha da melhor técnica de extração entre Soxhlet, MARS e ASE para HTP e HPA.

Variável		Nota conferida a cada variável e método de extração						
		Extração p/ HTP			Extração p/ HPA			
		Soxhlet	MAR S	ASE	Soxhlet	MAR S	ASE	
Eficácia da extração	Solo argiloso	n-alcanos	1	1	3	3	2	2
		HTP	3	3	2			
Solo arenoso		n-alcanos	2	1	3	3	2	3
		HTP	2	1	3			
Eficácia global solo arg.	a	4	4	5	3	2	2	
Eficácia global solo are.	b	4	2	6	3	2	3	
Consumo solvente	c	1	3	2	1	3	2	
Consumo de água	d	1	3	2	1	3	2	
Tempo de extração	e	1	3	2	1	3	2	
Tempo preparação	f	2	3	1	2	3	1	
Nota global:								
(a) Solo argiloso	$g=(a+c+d+e+f)$	9	16	12	8	14	9	
(b) Solo arenoso	$h=(b+c+d+e+f)$	9	14	13	8	14	10	

Valor: 1 = ruim; 2 = médio; 3 = bom.

4 Conclusão

A extração de HTP e HPA a partir de solos arenoso e argiloso com histórico de contaminação antiga (mais de dois anos) por hidrocarbonetos de petróleo, utilizando três métodos selecionados (Soxhlet, MARS e ASE) foi realizada, comparando-se a eficiência da extração de diferentes frações de HTP (n-alcanos, HRP, MCNR) e 16 HPA. Além da variável eficiência de extração, outros fatores, tais como consumo de solvente, de água e de tempo para preparo e extração p.d. foram considerados para avaliação comparativa dos métodos. Os resultados mostraram que com base na eficácia de extração, o

melhor método depende da classe textural de solo e do grupo de compostos de interesse. Assim, para HTP em solo argiloso, o ASE foi o que apresentou melhores resultados para n-alcanos e para a fração HRP. No entanto, para a fração MCNR, o Soxhlet e MARS foram superiores e comparáveis entre si, promovendo inclusive, perdas dos compostos mais leves.

No solo arenoso, o ASE foi o método que apresentou o melhor resultado tanto para n-alcanos quanto para HRP e MCNR. Portanto, com base na eficácia da extração, o ASE foi de maneira geral, superior aos outros dois métodos para análise de HTP e o que melhor recupera n-alcanos e HRP. No caso dos HPA, a extração por Soxhlet foi a que apresentou o melhor resultado, tanto em solo argiloso quanto arenoso.

O método MARS, seguido do ASE apresentam os menores consumos de solvente e de tempo de extração comparando com a extração por Soxhlet. O ASE requer um trabalho mais demorado de preparação comparado com os outros métodos. Assim, quando fatores tais como economia de solvente, água e tempo são relevantes, o MARS é o método mais atraente, particularmente quando o HTP é o grupo de interesse e os n-alcanos de baixo peso não são os compostos em foco. Dessa forma, em contaminações antigas, a classe textural do solo e a fração de hidrocarbonetos de interesse devem ser consideradas para a escolha do método mais adequado de extração.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPERJ pelo apoio concedido (Processos E-26/102.034/2011e E-26/103.064/2011), ao CNPq pela bolsa de produtividade concedida à 4^a autora (Processo 307.370/2010-0) e o apoio da empresa Estre Ambiental.

REFERÊNCIAS

BERSET, J.D; EJEM, M.; HOLZER, R.; LISCHER, P. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples, *Analytica Chimica Acta*, 383: 263-275, 1999.

CIANELLA, R.C. Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado com diesel B5, Dissertação (Mestrado em Química), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY UNITED STATES (USEPA). Method 3540C – Soxhlet extraction, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY UNITED STATES (USEPA). Method 3545 – Pressurized fluid extraction (PFE), 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY UNITED STATES (USEPA). Method 3535 – Solid-phase extraction (SPE), 1996.

FERREIRA, V.R. Otimização de protocolo analítico para extração e fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em sedimentos, Dissertação (mestrado) UFPR, Curitiba, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monograph Volume 92 – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, p. 754-773, 2000. Disponível em: [http://: monographs.iarc.fr](http://monographs.iarc.fr) Acessado em: 15/01/12.

KRIIPSALU, M.; MARQUES, M.; NAMMARI, D.R.; HOGGLAND, W. Bio-treatment of oily sludge: the contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. *Journal of Hazardous Materials*, v 148, p. 616-622, 2007.

MANZO, S.; NICOLA, F.D.; PICIONE, F.D.L.; MAISTO, G.; ALFANI, A. Assessment of the effect of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests, *Chemosphere* 71, 1937-1944, 2008.

MARIANO, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel, Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2006.

QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V.L.; SOUZA, D.R.C.d. Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo, Embrapa Meio Ambiente, 15 p., Jaguariúna, 2009.

OGA, S. Fundamentos de Toxicologia, 3ª Ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

SAIM, N.; DEAN, J.R.; ABDULLAH, M.P.; ZAKARIA, Z. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using soxhlet extraction, pressurized and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction, *Journal of Chromatography A*, 791: 361-366, 1997.

SILVA, G. Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado – escala piloto, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010.

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques, *Analytica Chimica Acta*, 602: 211-222, 2007.

APÊNDICE D - Toxicidade aguda e crônica para *Eisenia andrei* em solo contaminado por óleo lubrificante usado antes e após a biorremediação

Sanye Soroldoni¹; Graciane Silva², Fabio Veríssimo Correa³, Marcia Marques^{1,2}

¹ *Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI), Depto de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro*

² *Estre Ambiental*

³ *Laboratório de Saúde Animal – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro*

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, crônica de solo contaminado a 5% com óleo lubrificante usado após 22 meses de tratamento em reatores piloto utilizando diferentes estratégias de biorremediação, incluindo: BIOS (solo contaminado com ajuste de nutrientes); BIOA1 (solo contaminado com ajuste de nutrientes, inoculado com composto de resíduos sólidos urbanos-RSU); BIOA2 (solo contaminado com ajuste de nutrientes, inoculado com RSU). Como controles foram utilizados CONT (solo não contaminado); OLU (solo recém-contaminado com 5% de óleo lubrificante usado). O teste de mortalidade aos 14 dias de exposição resultou em taxas de mortalidade de 10 % ± 6 %; 20 ± 0 %; 73 % ± 25 %; 93 ± 12 % e; 100 % ± 0 % para solo CONT, BIOS, OLU, BIOA1, e BIOA2 respectivamente. Aos 14 dias, todos os tratamentos, exceto BIOS (que foi estatisticamente similar ao CONT), apresentaram taxa de mortalidade significativamente mais alta em relação ao controle CONT e ao BIOS ($p < 0,05$). BIOA1, BIOA2 e OLU não apresentaram diferenças significativas entre si. Aos 28 dias, entretanto, BIOS e OLU apresentaram taxas de mortalidade de 97 % ± 6 % e de 100 % ± 0 % respectivamente, valores estes significativamente superiores ao CONT. Foram observadas deformações anatômicas nos indivíduos mantidos em BIOS e OLU, assim como diminuição da biomassa em todas as amostras, evidenciando efeitos crônicos. Os resultados do teste de reprodução sugeriram estratégia de sobrevivência dos organismos; aos 28 dias foram observadas grandes quantidades de

² Autor correspondente: UERJ, Rua São Francisco Xavier, 524, sala 5024 Bloco E, Maracanã, CEP 20550-900, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: marciam@uerj.br, tel: +21-2334-0959.

indivíduos jovens nos solos biorremediados e recém-contaminado. No entanto, aos 56 dias houve uma diminuição dessas formas e o controle (CONT) exibiu uma quantidade maior de formas juvenis. O teste de densidade e viabilidade celular mostrou ser indicador sensível para toxicidade crônica apresentando queda nos solos BIOS e OLU em relação ao CONT com diferenças significativas ($p < 0.05$). Não foram observados micronúcleos nos solos em estudo. Apesar do acentuado decaimento dos teores de HTP e HPA após a biorremediação, compostos remanescentes de alto peso molecular e/ou de baixo peso molecular provenientes da degradação microbiana podem manter a toxicidade dos solos tratados ou torna-los ainda mais tóxicos do que o solo originalmente contaminado. Tal conclusão reforça a necessidade de testes de ecotoxicidade além das tradicionais análises químicas para avaliar a real eficácia de tecnologias de tratamento.

Palavras-chave: *Eisenia andrei*; Micronúcleo, Biorremediação; HPA; HTP

ABSTRACT

The objective of this study was to assess acute and chronic toxicity caused by soil contaminated by 5% spent lubricating oil after being treated in pilot reactors during 22 months with different bioremediation strategies including: BIOS (contaminated soil with C:N:P ratio adjustment); BIOA1 (contaminated soil with C:N:P ratio adjustment inoculated with compost from urban solid waste-RSU); BIOA2 ((contaminated soil with C:N:P ratio adjustment inoculated with compost from urban solid waste-RSU). The controls were CONT (soil without contamination); OLU (soil with recent contamination by 5% spent lubricating oil with no treatment). Regarding acute toxicity after 14 days of exposure, mortality rates of $10 \% \pm 6 \%$; $20 \pm 0 \%$; $73 \% \pm 25 \%$; $93 \pm 12 \%$ e; $100 \% \pm 0 \%$ were found for soils CONT, BIOS, OLU, BIOA1 and BIOA2 respectively. At 14 days, BIOA1, BIOA2 and OLU mortality rates were significantly higher than BIOS and CONT ($p < 0.05$). BIOA1, BIOA2 and OLU mortality rates had no significant differences. At 28 days, however, BIOS and OLU mortality rate were $97 \% \pm 6 \%$ and $100 \% \pm 0 \%$ respectively which were significantly higher than the CONT. Chronic effects such as anatomic deformations were observed in worms kept in BIOS and OLU, as well as biomass reduction compared to CONT. Results from the reproduction tests suggested survival strategy; after 28 days of exposure a large number of juvenile forms were

observed in bioremediated and contaminated soils. However after 56 days exposure, a reduction of juvenile forms in these soils was observed compared to CONT. The cell density and feasibility showed high sensitivity as indicators for chronic toxicity, with significant reduction ($p < 0.05$) in worms kept in BIOS and OLU compared to CONT. No micronucleus was observed. Regardless the considerable reduction of total petroleum hydrocarbons (HTP) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) after bioremediation, remaining high molecular weight compounds and/or low molecular weight products resulting from biodegradation are likely to keep toxicity or eventually to make the treated soil even more toxic than the originally contaminated soil. This effect illustrates the importance of keeping a following up of treatment strategies not only with chemical analyses but also with ecotoxicological analyses.

Key-words: *Eisenia andrei*; micronuclei; bioremediation; ecotoxicity test

INTRODUÇÃO

O óleo lubrificante usado (OLU) é um resíduo constituído basicamente de hidrocarbonetos remanescentes do petróleo, aditivos e componentes gerados pela degradação dos componentes originais que incluem compostos perigosos para a saúde e para o meio ambiente, tais como dioxinas, ácidos orgânicos, cetonas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Rincón; Canizares; Garcia, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas sobre estratégias de remediação de solos contaminados por OLU é de grande importância.

A biorremediação é aceleração do processo natural de biodegradação dos poluentes orgânicos, podendo ser utilizada sob condições físicas otimizadas (adição de agentes estruturantes, temperatura e umidade), proporcionando um ambiente ótimo para microrganismos autóctones (bioestímulo) ou a partir da introdução de microrganismos com capacidade de degradação testada (bioaumento) (Hubálek *et al.*, 2007; Ceccanti *et al.*, 2006). A biorremediação tem apresentado grande eficiência na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (Plaza *et al.*, 2005; Saterbak *et al.*, 2000; Salanitro *et al.*, 1997). No entanto, a redução da contaminação nem sempre é acompanhada da redução da toxicidade do solo, pois a degradação incompleta e a formação de

metabólitos podem contribuir para o aumento da toxicidade. Alguns estudos demonstram que vários subprodutos gerados pela atividade microbiana durante o processo de biorremediação podem ser mais tóxicos do que os contaminantes iniciais (Plaza et al., 2005; Molina-Barahona et al., 2005; Saterbak et al., 2000). Nesse contexto, justifica-se a aplicação de ensaios ecotoxicológicos antes e após a remediação como informação complementar às análises químicas para a avaliação de risco. Dentre os testes ecotoxicológicos, o mais utilizado é o teste de mortalidade (Andrea, 2010). No entanto, a observação de efeitos sub-letais crônicos e genotóxicos vem ganhando espaço, pois contribuem para uma avaliação mais completa (Lors et al., 2009; Wu et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi comparar a toxicidade aguda, crônica e genotoxicidade para o anelídeo *Eisenia andrei* de solo recém-contaminado com OLU e após 22 meses do mesmo ter sido tratado por diferentes estratégias de biorremediação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização física e química dos solos

O solo estudado foi caracterizado quanto às propriedades físicas e químicas mais relevantes para os testes de toxicidade, tais como: análise textural (granulometria), pH, capacidade de campo, umidade, teor de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e metais.

As análises físicas e químicas foram realizadas de acordo com o Manual de Métodos de Análises de Solo (EMBRAPA, 1997), pelos laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Solos), com exceção a análise textural, capacidade de campo, umidade realizadas no LABIFI. A análise granulométrica e o pH foram realizados de acordo com o Manual de Métodos de Análises de Solo (EMBRAPA, 1997) e a capacidade de campo e a umidade foram determinadas utilizando os métodos descritos por Chagas-Spinelli (2007) e Ramos (2007), respectivamente.

Os metais foram analisados pela Embrapa Solos de acordo com o método ICP-MS para os metais Ca, Mg, Al, Cu, Fe, Mn, Zn e Cr. Para os demais metais (Co, Ni, Cd, Pb) foi utilizado o equipamento ICP-OES, pois estavam abaixo do nível de detecção do ICP-MS.

Tabela 1 - Caracterização do solo de cada reator após 22 meses de e biorremediação.

Características	CONT	BIOS	BIOA₁	BIOA₂
Argila (%)	13	43	33	29
Silte (%)	17	9	9	9
Areia (%)	70	48	58	38
Capacidade de campo (%)	20	28	33	35
Densidade de partículas (g cm ⁻³)	2,7	2,5	2,6	2,56
Macroporosidades (m ³ m ⁻³)	32,7	34,7	39,4	40,5
Microporosidades (m ³ m ⁻³)	4,6	3,7	5,4	4,9
Carbono total (g kg ⁻¹)	4,6	32,7	28,6	21,8
Nitrogênio total (g kg ⁻¹)	0,4	0,7	1,1	1,2
Fósforo total (mg kg ⁻¹)	65	72	104	365
pH (1:25- H ₂ O)	5,5	6,5	6,7	6,4
Matéria Orgânica (g kg ⁻¹)	7,9	56,0	49,0	37,4

2.2 Estratégias de biorremediação

Os solos utilizados para o presente estudo foram coletados em três reatores-piloto simulando biopilhas estáticas, de aeração forçada, com capacidade de 150 L, onde durante 22 meses foi avaliada a eficácia de três estratégias de biorremediação de solo arenoso contaminado artificialmente com 5% (m m⁻¹)

de OLU: (i) bioestímulo (ajuste de pH e umidade) (BIOS); (ii) bioestímulo (ajuste de pH e umidade) associado ao bioaumento por adição de composto orgânico maturado (BIOA₁) e; (iii) bioestímulo (ajuste de pH e umidade) associado ao bioaumento por adição de composto orgânico semi-maturado (BIOA₂). O solo controle proveniente da mesma coleta de campo, foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado refrigerado 4°C até a realização dos ensaios de ecotoxicidade (Lee *et al*, 2007). A coleta das amostras dos reatores para os ensaios foi realizada através de um amostrador tubular, enterrado ao longo do perfil do solo contido cada reator. As 4 sub-amostras de cada reator imediatamente após retirada formaram uma amostra composta, acondicionada em sacos plásticos escuros. Ressalta-se que o amostrado tubular foi devidamente descontaminado a cada amostragem. A Tabela 2 apresenta as condições experimentais.

Tabela 2 – Condições experimentais do experimento de biorremediação.

Identificação	Tratamento	Descrição do tratamento aplicado ao solo
CONT	N/A	Ajuste de pH sem contaminação
BIOS	Bioestímulo	Ajuste de pH + 5% OLU + ajuste de umidade + aeração
BIOA ₁	Bioestímulo + Bioaumento	Ajuste de pH + 5% OLU + 10 % <i>RSU</i> _{matu} + ajuste de umidade + aeração
BIOA ₂	Bioestímulo + Bioaumento	Ajuste de pH + 5% OLU + 10 % <i>RSU</i> _{semi- matu} + ajuste de umidade + aeração
OLU	N/A	Ajuste de pH + 5% de contaminação com OLU

N/A: Nenhuma estratégia de biorremediação foi adotada.

Solo recém-contaminado para os testes de toxicidade

A preparação do solo simulando uma contaminação recente para os testes de toxicidade foi realizada no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI). O mesmo solo sem contaminação artificial coletado no início do estudo de biorremediação foi contaminado com o mesmo OLU na mesma concentração utilizada no início do experimento de biorremediação ($5\% \text{ m m}^{-1}$). Para isso, foi adicionada uma massa de 60g do OLU a uma massa de 1200 g de solo. Este solo foi peneirado em peneira de malha de 2 mesh e uma alíquota do mesmo foi retirada para determinação da umidade e do pH.

Os testes de ecotoxicidade foram então conduzidos em cinco condições experimentais: (i) solo arenoso sem contaminação artificial (CONT); (ii) solo obtido após 22 meses de tratamento dos reatores - BIOS (iii) BIOS; (iv) BIOA1; (v) solo arenoso recém-contaminado com $5\% \text{ (m m}^{-1})$ de OLU (OLU), conforme descrito acima.

Extração e quantificação dos HPA e dos HTP

Os 16 HPA prioritários da USEPA e os HTP foram analisados com base nos métodos USEPA SW 846-8015 e USEPA 8270-3535 respectivamente. O método de extração utilizado foi o soxhlet marca Solab de acordo com a metodologia US EPA 3540 C. Foram pesados 5g do solo em um béquer de vidro com o auxílio de uma balança analítica marca Toledo. À amostra pesada, foram adicionados 5 g de sulfato de sódio anidro grau PA marca Vetec, previamente calcinado em forno mufla Quimis, a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4h, com adição em seguida do padrão de recuperação deuterado $\text{C}_{12}\text{D}_{54}$ "surrogate" para HPA marca Supelco. Tal amostra foi transferida para um cartucho de celulose. Por cima do material, foi colocado um pedaço de algodão, previamente descontaminado com diclorometano grau pesticida marca Tédia, para evitar a evaporação do padrão. Com o auxílio de uma pinça previamente descontaminada com o mesmo solvente, o cartucho de celulose foi colocado na coluna de extração do Soxhlet. Em seguida, o mesmo foi acoplado à saída

do condensador do sohxlet. Foram adicionados 180 mL de diclorometano e 6 pérolas de vidro, previamente descontaminadas com o mesmo solvente. O extrator foi acoplado ao balão de destilação e este, à manta de aquecimento com temperatura de 60 °C. O sistema foi ligado e a extração foi conduzida por 16 h. O balão de fundo chato foi levado a um evaporador rotativo marca Tecnal, em temperatura de 35 °C e 70 rpm de agitação, para que o solvente fosse evaporado até 1 mL.

Para a quantificação, foi utilizado um cromatógrafo, marca Agilent (modelo 7890 A) acoplado a um espectômetro de massas de mesma marca (modelo 5975 C), com detector de eixo triplo, Utilizando-se como referência, a metodologia 8015 da USEPA. Foram utilizadas para quantificação dos HPA e HTP colunas dos modelos DB-5MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 μ) e DB-1MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 μ), respectivamente. O volume de injeção foi de 1 μ l, utilizando-se como gás de arraste o Hélio. A quantificação foi realizada por padronização interna para o HPA, utilizando-se o padrão HPA Mix 3, contendo os 16 HPA, e o padrão de deuterados Semivolatiles Internal Standard Mix marca Supelco. Para os HTP, a quantificação foi realizada por padronização externa de acordo com a curva com 6 pontos do padrão HTP mix 3 (C₁₂ a C₄₄) abrangendo a faixa de 0,10 a 50 ppm. O software utilizado para quantificação foi o Chemstation, fornecido pela Agilent.

Preparação do solo

Ajuste de pH: De modo a favorecer a atividade microbiana, o pH do solo original foi ajustado para um valor próximo da neutralidade dentro da faixa de 6,5 a 7,5, considerada adequada ao desenvolvimento das minhocas (ISO, 1993; OECD, 1984). Tal ajuste foi efetuado pela adição de carbonato de cálcio (CaCO₃) de acordo com a metodologia da Embrapa (1997). A análise foi realizada em triplicatas.

Ajuste de umidade: O ajuste de umidade inicial foi efetuado em todos os tratamentos para aproximadamente 50% da capacidade de campo, valor este que se encontra dentro da faixa ótima de umidade recomendada na literatura (ISO, 1993; OECD, 1984). A umidade foi corrigida pela adição de água ultra-pura obtida com equipamento Milli-Q.

Montagem dos bioensaios de toxicidade

Para os testes de letalidade e reprodução foram utilizadas as normas ISO 11268-1: Soil Quality – Effects of Pollutants on Earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate; ISO 11268-2: Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction (ISO, 1993); Guideline for testing of chemicals: earthworms acute toxicity test N° 207 (OECD,1984); e Guideline for testing of chemicals: earthworms acute reproduction test N° 222 (OECD, 2004), com algumas modificações, para condução dos bioensaios. Para estes testes foram utilizadas minhocas adultas da espécie *Eisenia andrei* fornecidas pelo Minhocário *Arborem*, obtidas de cultura aclimatada em laboratório nas condições especificadas na norma. As minhocas passaram por teste de sensibilidade com a substância de referência 2-cloroacetamida, tendo respostas esperadas e indicando a possibilidade do uso do lote adquirido. Para o controle durante os testes, as mesmas foram mantidas em esterco bovino em temperatura e luminosidade nas mesmas condições do teste (ISO, 1993; OECD, 1984), sendo trocado a cada mês, não sendo observada mortalidade acima de 10% dos indivíduos presentes na cultura.

Testes de toxicidade

Letalidade: Para o ensaio de letalidade, o solo foi separado em alíquotas de 600 g provenientes de cada tratamento em reator. Cada béquer de 600 mL recebeu 200 g de solo, o teste foi realizado em triplicatas. As minhocas utilizadas no teste foram previamente coletadas das caixas de cultura, lavadas e pesadas. Para cada réplica foram utilizadas 10 minhocas adultas com o clitelo bem desenvolvido e com peso entre 300 mg e 600 mg. Após a introdução dos indivíduos foram colocados oito gramas de esterco bovino em cada bioensaio para alimentação das minhocas. Cada béquer foi coberto com plástico filme e foram feitos furos com agulha permitindo a aeração durante o experimento. A umidade do solo foi padronizada em 50% da capacidade de campo e foi ajustada semanalmente.

O teste ocorreu ao longo de 56 dias realizando leitura quanto à mortalidade, reprodução, efeitos sub-letais (alterações quanto a cor, redução de biomassa e possíveis deformações) e genotóxicos aos 14, 28, 42 e 56 dias. Nos intervalos citados, as minhocas eram retiradas dos béquers, lavadas, contadas, pesadas e observadas as ocorrências de alterações morfológicas.

Reprodução: Para o teste de reprodução, são observados e contados ovos e juvenis. Após a verificação as minhocas vivas, ovos e juvenis retornaram para os béquers e eram adicionados oito gramas de esterco bovino como fonte de alimento.

Coleomócitos: Coleomócitos são células circulatórias presentes no fluido celomático que desempenham importante papel fisiológico no sistema imunológico das minhocas (Sforzini *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Portanto, pode ser considerada uma boa abordagem para a observação de danos causados às minhocas por poluentes presentes no solo (Lourenço *et al.*, 2011). Os testes foram feitos de acordo com metodologia proposta por Eyambe *et al.* (1991). Cada minhoca foi transferida para tubos de vidro no qual foram adicionados 200 µL de solução de extrusão reagindo por três min. Após o período, foi

adicionada ao tubo a 800 µl da solução tampão Lumbricus Balanced Salt Solution (LBSS). O material foi deixado em repouso para sedimentação por 20 min, agitado em vortex e, em tubo eppendorf, 30 µl da suspensão celular foi misturada com 30 µl da solução corante Trypan Blue Stain (0,4%). Em seguida a homogeneização, 10 µL da suspensão celular corada foram transferidos para a câmara de Neubauer para a contagem da densidade celular.

Micronúcleos: Micronúcleo é um pequeno núcleo formado do núcleo principal pela perda de um fragmento da cromatina ou quebra do cromossomo durante a divisão celular. Esse fato ocorre devido a presença de substância que induzam essa quebra (Lionetto, Calisi & Schettino, 2012; Leet & Richards, 2009). Para a observação de micronúcleos, 10 µL da suspensão celular corada foram colocados em lâminas de microscopia, previamente limpa com etanol, e foi realizado o esfregão com o auxílio de outra lâmina nas mesmas condições. As lâminas foram identificadas e deixadas em repouso para secagem por 24 h. Após secagem, foram colocadas de molho no metanol por 10 min, secas e colocadas para corar na solução Giemsa por 10 min. Em seguida, as lâminas eram lavadas em água corrente, secas e levadas para visualização em microscópio óptico (marca Olympus Digital Camera modelo C5060WZ) em objetiva de 100x. Os micronúcleos observados eram registrados por fotografia.

Análise Estatística

Todos os parâmetros foram analisados, em triplicatas, para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Graphpad Prism. Os tratamentos foram verificados através do teste paramétrico One Way ANOVA e pos teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Metais: A análise de metais (Tabela 3) revelou baixos teores nos solos em estudo.

Tabela 3 – Valores encontrados nos solos em estudo para os metais analisados.

Metal (mg kg ⁻¹)	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2	OLU
Ca	145	507	1692	3731	4456
Mg	27,3	45,2	179	324	69
Al	614	664	838	1026	726
Cu	4,05	3,97	9,73	11,7	4,07
Fe	1255	1134	1573	1520	4228
Mn	46,9	45,9	46,9	30,6	46,5
Zn	5,75	35,9	45,5	59,0	32,1
Cr	2,33	2,55	2,93	3,21	2,75
Co	0,89	0,90	0,92	1,02	1,47
Ni	0,61	0,78	1,96	3,25	2,27
Cd	0,03	0,04	0,09	0,10	0,04
Pb	5,11	6,26	9,81	12,9	5,61

A Resolução Conama 420 de 2009 estipula valores orientadores para alguns metais no solo, dentre os analisados: chumbo (Pb), cobalto (Co), níquel (Ni), cádmio (Cd), cobre (Cu) e cromo (Cr). Todos os elementos estão com o valor abaixo do limite de prevenção estabelecido na norma. Os demais metais analisados não possuem valores orientadores na norma. Com base exclusivamente nos teores individuais dos metais pode-se concluir que efeitos tóxicos eventualmente encontrados no solo em questão não podem ser

atribuídos a altas concentrações de metais. Entretanto, não há informações sobre eventuais sinergias entre os mesmos e eventuais efeitos tóxicos.

Quantificação dos HTP nos solos em estudo: A análise de HTP revelou uma alta concentração de hidrocarbonetos mesmo nos solos biorremediados. A Tabela 4 apresenta os valores encontrados nos solos em estudo para HTP.

Tabela 4 – Médias e desvios-padrão dos valores de n-alcenos (C₁₂ a C₄₄), HRP, MCNR e HTP nos solos em estudo.

Soxhlet	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2	OLU
n-alcenos	1,9 ± 0,2	<LD	<LD	<LD	<LD
HRP	4,2±0,3 (a)	4022,4 ± 192,8 (b)	3911,0 ± 0,0 (b)	3911,0 ± 0,0 (b)	13911,0 ± 0,0 (c)
MCNR	<LD	367,4 ± 48,0 (e)	188,2 ± 11,3 (f)	153,3 ± 19,1 (f)	1023,5 ± 43,6 (g)
HTP	6,2 ± 0,4 (h)	4389,8 ± 11,3 (i)	4099,3 ± 11,3 (j)	4064,4 ± 19,1 (j)	14934,6 ± 43,6 (l)
Remoção*	-	71 %	73 %	73 %	-

*Percentual de remoção em relação ao solo recém-contaminado (OLU). Valores em cada linha com letras iguais não apresentam diferenças significativas. LD = limite de detecção.

Quantificação dos HPA nos solos em estudo: A Tabela 5 apresenta os valores dos 16 HPA prioritários para os solos em estudo.

Os solos biorremediados apresentaram uma grande redução na quantidade de HPA, no entanto, alguns compostos remanescentes, principalmente os de 5 e 6 anéis aromáticos, permaneceram acima do limite estabelecido pela Resolução Conama 420 (2009), mostrando uma grande recalcitrância à remoção biológica, conforme registrado em trabalhos anteriores (Kriipsalu et al, 2008).

As médias dos totais dos 16 HPA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0001$) de todos os tratamentos quando comparados ao CONT. OLU como esperado, também apresentou diferença significativa para os solos biorremediados, BIOS, BIOA₁ e BIOA₂. No entanto, os solos biorremediados BIOS, BIOA₁ e BIOA₂, não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,0001$) para HPA. Os solos biorremediados apresentaram uma remoção de HPA semelhante de 98% em BIOS, BIOA₁ e BIOA₂.

Tabela 5 – Médias e desvios-padrão para 16 HPA nos solos em estudo.

Compostos (nº de anéis)	CONT	BIOS	BIOA1	BIOA2	OLU
Naftaleno (2)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Acenaftileno (3)	0,05 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00
Acenafteno (3)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoreno (3)	0,01 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,00
Fenantreno (3)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Antraceno (3)	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Fluoranteno (4)	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Pireno (4)	<LD	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Benzo(a)antraceno (4)	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00	24,4 ± 0,00
Criseno (4)	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	40,1 ± 0,01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,00	12,4 ± 2,6
Benzo(k)fluoranteno (5)	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	4,2 ± 1,0
Benzo(a)pireno (5)	0,09 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,00	28,4 ± 3,2
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,06 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,32 ± 0,01	11,3 ± 1,0
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,15 ± 0,04	0,91 ± 0,00	0,90 ± 0,00	0,89 ± 0,00	6,7 ± 1,7
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,07 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,00	29,6 ± 6,9
TOTAL	0,78 ± 0	2,79 ± 0	2,75 ± 0	2,74 ± 0	158,0 ± 18
	(a)	(b)	(b)	(b)	(c)
Remoção*	-	98 %	98 %	98 %	-

*Percentual de remoção em relação ao solo recém-contaminado. LD= limite de detecção

Avaliação dos efeitos letais: Aos 14 dias o solo CONT havia apresentado uma mortalidade de $7\% \pm 2\%$. O tratamento BIOS apresentou uma taxa de mortalidade de $20\% \pm 0\%$. O solo recém-contaminado, por sua vez, apresentou mortalidade de $75\% \pm 25\%$. Foram observadas taxas de mortalidade bem altas de $93\% \pm 12\%$ e de $100\% \pm 0\%$ nos tratamentos BIOA1 e BIOA2 respectivamente, valores estes, superiores à mortalidade no solo recém-contaminado OLU. Todos os tratamentos, exceto BIOS, apresentaram diferenças significativas em relação ao CONT ($p < 0,05$). O BIOS apresentou diferenças significativas em relação a BIOA1, BIOA2 e ao OLU ($p < 0,05$). Os tratamentos BIOA1, BIOA2 e OLU não apresentaram diferenças significativas entre si. Em outras palavras, aos 14 dias, o único solo que apresentava taxa de mortalidade tão baixa quanto o controle (solo não contaminado) foi o solo tratado por bioestímulo (BIOS). Entretanto, aos 28 dias, houve um incremento na mortalidade também no tratamento BIOS para $97\% \pm 6\%$, que é valor próximo aos observados para BIOA1 e BIOA2 aos 14 dias. Em outras palavras, em exposição por tempo superior, o BIOS produziu a mesma taxa de mortalidade que BIOA1, BIOA2 e OLU. Aos 28 dias todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparados ao CONT e não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) (Figura 1). Ou seja, os tratamentos BIOS, BIOA1, BIOA2 e o OLU foram igualmente tóxicos aos 28 dias, com letalidade máxima.

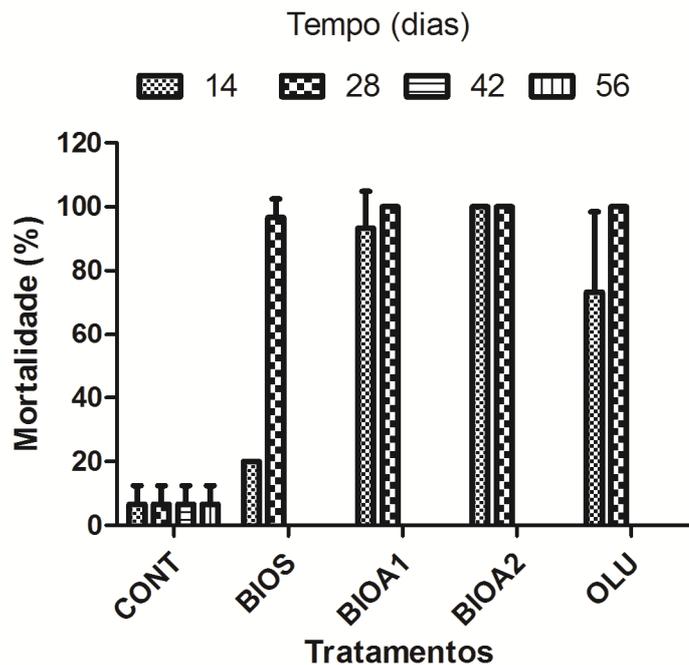


Figura 1: Taxa (%) de mortalidade de *E. andrei* aos 14, 28, 42 e 56 dias de exposição a solo controle (CONT), recém-contaminado (OLU) e provenientes de reatores com diferentes estratégias de biorremediação após 22 meses: BIOS), BIOA1 e BIOA2.

O tratamento por 22 meses em reatores, embora tenha reduzido significativamente os teores de HTP em BIOS ($71 \pm 0\%$), BIOA1 ($73 \pm 0\%$) e BIOA2 ($73 \pm 0\%$) (Tabela 3) e igualmente, tenha reduzido significativamente os teores de HPA ($98 \pm 0\%$ nos três tratamentos BIOS, BIOA1 e BIOA2, Tabela 4), não foi capaz de remover a toxicidade aguda, tendo em vista que a exposição de *E. andrei* aos solos provenientes dos três tratamentos resultou em mortalidade de 100%, com exceção do BIOS que ficou próximo de 100%.

Silva (2010) observou que os tratamentos BIOA1 e BIOA2 foram os que promoveram a maior remoção de HTP aos 120 dias. No entanto, aos 180 dias, aumentos consideráveis de HTP foram observados nos dois tratamentos, fenômeno descrito anteriormente (Cianella, 2010), que sugere a biodegradação de cadeias maiores, não alcançadas nos primeiros 120 dias de biodegradação, resulta a médio prazo, origem em cadeias menores. No presente trabalho, foi

observada uma redução significativa dos HTP e HPA nos solos remediados, comparados ao solo recém-contaminado. Entretanto, a toxicidade encontrada nos solos remediados pode estar associada às concentrações remanescentes de HTP e HPA – no caso dos HPA, especialmente, os de 5 e 6 anéis considerados mais recalcitrantes e tóxicos. Além disso, uma fração residual do contaminante permanece, mesmo quando ocorre uma biodegradação ótima. Isso sugere que nem todos os componentes da mistura têm o mesmo destino durante a degradação (Nocentini; Pinelli; Fava, 2000). Lopes *et al.* (2010), avaliando a toxicidade de óleo lubrificante, após 90 dias de biodegradação, observaram que o óleo que apresentou maior biodegradação foi o que também resultou na maior taxa de mortalidade das minhocas expostas. Chaîneau *et al.* (2003) sugerem que o processo de biodegradação, apesar de reduzir a quantidade do composto alvo, no caso os hidrocarbonetos, mantém toxicidade proveniente de hidrocarbonetos persistentes no solo. Dorn & Salanitro (1999), avaliando e comparando respostas de toxicidade de diferentes organismos para solo contaminado com óleo cru antes e após biorremediação, ressaltaram que *E. foetida* foi o organismo mais sensível dentre os utilizados. Esse fato foi corroborado por Dorn *et al* (1998) em estudo anterior.

Avaliação dos efeitos subletais: Biomassa

Foi observada diminuição significativa da biomassa dos indivíduos em todos os tratamentos (Figura 2). No CONT foi observada uma diminuição total da biomassa de 48%, aos 56 dias. Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao CONT ($p < 0,05$).

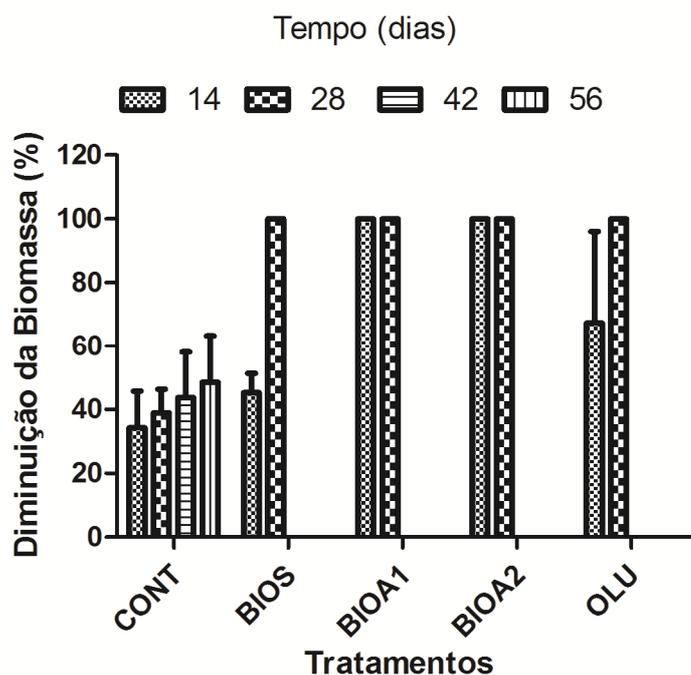


Figura 2: Diminuição da biomassa (%) de *E. andrei* exposta aos solos CONT, BIOS, BIOA1, BIOA2 e OLU aos 14, 28, 42 e 56 dias de exposição.

Van Gestel e Van Dis (1988) investigando a toxicidade aguda de substâncias químicas Cádmio e Cloroacetamida para *Eisenia foetida* em solos arenosos, observaram que o peso dos indivíduos em todos os testes incluindo o solo controle diminuiu. Na presente investigação, a análise das características dos solos (Tabela 1) mostrou que o solo em questão tem uma quantidade pequena de matéria orgânica e textura arenosa, sugerindo serem estes os possíveis motivos pela perda de peso dos indivíduos expostos. A matéria orgânica é importante para a sobrevivência das minhocas provendo nutrientes para as mesmas (Dendooven *et al.*, 2011) e a correlação entre o número de minhocas, a biomassa e a quantidade de matéria orgânica do solo é relatada na literatura (Edwards & Bohlen, 1996). O crescimento (biomassa) é frequentemente escolhido como variável para medir efeitos subletais, pois é de fácil medição e integra um conjunto de efeitos bioquímicos e fisiológicos que está associado com a aptidão individual dos organismos (Newman, 2010).

Avaliação dos efeitos subletais: Deformações anatômicas

Aos 14 dias, foram observadas deformações anatômicas nos indivíduos expostos aos solos BIOS (figuras 3 e 4). Tais deformações evidenciam que, apesar da taxa de mortalidade inferior à observada para os demais tratamentos, os indivíduos expostos ao solo BIOS não se encontravam saudáveis, sugerindo a presença de substâncias tóxicas.



Figura 3: Estrangulamento no segmento de *E. andrei* exposta ao tratamento BIOS.



Figura 4: Estrangulamento no segmento e inchaço após clitelo de *E. andrei* exposta por 14 dias ao solo tratado BIOS.

Correia & Moreira (2010), observaram deformações anatômicas em minhocas expostas aos pesticidas 2,4-D e glifosato. Minhocas expostas ao MTBE, presente no petróleo, sofreram várias deformações (An, 2005).

Avaliação dos efeitos crônicos: Reprodução

O teste de reprodução foi realizado nos mesmo intervalo de tempo do teste de mortalidade, 14, 28, 42 e 56 dias. Não foi observada a ocorrência de ovos não eclodidos em nenhum tratamento, no entanto, foi observada a ocorrência de formas juvenis (Figura 5).

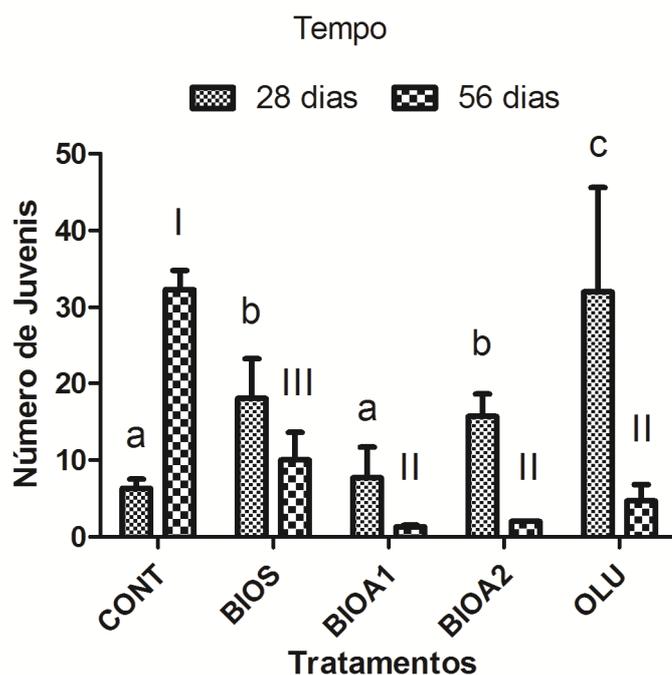


Figura 5: Formas juvenis aos 28 e 56 dias de experimento para os diferentes solos estudados (letras e números iguais não apresentam diferença significativa com $p > 0,05$).

O tratamento que apresentou maior número de formas juvenis, aos 28 dias, foi o solo recém-contaminado (OLU), com $38,7 \pm 13,6$ indivíduos, número este significativamente superior ao observado no controle (CONT) (Figura 5). Os solos BIOS, BIOA1 e BIOA2 apresentaram diferença significativa para o solo recém-contaminado OLU ($p < 0,05$). Os solos biorremediados BIOS e BIOA2 apresentaram diferenças significativas para o solo BIOA1 ($p < 0,05$), mas não apresentaram entre si ($p > 0,05$). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as minhocas, expostas à ambientes contaminados, produzem mais ovos para sobreviver às condições adversas (Edwards & Bohlen, 1996).

Aos 56 dias, final do experimento, houve uma diminuição expressiva de formas juvenis nos solos biorremediados (BIOS, BIOA1 e BIOA2) e recém-contaminado (OLU) apresentando maior número no solo CONT com $32,3 \pm 2,5$. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em comparação ao CONT ($p < 0,05$). O tratamento BIOS apresentou diferenças significativas

com relação aos os demais tratamentos BIOA1, BIOA2 e OLU ($p < 0,05$). Entretanto, os tratamentos BIOA1, BIOA2 e OLU não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). Shin & Kim (2001), observando a toxicidade sobre *Eisenia foetida* de um solo contaminado com diesel e remediado, contaminado com fenantreno e com biosurfactante ressaltaram que o solo contaminado com diesel apresentou toxicidade quanto à reprodução com surgimento de pequena quantidade de formas juvenis. Saterbak et al. (2000) avaliando a toxicidade antes e após a biorremediação de solos contaminados com HTP (3.000 a 5.000 mg/kg), com *E. foetida* e germinação de plantas, observaram que após a biorremediação, apesar de não haver mortandade, a média de ovos e juvenis diminuiu em relação ao solo controle em alguns dos solos.

Foram estudados os efeitos genotóxicos e reprodutivos das minhocas de solo de uma área industrial de carvoaria contaminada com HPA. No tocante à reprodução, os autores observaram que após 56 dias de exposição, a produção de juvenis em solo com 20% (527 mg kg⁻¹) e 40% (1.053 mg kg⁻¹) de HPA diminuiu 90% em relação ao controle (Bonnard *et al.*, 2009).

Avaliação dos efeitos genotóxicos: Viabilidade e densidade celular

Devido à alta mortalidade nos tratamentos BIOA1 e BIOA2, não foi possível avaliar a genotoxicidade de indivíduos expostos a esses solos. A Tabela 6 apresenta os valores de densidade e viabilidade celular para os tratamentos CONT, BIOS e OLU.

Tabela 6 – Densidade e viabilidade celular de *E. andrei* após 14 dias de exposição (n=4).

Tratamentos	CONT	BIOS	OLU
	Média	Média	Média
	(d.p.)	(d.p.)	(d.p.)
Densidade celular	361.600,0 (a)	185.200,0 (b)	138.400,0(c)
(cél ml⁻¹)	(54.779,0)	(21.746,4)	(15.654,6)
Viabilidade (%)	98,6 (a) (1,0)	92,8 (b) (1,0)	88,5 (c) (2,0)

Letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$)

Foi observada uma queda na densidade e na viabilidade das células imunológicas das minhocas (coleomócitos) no BIOS e no OLU em relação ao controle, aos 14 dias. Todas as amostras, tanto de viabilidade quanto de densidade, apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,0001$). Aos 28 dias, não havia organismos vivos em BIOS e OLU e o monitoramento continuou sendo realizado apenas para o controle CONT até os 56 dias de experimento, não havendo diferenças significativas no CONT. O resultado sugere que os compostos presentes no solo contaminado e remediado primeiramente e, em segundo lugar, no solo recém-contaminado causaram genotoxicidade.

Bonnard et al. (2009), em estudo dos efeitos sobre a reprodução e genotoxicidade em uma área industrial de carvoaria contaminada com HPA, observaram que, após 4 e 10 dias de exposição nos solos de maior concentração de HPA (20% = 527 mg kg⁻¹ e 40% = 1.053 mg kg⁻¹), as minhocas apresentaram diminuição no número de coleomócitos. Sforzini *et al.* (2012), investigaram a genotoxicidade, através de danos nos coleomócitos, de

minhocas expostas a solo artificial contaminado com Benzo(a)pireno e constataram danos aos coleomócitos dos indivíduos expostos, no entanto, tal contaminação não afetou a mortalidade.

Micronúcleos

Não foram observados micronúcleos nas células das minhocas expostas aos tratamentos CONT, BIOS e OLU. As diferenças entre os resultados de micronúcleo e viabilidade e densidade celular podem estar ligadas à natureza dos testes que refletem eventos biológicos diferentes, pois o micronúcleo está ligado à genotoxicidade acumulada durante o ciclo de vida da célula e, eventualmente, pela presença de substâncias tóxicas (Sforzini *et al.*, 2012). Já os coleomócitos são um indicador mais sensível, pois ficam, em sua maioria, no aparelho digestivo das minhocas e em contato direto com o solo contaminado e o contaminante no momento da ingestão do solo por esses organismos, surgindo como uma importante ferramenta para testes ecotoxicológicos (Lionetto, Calisi & Schettino, 2012; Lett & Richards, 2009).

CONCLUSÕES

No presente estudo foram avaliadas as toxicidades aguda, subletal, crônica e genotóxica de solos recém-contaminados com óleo lubrificante usado e após 22 meses de biorremediação utilizando-se diferentes estratégias de bioestímulo, e bioaumento, tendo como organismo teste a *E. andrei*. A avaliação da toxicidade demonstrou que, apesar dos baixos teores de metais e a alta remoção de HTP (71% a 73%) e de HPA (98%), os solos biorremediados resultaram em alta toxicidade em exposição por períodos curtos. Exposições por períodos mais longos resultaram em toxicidade subletal e com efeitos deletérios quanto ao crescimento, reprodução e genotoxicidade. Esses efeitos devem-se provavelmente à presença de HTP, assim como de HPA de alto

peso molecular (estes, os mais recalcitrantes). Uma interpretação adicional é que subprodutos da biodegradação dos hidrocarbonetos podem ser mais tóxicos do que os compostos originais presentes em concentrações maiores em contaminações recentes. Os resultados também indicam que mesmo nos casos de letalidade similar ao controle (solo não contaminado), como a observada aos 14 dias de exposição de *E. andrei* a solo tratado em BIOS, a exposição por tempo mais prolongado (28 dias) resulta no aumento de letalidade e surgimento de efeitos crônicos. Fica demonstrada a importância da combinação de análises químicas e biológicas, utilizando minhocas como bioindicadores, no caso de solo. Tal abordagem combinada é mais informativa na avaliação de áreas contaminadas e da eficiência dos tratamentos utilizados, tendo em vista que nem sempre a redução ainda que significativa dos compostos contaminantes de interesse é acompanhada proporcionalmente pelo decaimento da toxicidade, podendo haver, inclusive, aumento da mesma.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Processo 307.370/2010-0), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ (Processos E-26/102.034/2011e E-26/103.064/2011) e à empresa Cetrel Lumina Soluções Ambientais pelo apoio financeiro. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA-Solos e ao Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana-CESTEH, FIOCRUZ, pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

AN, Y. J. Assessing soil ecotoxicity of methyl tert-butyl ether using earthworm bioassay; closed soil microcosm test for volatile organic compounds, *Environmental Pollution*, 134: 181-186, 2005;

ANDREA, M.M.D. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos, *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, n. 2, p. 95-107, 2010.

BONNARD, M.; EOM, I.C.; MOREL, J.L.; VASSEUR, P. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia foetida*, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50, p. 60-67, 2009;

CECCANTI, B.; MASCIANDARO, G.; GARCIA, C.; MACCI, C.; DONI, S. Soil bioremediation: combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil, *Water, Air and Soil Pollution*. 177: 383-397, 2006;

CHAINEAU, C.H; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J.F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air and Soil Pollution*. 144: 419-440, 2003;

CIANELLA, R.C. Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5, Dissertação (mestrado), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010;

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 420 de dezembro de 2009. Brasília, 2009.

CORREIA, F.V. & MOREIRA, J.C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 128, p. 264-268, 2010;

DORN, P.B.; VIPOND, T.E.; SALANITRO, J.P.; WISNIEWSKI, H.L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox and plants, *Chemosphere*, 37 (5): 845-860, 1998;

DORN, P.B.; SALANITRO, J.P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*. 40: 419-426, 2000;

EDWARDS, C.A; BOHLEN, P.J. Biology and ecology of earthworms, Chapman e Hall, Third Edition, 1996

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise química para avaliação de fertilidade do solo. 1 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 42 p.

HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATEJU, V.; KOVÁCOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 1-7, 2007;

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) 11268-1 Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, 1993;

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) 11268-2 Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms- Part 2: Determination of effects on reproduction, 1993;

KRIIPSALU, M., MARQUES, M., HOGGLAND, W., NAMMARI, D.R. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of oily sludge. *Environmental Technology*, v. 29, p.43 - 53, 2008.

LEE, Y. B.; LORENZ, N.; DICK, K. L.; DICK, R. P. Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 71, n. 11, p. 1299-1305, July/August, 2007;

LEET, J.K.; RICHARDS, S.M. Genetic ecotoxicology. In: *Ecotoxicology Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc, p. 61-72, 2009.

LIONETTO, M.G.; CALISI, A.; SCHETTINO, T. Earthworms biomarkers as tools for soil pollution assessment. *Soil Health and Land Use Management*, 16: 305-332, 2012;

LOPES, P.R.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; DOMINGUES, R.F.; BIDÓIA, E.D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricants oils, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 84: 454-458, 2010;

LOURENÇO, J.I.; PEREIRA, R.O.; SILVA, A.C.; MORGADO, J.M.; CARVALHO, F.P.; OLIVEIRA, J.M.; MALTA, M.P.; PAIVA, A.A.; MENDO, S.A.; GONÇALVES, F.J. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides, *Journal of Hazardous Materials* 186, p. 788-795, 2011;

LORS, C., PERIE, F.; GRAND, C.; DAMIDOT, D. Benefits of ecotoxicological bioassays in the evaluation of a field biotreatment of PAHs polluted soils, *Global NEST Journal*, 11(3): 251-259, 2009;

MOLINA-BARAHOMA, L.; VEJA-LOYO, L.; GUERRERO, M.; RAMIREZ, S.; ROMERO, I.; VEJA-JARQUIN, C.; ALBOREZ, A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after bioremediation process, Wiley InterScience DOI 10.1002/tox.20083, 2005;

NEWMAN, M.C. Fundamentals of ecotoxicology. Taylor & Francis Group, 3rd edition, 541 p. Florida, 2010;

NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem, Chemosphere 41, p. 1115-1123, 2000;

OECD. Guideline for testing of chemicals: earthworms acute toxicity test. N^o 207, Paris, 1984; OECD. Guideline for testing of chemicals: earthworms acute reproduction test. N^o 222, Paris, 2004;

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation, Chemosphere 59, p. 289-296, 2005;

RAMOS, A.S. *Eisenia foetida* como bioindicador na avaliação da toxicidade de solos contaminados por óleo cru e solos biorremediados, Dissertação (mestrado), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2007;

RINCON, J.; CANIZARES, P.; GARCIA, M.T.; Regeneration of used lubricant oil by ethane extraction, The Journal of Supercritical Fluids, 39 (3): 315-322, 2007;

SATERBAK, A.; TOY, R.J.; MCMAIN, B.J.; WILLIAMS, M.P.; DORN, P.B. Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils, Environmental Toxicology and Chemistry, 19 (11): 2643-2652, 2000;

SHIN, K.H. & KIM, K.W. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia foetida*), Environmental Monitoring and Assessment, 70:93-103, 2001;

SILVA, G. Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado – escala piloto, Dissertação (mestrado), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010;

SFORZINI, S.; BOERI, M.; DAGNINO, A.; OLIVERI, L.; BOLOGNESI, C.; VIARENGO, A. Genotoxicity assessment in *Eisenia andrei* coleomocytes: A study of induction of DNA damage and micronuclei in earthworms exposed to B[a]P- and TCDD-spiked soils. Mutation Research, 746: 35-41, 2012;

WU, S.; ZHANG, H.; ZHAO, S.; WANG, J.; LI, H.; CHEN, J. Biomarker responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposure to phenanthrene and pyrene both singly and combined in microcosms. *Chemosphere*, 87: 285-293, 2012.

APÊNDICE E - Toxicidade aguda e crônica sobre *Eisenia andrei* de solos com contaminação antiga por petróleo e derivados

**Sanye Soroldoni¹, Marcia Marques^{1,4}, Taís Ventura³, Fábio Correia³,
Maria Luiza Kede^{1,4}, Graciane Silva^{1,2}**

¹Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias-LABIFI, Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente-DESMA, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ

²Estre Ambiental

³ Laboratório de Saúde Animal, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UNIRIO

⁴ Programa de Pós-Graduação-Doutorado em Meio Ambiente-PPGMA, UERJ, Bolsista CAPES

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi a avaliação do grau de toxicidade de solo contaminado com petróleo, proveniente de uma área com contaminação antiga, para a minhoca *Eisenia andrei*. Os indicadores de toxicidade aguda e crônica investigados foram: teste de mortalidade, reprodução, densidade celular de coleomócitos e presença de micronúcleos. As minhocas foram transferidas para béquers com uma mistura do solo com (Sc) e um solo sem (Ss) histórico de contaminação, formando misturas Sc + Ss com 100%, 50%, 75%, 25% e 0% de Sc, equivalentes a teores decrescentes de HPA 3,2; 3,0; 2,9; 2,7; 2,6 mg kg⁻¹ (m m⁻¹). Aos 15, 29, 44 e 51 dias as minhocas eram contadas, pesadas, observadas quanto a alterações morfológicas e contados ovos e juvenis presentes. As análises de HTP e HPA mostraram que o Sc apresentava 3,2 mg kg⁻¹ de HPA e 7389 mg kg⁻¹ de HTP. O solo Ss apresentava contaminação de 2,6 mg kg⁻¹ de HPA e 3752,5 mg kg⁻¹ de HTP. O teste de toxicidade aguda resultou em ausência de mortalidade em todas as proporções de Sc:Ss estudadas. No decorrer do teste foi observada uma aparente diminuição da biomassa sem diferença significativa comparada ao controle. Foi observada despigmentação dos organismos expostos aos solos nas concentrações 2,9;

3,0; 3,2 mg kg⁻¹. O teste de reprodução indicou que com o aumento da concentração houve uma diminuição no número de ovos e juvenis ao longo do experimento, sendo a menor concentração, 2,6 mg kg⁻¹, a que apresentou o maior número dos dois indicadores ao final do teste. Observou-se uma tendência de diminuição tanto da viabilidade celular quanto da densidade celular de coleomócitos nos organismos à medida que a concentração de HPA aumentava. Notou-se a presença de micronúcleo em coleomócitos de organismos expostos à maior concentração de HPA (3,2 mg kg⁻¹), evidenciando o efeito genotóxico desses compostos. Fica demonstrada que a combinação das análises químicas e ecotoxicológicas, particularmente com indicadores de efeitos crônicos é uma abordagem mais apropriada à avaliação de áreas contaminadas.

Palavras-chave: *Eisenia andrei*, HPA, HTP, solo contaminado, coleomócitos, micronúcleo.

Abstract

The objective of this study was to assess the toxicity caused by a petroleum contaminated soil from an aged-contamination on worm *Eisenia andrei*. The acute and chronic toxicity endpoints were: mortality rate, reproduction, coelomocytes density and the presence of micronuclei. The worms were transferred from a lab culture to beakers with a mixture of the soil with (Sc) and without (Ss) contamination report in Sc:Ss rates of 100%, 50%, 75%, 25% and 0% resulting on concentrations of PAH of 3.2, 3.0, 2.9, 2.7, 2.6 mg kg⁻¹ (m m⁻¹). At 15, 29, 44 and 51 days of exposure, the worms were counted, weighed, observed for morphological changes and eggs and juveniles were counted. HTP and HPA quantification showed that Sc soil had 3.2 mg kg⁻¹ PAH and 7389 mg kg⁻¹ TPH. Ss soil had 2.6 mg kg⁻¹ PAH and 3752.5 mg kg⁻¹ TPH. Mortality was not observed in any Sc:Ss mixture. Biomass reduction was registered, however, with no significant difference between mixtures and control. Organism depigmentation was observed among those exposed to the highest PAH

concentrations (2,9; 3,0; 3,2 mg kg⁻¹). The reproduction test showed a reduction of eggs and juveniles forms in Sc:Ss mixtures with higher PAH values, being the mixture with the lowest PAH and TPH content, the one with the highest numbers of eggs and juveniles. A trend for reduction in cell viability and coelomocytes cells density as the PAH concentration increased was also observed. It was also observed the presence of micronucleous in coelomocytes exposed to the highest PAH concentration (3.2 mg kg⁻¹), indicating genotoxic effect. The results indicated that the combination of chemical analyses with ecotoxicity tests, particularly with chronic endpoints represent a better strategy to assess the status of contaminated areas.

Keywords: *Eisenia andrei*; PAH; TPH; contaminated soil; coelomocytes; micronuclei

Introdução

Organizações internacionais e agências ambientais têm preconizado a inclusão de outras abordagens para avaliação de riscos associados à contaminação de matrizes ambientais, além da detecção e quantificação de contaminantes. O objetivo dessa estratégia é fazer com que as avaliações de riscos sejam baseadas em indicadores capazes de detectar os efeitos diretos de diferentes compostos químicos isoladamente ou em conjunto sobre a biota em geral (Bonnard *et al.*, 2009; Calisi *et al.*, 2009). Isso porque a avaliação das taxas de remoção de contaminantes de matrizes ambientais (comumente baseada em indicadores *proxy* tais como demanda química de oxigênio-DQO, demanda bioquímica de oxigênio-DBO, carbono orgânico total-COT), já não é suficiente para determinar a real eficácia de tecnologias de tratamento e remoção da poluição (Bigorgne *et al.*, 2010; Bonnard *et al.*, 2009; Calisi *et al.*, 2009; Di Marzio *et al.*, 2005), visto que tal abordagem não leva em conta a possibilidade de elevação da toxicidade, em decorrência da transformação de compostos em subprodutos mais tóxicos (Lors *et al.*, 2009; Bispo *et al.*, 1999).

A Diretriz da Água da Comunidade Europeia (2000/60/EC) preconiza o uso de testes ecotoxicológicos baseados em bioindicadores pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar dos ecossistemas de interesse. Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos também fazem parte das exigências da legislação federal (CONAMA, 2005) e de alguns estados brasileiros na avaliação da qualidade ambiental visando à preservação da vida aquática. Tais ensaios também são utilizados no controle do lançamento de efluentes industriais e de materiais dragados, tanto em ambiente marinho, quanto estuarino e de água doce, para assegurar a manutenção das condições e padrões de qualidade previamente estabelecidos para um determinado corpo hídrico. Como consequência, estudos ecotoxicológicos vêm adquirindo importância crescente na avaliação da integridade de ecossistemas aquáticos e terrestres.

Dentre as muitas atividades que representam altos riscos de contaminação ambiental, a exploração de petróleo e a produção de derivados, com grande expansão da indústria petroquímica causam graves impactos ao ambiente. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), em particular os 16 HPA considerados prioritários pela United States Environmental Protection Agency (USEPA), merecem especial atenção, devido ao potencial carcinogênico dos mesmos (Lionetto *et al.*, 2012; Oga, 1998; Manzo *et al.*; IARC, 2010). Tais compostos estão presentes no ar, água e no solo em decorrência da combustão da biomassa, mas também da exploração, refino, armazenamento, transporte, disposição inadequada de resíduos e dos diversos tipos de acidentes, inclusive derramamento e vazamento de tanques de óleo e derivados. Em função da relevância do tema, agências e órgão ambientais de alguns países estipulam valores orientadores para os HPA no solo (Seabra, 2005; Sissino, 2002).

Os testes ecotoxicológicos mais comumente empregados avaliam efeitos letais (incremento da taxa mortalidade entre os indivíduos expostos) (Cortet *et al.*, 1999). Entretanto, o aumento da mortalidade do organismo em contato com a(s) substância(s) em avaliação não informa todas as alterações que podem ser provocadas ao nível celular, como por exemplo, as que ocorrem em

decorrência da exposição aos baixos níveis de concentração da substância ou a uma mistura de substâncias, situação esta, mais comum e, portanto, mais relevante (Depledge & Fossi, 1994). Nesses casos, efeitos subletais tem alta relevância, tais como a inibição da reprodução e mudanças citológicas.

A avaliação ecotoxicológica também é importante para investigar o risco potencial à saúde humana (Bonnard *et al.*, 2009) e reveste-se de particular relevância quando o objetivo é verificar a eficácia de uma tecnologia de tratamento ou remediação de matrizes contaminadas.

Alterações nas células dos organismos podem ser causadas por sua exposição a substâncias tóxicas presentes no ambiente (Leet & Richards, 2009). Uma das alterações que podem ser observadas é o surgimento de micronúcleos, que são pequenos núcleos formados por cromossomos que não se ligaram ao fuso por ocasião da divisão celular. Tal fenômeno pode decorrer de falhas na formação dos fusos acromáticos, eventualmente relacionadas à presença de substâncias tóxicas (Lionetto, Calisi & Schettino, 2012; Lett & Richards, 2009). Além disso, a observação da densidade e da viabilidade celular é relevante, pois os coleomócitos, que são importantes células do sistema imunológico das minhocas, encontrados principalmente no trato intestinal dos anelídeos, são considerados indicadores sensíveis à exposição em ambientes contaminados. Nesse sentido, o teste de micronúcleo surge como uma importante ferramenta para os testes genotóxicos (Lionetto, Calisi & Schettino, 2012).

Pouco se sabe atualmente sobre a genotoxicidade de HPAs em invertebrados como, por exemplo, minhocas (Bonnard *et al.*, 2009; Manerikar *et al.*, 2008). As minhocas (*ex*: gênero *Eisenia*) são importantes bioindicadores da qualidade do solo com o qual interagem intimamente e como consequência, são muito sensíveis à poluição do mesmo (Correia & Moreira, 2010; Calisi *et al.*, 2009; Cortet *et al.*, 1999). Por essa razão, as minhocas são excelentes bioindicadores para testes de toxicidade e fazem parte de protocolos experimentais da International Standardization Organization-ISO (ISO, 1993) da Organization for Economic Cooperation and Development-OECD (OECD, 1984) e da American Society for Testing and Materials-ASTM (ASTM, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi testar um conjunto de indicadores na avaliação do grau de toxicidade de solo com histórico de contaminação antiga por petróleo e derivados. Para tanto, foi utilizada a minhoca *Eisenia andrei* e indicadores de toxicidade aguda e crônica, tais como taxa de mortalidade, reprodução, densidade celular de coleomócitos e presença de micronúcleos.

Materiais e Métodos

Origem, amostragem e preparo dos solos estudados.

Dois solos foram utilizados nos experimentos: (i) solo **S_c**: proveniente de atividades de escavação de uma antiga instalação de armazenamento de petróleo e derivados, em funcionamento desde 1951 no Estado de São Paulo e; (ii) solo **S_s**: proveniente do Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, de uma área agrícola sem histórico de contaminação. Ambos os solos foram peneirados em peneira de 2 mesh (2 mm) e espalhados em bancada para secagem a temperatura ambiente durante 7 dias antes de serem caracterizados. Após secagem, os solos foram armazenados em sacos plásticos, identificados e mantidos sobre refrigeração em temperaturas de 4 °C em laboratório até a realização dos testes de toxicidade.

A caracterização física e química dos solos foi feita na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Solos), de acordo com o Manual de Métodos de Análise de Solos (EMBRAPA, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1: Características físicas e químicas dos solos utilizados no experimento.

Parâmetros	Solo com histórico de contaminação (S_c)	Solo sem histórico de contaminação (S_s)
Granulometria		
Argila (g kg ⁻¹)	300	349
Silte (g kg ⁻¹)	286	87
Areia (g kg ⁻¹)	414	569
pH (água)	5,4	5,7
P assimilável (mg kg ⁻¹)	8,0	54,0
C (g kg ⁻¹)	41,6	12,8
N (g kg ⁻¹)	1,8	1,1
Complexo sortivo (cmol/kg)		
Ca ²⁺	7,2	4,0
Mg ²⁺	1,5	1,6
K ⁺	0,17	*
Na ⁺	0,96	*
Al ⁺³	0	0
H ⁺	2,6	1,5

*Não foi analisado.

O solo S_c foi classificado como franco argiloso e o solo S_s foi classificado como argissolo vermelho-amarelo distrófico típico de acordo com a metodologia do triângulo das classes texturais do solo (ABNT, 1989). Para os testes ecotoxicológicos, amostras de solo S_c foram misturadas em diferentes proporções com solo S_s, chegando-se às seguintes porcentagens: 100% (somente S_c), 75%, 50%, 25% e 0% (somente S_s).

Extração e quantificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP):

Os 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) classificados como prioritários pela USEPA e os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram analisados com base nos métodos USEPA SW 846-8015 e USEPA 8270-3535. As análises dos HPA e HTP do solo S_c foram realizadas pela empresa Bioagri de acordo com as mesmas metodologias descritas acima. Para análise do solo S_s, sem histórico de contaminação, foi utilizado como método de extração o

soxhlet marca Solab de acordo com a metodologia USEPA 3540 C. Foram pesados 5 g da amostra em um béquer de vidro com o auxílio de uma balança analítica marca Toledo. À amostra pesada, foram adicionados 5 g de sulfato de sódio anidro grau PA marca Vetec, previamente calcinado em forno mufla Quimis, a 400 °C por 4 h, seguida da adição do padrão de recuperação Deuterado C₁₂D₅₄ “surrogate” para HPA marca Supelco. A amostra foi transferida para um cartucho de celulose e, sobre o material, foi colocado um pedaço de algodão previamente descontaminado com diclorometano grau pesticida marca Tédia, para evitar a evaporação do padrão. O cartucho de celulose, com o auxílio de uma pinça previamente descontaminada com diclorometano grau pesticida, foi colocado na coluna de extração do Soxhlet. Em seguida, o mesmo foi acoplado na saída do condensador do soxhlet. Foram adicionados 180 mL de diclorometano e 6 pérolas de vidro, previamente descontaminadas com o mesmo solvente. O extrator foi acoplado ao balão de destilação, e este, à manta de aquecimento a 60 °C. O sistema foi ligado e a extração foi conduzida por 16 h. O balão de fundo chato foi levado a um evaporador rotativo marca Tecnal, em temperatura de 35 °C e 70 rpm de agitação, para que o solvente fosse evaporado até 1 mL.

Para a quantificação, foi utilizado um cromatógrafo de marca Agilent (modelo 7890 A) acoplado a um espectômetro de massas de mesma marca (modelo 5975 C), com detector de eixo triplo, Utilizando-se como referência, a metodologia 8015 da USEPA. Foram utilizadas para quantificação dos HPA e HTP as colunas de modelos DB-5MS (30 m; 0,25 mm; 0,25µ) e DB-1MS (30 m; 0,25 mm; 0,25µ), respectivamente. O volume de injeção foi de 1µl utilizando-se o Hélio como gás de arraste. A quantificação foi realizada por padronização interna para o HPA utilizando-se o padrão HPA Mix 3, contendo os 16 HPAs, e o padrão de deuterados Semivolatile Internal Standard Mix marca Supelco. A quantificação dos HTP foi realizada por padronização externa de acordo com a curva com 6 pontos do padrão HTP mix 3 (C12 a C44) abrangendo a faixa de 0,10 a 50 ppm. O software utilizado para quantificação foi o Chemstation, fornecido pela Agilent.

Testes de mortalidade, biomassa e reprodução: Os ensaios de letalidade e reprodução foram realizados de acordo com as Normas ISO 11268-1 e ISO 11268-2 (ISO, 2003). Minhocas da espécie *Eisenia andrei* foram aclimatizadas em laboratório durante oito semanas em esterco bovino na temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ antes do início do experimento. Os testes foram realizados com indivíduos adultos, ou seja, aqueles com clitelo desenvolvido e com peso entre 300 a 600 mg (ISO 11268-1, 1993). No experimento de mortalidade e reprodução, 10 minhocas foram pesadas e distribuídas para cada béquer contendo 200 g de da mistura de solo S_c e S_s preparada nas seguintes proporções de solo S_c : 100% (somente S_c); 75%; 50%; 25% e 0% (somente S_s). Os testes foram realizados em triplicatas. Cada béquer foi coberto com plástico filme com furos para permitir a aeração. A umidade do solo foi padronizada em 60% da sua capacidade de campo e monitorada semanalmente pelo peso do béquer durante todo o experimento. Após 15, 22, 29, 44 e 51 dias de incubação os béqueres eram abertos e as minhocas, ovos e juvenis eram contados. As minhocas vivas eram pesadas. Minhocas eram classificadas como mortas quando não respondiam a estímulos mecânicos, sendo as anormalidades morfológicas registradas (ISO 11268-1, 1993). Após a pesagem e contagem, as minhocas, ovos e juvenis eram retornados ao experimento e em todos os béqueres eram adicionados 4g de composto orgânico como fonte de alimento. Para assegurar sua qualidade, o lote de minhocas utilizado, foi mantido em esterco bovino durante todo o teste apresentando mortalidade menor que 10%.

Teste de densidade celular e micronúcleo: Para os testes de viabilidade celular e observação do aparecimento de micronúcleo seguiu-se a metodologia descrita por Eyambe et al. (1991). Nas mesmas condições descritas para o teste de mortalidade e reprodução, foram feitas duas réplicas contendo 10 minhocas cada. No mesmo tempo mencionado, eram retiradas duas minhocas aleatoriamente das duas réplicas. Para a coleta dos coleomócitos por extrusão, foi utilizada a metodologia descrita por Eyambe et al (1991). Cada minhoca foi transferida para tubos de vidro onde foram adicionados 200 μL de solução de extrusão reagindo por 3 min. Após a contagem, era adicionada a solução tampão *Lumbricus Balanced Salt Solution* (LBSS). Após a sedimentação do

material celular por 20 min para verificação da densidade celular, 30 μL da suspensão celular foi misturada com 30 μL da solução corante trypan blue (0,4%). Após repouso, 10 μL da suspensão celular corada eram transferidas para a câmara de Neubauer para efetuar a contagem da densidade. Em seguida, 10 μL eram submetidos a esfregaço e coração para a verificação de micronúcleos e visualização em microscópio óptico (Eyambe.et al., 1991).

Análise estatística

Foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Como os dados seguiam distribuição normal, para a comparação das médias foi utilizado o teste one-way ANOVA e o teste pos-hoc de Tukey de comparação entre as médias para indicadores como mortalidade e biomassa. Para o teste de reprodução foi utilizado o teste two-way ANOVA, ambos com ($p > 0,05$) e utilizando o software Graf Pad Prism versão 5. Para o teste de densidade e viabilidade celular foi utilizada a fórmula descrita por Eyambe et al. (1991).

Resultados e Discussão

A análise cromatográfica dos HTP revelou uma contaminação de 0,8% (7389 mg kg^{-1}) no solo S_c e 0,4 % (3752,5 mg kg^{-1}) no solo S_s . A Resolução CONAMA N° 420/09 (CONAMA, 2009) não indica valores orientadores para HTP. Ferreira (2010) destaca que na Lista Holandesa os valores variam de 50 (valor solo limpo) a 5.000 (valor de intervenção) mg kg^{-1} para HTP em solo. Na Lista de Berlim, os valores variam entre 300 a 5000 mg kg^{-1} , dependendo da sensibilidade do local (Seabra, 2005). A Tabela 2 mostra os valores encontrados nos solos e os valores orientadores da Resolução CONAMA N° 420, do Canadian Soil Quality Guidelines (2008) e da Lista Holandesa para os 16 HPA prioritários da EPA.

Tabela 2: Concentrações de HPA em mg kg^{-1} (m m^{-1}) nas amostras dos dois solos estudados e valores orientadores das agências e órgãos ambientais.

Composto (Nº de anéis aromáticos)	Solos estudados		Valores orientadores estabelecidos por normas:		
	Solo S_c	Solo S_s	Conama 420 (2009)	Canadense (2008)	Holandesa (2010)
Naftaleno (2)	0,13	<LD	0,12	0,14	*
Acenaftileno (3)	<LD	0,48	**	**	*
Acenafteno (3)	<LD	<0,1	**	**	*
Fluoreno (3)	<LD	0,12	**	**	*
Fenantreno (3)	0,13	<LD	3,3	0,51	*
Antraceno (3)	<LD	<LD	0,039	0,12	*
Fluoranteno (4)	<LD	<LD	**	**	*
Pireno (4)	0,40	<LD	**	**	*
Benzo(a)antraceno (4)	0,27	0,13	0,025	0,25	* *
Criseno (4)	0,99	<LD	8,1	10,7	*
Benzo(b)fluoranteno (5)	<LD	0,14	**	**	* *
Benzo(k)fluoranteno (5)	<LD	0,17	0,38	2,4	* *
Benzo(a)pireno (5)	<LD	0,20	0,052	0,26	*
Indeno(1,2,3- cd)pireno (6)	0,26	0,32	0,031	**	
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,38	0,90	0,08	**	
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,68	0,17	0,57	7,5	
Soma	3,24	2,63			*40

** Não possuem valores de referência na referente norma. LD = Limite de detecção do método.

No caso dos HPA, alguns compostos estavam presentes em concentrações superiores aos preconizados tanto na Resolução CONAMA N° 420 quanto na Norma Canadense, tanto no solo S_c quanto no S_s (Tabela 2). Esse fato sugere que a qualidade de ambos os solos (inclusive o S_s sem histórico de contaminação) possa estar imprópria para a biota. Para alguns compostos, o solo sem histórico de contaminação (S_s) apresentou valores inclusive acima dos encontrados no solo contaminado (Tabela 2). Sugere-se que um possível vazamento decorrente de máquinas agrícolas, e/ou deposição atmosférica de

material particulado por conta da proximidade entre a área amostrada e rodovias sejam prováveis responsáveis por tal contaminação. Cianella (2010) observou esse fato em estudo com solo de uma área próxima de agricultura orgânica, sugerindo que a deposição atmosférica seja o motivo mais provável. A tabela 3 mostra os valores para determinados metais tóxicos nos solos S_s e S_c . Todos os metais tóxicos analisados estavam abaixo do limite recomendado para os mesmos na Resolução Conama 420/09.

Tabela 3: Concentrações de determinados metais para os solos S_s e S_c .

Metais (mg kg^{-1})	S_s	S_c
Cr	2,25	2,54
Co	0,82	1,45
Ni	0,66	1,95
Cd	0,04	0,10
Pb	5,51	10,80

Testes de Toxicidade

Mortalidade e biomassa: Não foram observados indivíduos mortos em nenhuma das misturas de S_s e S_c , nas proporções 100%, 75%, 50%, 25%, 0% de S_c , equivalentes a 3,2; 3,0; 2,9; 2,7; 2,6 mg kg^{-1} de HPA, respectivamente. No entanto, foi observada ao longo do experimento uma diminuição na biomassa em todas as concentrações, inclusive no controle (Figura 1). Embora seja possível observar graficamente uma pequena tendência de redução menos acentuada de biomassa em misturas com percentuais inferiores de S_s , as diferenças não foram significativas ($p \leq 0,05$) entre organismos expostos a diferentes concentrações de HPA.

A perda de peso corporal é um bom indicador de efeitos subletais medidos pelos testes de toxicidade (Roberts & Dorough, 1984). Shin & Kim (2001) observando minhocas expostas a solos remediados com surfactantes notaram que a média do desenvolvimento da biomassa era similar em todas as

concentrações, sem diferenças significativas. Fatores tais como estresse do manuseio dos indivíduos durante o teste, repetidos ajustes de umidade, dentre outros, também podem contribuir para a perda de peso ao longo do experimento (Saterbak et al.2000).

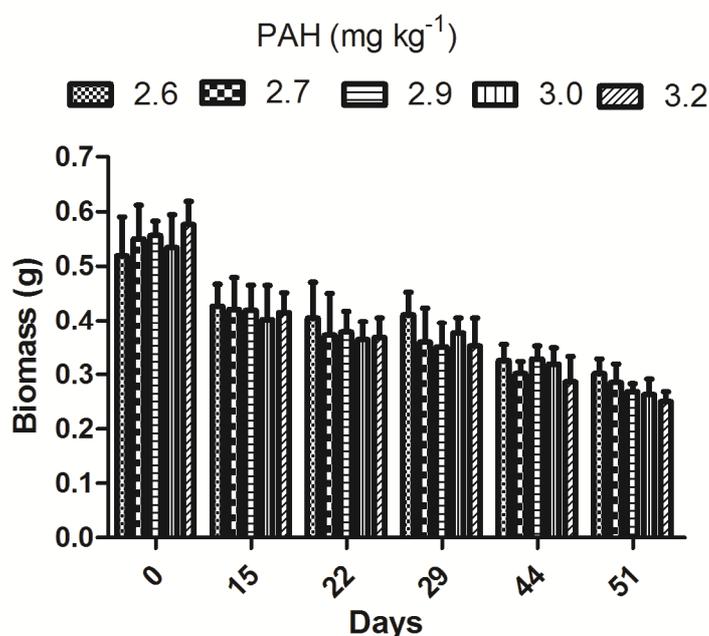


Figura 1: Biomassa (média \pm desvio padrão) de *E. andrei* em misturas de solo S_c e S_s com percentuais decrescentes de HPA em diferentes tempos de exposição.

Reprodução - ovos e formas juvenis:

Ovos: Aos 29 dias foram observados ovos não eclodidos nas menores concentrações de HPA (2,9 e 3,1 mg kg⁻¹), no entanto, nas concentrações mais altas, não foram notados ovos não eclodidos nesse período (3,5 e 3,6 mg kg⁻¹). Eom *et al.* (2007) utilizaram teste similar em uma área industrial de carvoaria desativada a 30 anos, com altas concentrações de HPA e observaram que na mais alta concentração (40%) a quantidade de ovos foi reduzida em 70% em relação ao controle, mas a sobrevivência não foi afetada. Já aos 51 dias foi

observada uma diminuição da quantidade de ovos eclodidos, sendo que o solo com a maior concentração de HPA ($3,2 \text{ mg kg}^{-1}$) (ou seja, 100% de solo S_c) continuou sem a presença de ovos não eclodidos. Foi observada diferença significativa entre as concentrações e o tempo de exposição com $p < 0,0001$.

Formas juvenis: Aos 29 dias foram observadas formas juvenis em todas as concentrações de HPA. A maior quantidade foi observada na menor concentração ($2,6 \text{ mg/kg}$) de HPA com a média de 4,7 juvenis. Aos 51 dias notou-se uma tendência de queda na quantidade de formas juvenis com o aumento da concentração de HPA. Entretanto, o solo com a menor concentração de HPA apresentou um aumento no número de formas juvenis com diferenças significativas em relação às concentrações e ao tempo de exposição com $p < 0,001$.

Apesar do aparecimento de ovos e formas juvenis nos béqueres com as concentrações maiores de HPA, com o aumento da concentração foi notada uma tendência de diminuição tanto no número de ovos quanto no número de formas juvenis. Evidenciou-se, também, que na menor concentração de HPA ($2,6 \text{ mg kg}^{-1}$) uma grande quantidade de formas juvenis permaneceu (Figura 2).

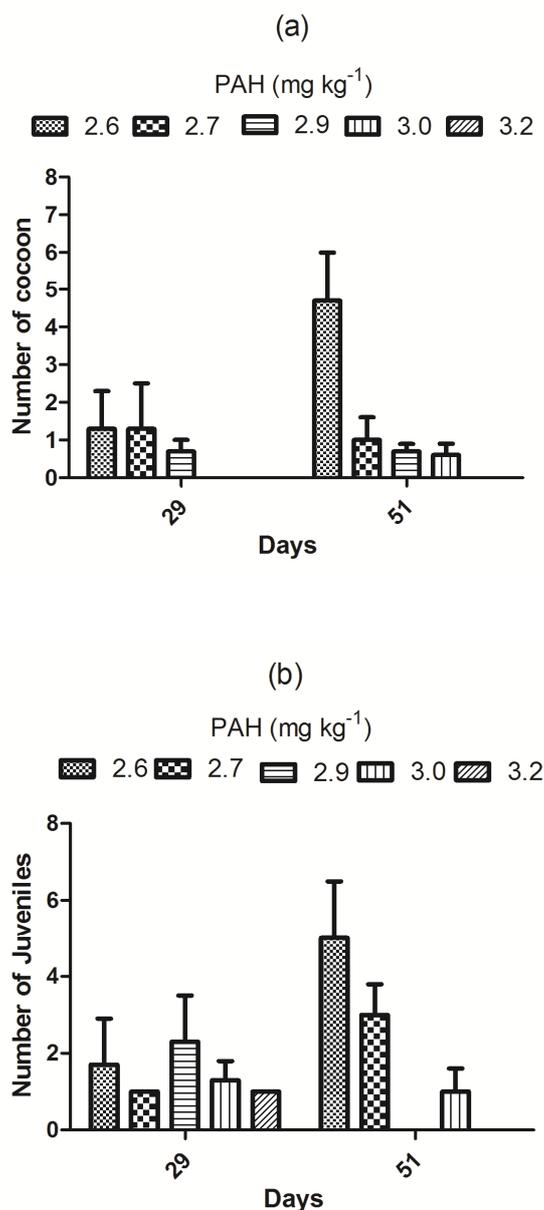


Figura 2. Contagem média de (a) ovos e (b) formas juvenis, aos 29 e aos 51 dias, em solo com diferentes misturas de $S_c + S_s$ e concentrações crescentes de HPA (mg kg⁻¹ massa seca) (N = 3).

Alterações de cor: No presente estudo, alterações de cor foram observadas em minhocas que se encontravam nas misturas com 2,9; 3,0 e 3,2 mg kg⁻¹ de HPA. As minhocas colocadas em contato com as misturas contendo 2,6 e 2,7 mg kg⁻¹ de HPA no solo não apresentaram alterações de cor visíveis a olho nu (Figura 3). Tal observação coincide com os resultados obtidos na contagem de

ovos e formas juvenis surgidas nas diferentes misturas onde uma tendência de diminuição de indivíduos ocorre à medida que maiores percentuais de solo S_c estão presentes (Tabela 3; Figura 2). Ramos (2007) observou mudança de pigmentação em minhocas de outra espécie (*E. foetida*) após 14 dias de exposição a solos contaminados com óleo cru e solo biorremediado, sugerindo que a presença dos hidrocarbonetos de petróleo no solo teria causado a alteração morfológica e, conseqüentemente, um efeito subletal antes, mas também depois da biorremediação.





Figura 3: Alterações morfológicas (despigmentação na parte posterior) em minhocas *E. andrei* expostas a 100% de S_c (organismo na parte superior da figura) em comparação com minhoca exposta a 100% de S_s (organismo na parte inferior da figura) ($3,2$ e $2,6$ mg kg^{-1} de HPA, respectivamente).

Densidade e viabilidade celular

Após 15, 22 e 30 dias de exposição de *E. andrei* observou-se uma tendência de redução tanto da viabilidade quanto da densidade celular a medida que o percentual de solo S_c aumenta e, portanto, a concentração de HPA aumentava (Tabela 4). Bonnard et al. (2009) não observaram diferenças significativas no número médio de coleomócitos em minhocas mantidas em solos contaminados com HPA em misturas contendo 10% e 20% de solo contaminado misturado com solo artificial (ISO, 1993). Por outro lado, a média no número de coleomócitos extraídos caiu significativamente em minhocas expostas a 40% do solo contaminado na mistura, em relação ao

controle após 10 dias, enquanto que a redução foi menos significativa em quatro dias de exposição.

Tabela 4: Médias da densidade e viabilidade celular (N = 2).

HPA (mg kg ⁻¹)	15 dias		22 dias		30 dias	
	Viabilidade (%)	Densidade (cél mL ⁻¹)	Viabilidade (%)	Densidade (cél mL ⁻¹)	Viabilidade (%)	Densidade (cél mL ⁻¹)
3,2	87,4	5,5x10 ⁵	92,1	1,5 x 10 ⁵	59,4	4,8 x 10 ⁵
3,0	84,6	6,7 x 10 ⁵	90,2	5,9 x 10 ⁵	64,5	3,8 x 10 ⁵
2,9	89,7	7,8 x 10 ⁵	80,9	9,1 x 10 ⁵	74,8	3,1 x 10 ⁵
2,7	85,8	8,2 x 10 ⁵	97,8	5,3 x 10 ⁵	67,0	2,5 x 10 ⁵
2,6	80,9	10,1 x 10 ⁵	72,8	8,7 x 10 ⁵	72,8	5,6 x 10 ⁵

No presente estudo a concentração total dos 16 HPA prioritários no S_c foi relativamente baixa (3,24 mg kg⁻¹, Tabela 2). No entanto, os hidrocarbonetos com maior número de anéis aromáticos, quando analisados individualmente, estavam em concentrações acima do limite da legislação. Di Marzio et al. (2005), em estudo com solo contaminado com os 16 HPA num total de 96 mg/kg, observaram efeito genotóxico em minhocas após 15 e 21 dias de exposição. Zhu et al. (2006) observaram em trabalho com solo contaminado com Cd e fenantreno, que a medida que a concentração desse HPA aumentava, também aumentavam os efeitos genotóxicos, sendo que os dados sugeriam que o efeito dos HPA era catalisado com a presença do metal pesado Cd.

No presente estudo foi observado o aparecimento de micronúcleos em organismos expostos a 100% de solo S_c (3,2 mg/kg de HPA) em 15 dias de exposição, indicando assim, o efeito deletério causado às células das minhocas (Figura 4). Sforzini *et al.* (2012) avaliaram a genotoxicidade em coleomócitos de *E. andrei* em solos contaminados com o HPA benzo(a)pireno e verificaram que os indivíduos expostos em solos com as concentrações de 0,1, 10 e 50 mg kg⁻¹ apresentaram micronúcleos após 10 e 28 dias de exposição.

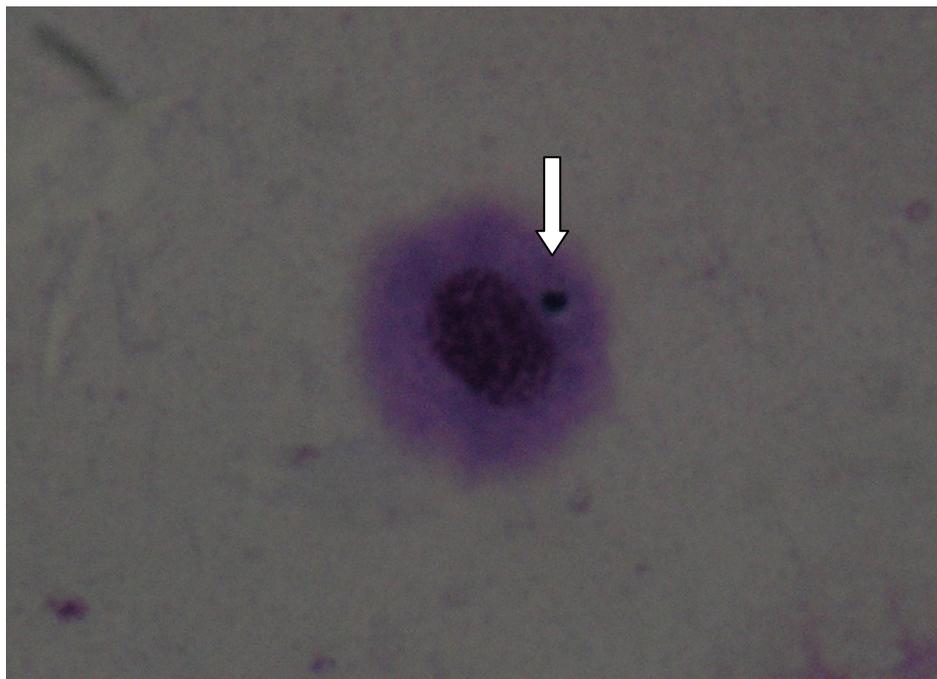


Figura 4. Micronúcleo observado em célula do sistema imunológico (coleomócitos) de *E. andrei* exposta a solo S_c (100%) após 15 dias de exposição (ampliação de 100x).

Conclusões

No presente estudo foi avaliada a toxicidade aguda, crônica, reprodutiva e celular para minhoca *E. andrei* de uma mistura de dois solos, sendo um solo (S_c) com e outro solo sem (S_s) histórico de contaminação por derivado de petróleo, em misturas de ambos nas proporções que variavam de 0% a 100% de S_c . Tais misturas apresentavam concentrações de HPA variando de 2,6 a 3,2 mg kg⁻¹ (m m⁻¹) e de HTP variando de 3752,5 a 7389 mg kg⁻¹ (m m⁻¹). A avaliação demonstrou que, apesar de não afetar a sobrevivência dos organismos, a exposição em prazos mais longos causou efeitos subletais, tais como diminuição da biomassa, despigmentação, diminuição da densidade celular e aparecimento de micronúcleos, particularmente nas concentrações superiores. Observou-se, ainda, que tal diferença

na resposta ocorreu em uma faixa de variação relativamente estreita em termos dos teores HPA, indicando a grande sensibilidade dos referidos organismos à pequenos aumentos nos teores de HPAs. Fica demonstrada que a combinação das análises químicas e biológicas, utilizando organismos bioindicadores como minhocas, constitui-se em uma abordagem mais completa na avaliação de áreas contaminadas e serve como embasamento para a avaliação de risco e da eficácia real da tecnologia de remediação que venha a ser aplicada.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro ao Grupo de Pesquisa BioProcess-UERJ conferidos pela FAPERJ (Processo 110.889/2010) e CNPq (Processo 307.370/2010-0) e pela empresa Estre Ambiental.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). (1984). *Análise Granulométrica: método de ensaio*, Rio de Janeiro;
- Bigorne. E., Cossu-Leguille. C., Bonnard. M.; Nahmani. J. (2010). Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm, *Chemosphere*, 80, 1109-1112;
- Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M. (1999). Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Organic Geochemistry*, 30, 947-952;
- Bonnard, M., Eom. I., Morel. J., Vasseur, P. (2009). Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia foetida*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 60-67;
- Canadian Soil Quality Guidelines. (2008). *Carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Environmental and human health effects)*, Canadian Council of Ministers of the Environmental, Montreal;
- Calisi A., Lionetto M. G., Schettino T. (2009). Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 1369-1377;
- Cianella, R.C. (2010). *Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5*, Dissertação (mestrado), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro;
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). (2009). Resolução nº 420 de dezembro de 2009. Brasília.
- Correia, F.V. & Moreira, J.C. (2010). Effects of Glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 85, 264-268;
- Cortet, J., Vauflery, A. G., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutants effects, *Eur. J. Soil Biol.*, 35, 115-134;
- Depledge, M.H & Fossi, M.C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates, *Ecotoxicology*, 3 (3), 161-172;

Di Marzio, V.D., Saenz, M. E., Lemière, S., Vasseur, P. (2005). Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 246-252;

Dutch Standard Soil Quality, (2009). Disponível em: <
<http://www.contaminatedland.co.uk/std-guid/dutch-l.htm#KEYWORD-FOUR>>
Acessado em: 25/01/2012.

Eom, I.C., Rast, C., Veber, A. M., Vasseur, P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatics hydrocarbon (PAH)-contaminated soil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 190-205;

Eyambe, G.S., Goven, A. J., Fitzpatrick, L.C, Venables, B. J., Cooper, E. L. (1991). A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies, *Laboratory Animals*, 25, 61-67;

International Agency for Research on Cancer (IARC), *IARC Monographs, Volume 92*, (2010). Disponível em: [http://: monographs.iarc.fr](http://monographs.iarc.fr) Acessado em: 15/01/12

International Organization for Standardization (ISO) (1993). *11268-1 Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*, Gênova;

International Organization for Standardization (ISO). (1993). *11268-2 Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms- Part 2: Determination of effects on reproduction*, Gênova;

Leet, J. K. & Richards, S. M. (2009). Genetic Ecotoxicology In: Santos E.B. (Ed) *Ecotoxicology Research Developments* (pp 61-87), Tennessee, Nova Science Publishers;

Lionetto, M. G., Calisi, A., Schettino, T. (2012). Earthworms biomarkers as tools for soil pollution assessment, *Soil Health and Land Use Management*, 16, 306-332;

Lors, C., Perie, F., Grand, C., Damidot, D. (2009) Benefits of ecotoxicological bioassays in the evaluation of a field biotreatment of PAHs of polluted soil, *Global NEST Journal*, 11(3), 251-259.

Manerikar, R.S., Apte, A.A, Ghole, V.S. (2008). In vitro and in vivo genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworms coleomocytes, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25, 63-68;

Manzo S., Nicola, F. D., Picione, F.D.L., Maisto, G., Alfani, A. (2008) Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests, *Chemosphere*, 71, 1937-1944;

OECD. (1984). *Guideline for testing of chemicals: earthworms acute toxicity test. N° 207*, Paris;

OECD. (2004). *Guideline for testing of chemicals: earthworms acute reproduction test. N° 222*, Paris;

Oga, S. (2008). *Fundamentos de Toxicologia*, 3ª Edition, Editora: Atheneu, São Paulo, 474p.

Roberts, B.L & Dorough, H.W. (1984). Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, 67-78

Ramos, A.S. (2007). *Eisenia foetida* como bioindicador na avaliação da toxicidade de solos contaminados por óleo cru e biorremediados, 81 p, Pós Graduação em Engenharia Ambiental, UERJ, Rio de Janeiro.

Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Caumartin, J., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S. Weeks, J.M., Sunahara, G.I. (2000) Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (7), 1764-1773;

Saterbak, A., Toy, R.J., MacMain, B.J., Williams, M.P., Dorn, P.B. (2000). Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11), 2643-2652;

Seabra, P.N.C. (2005). *Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo*, 169p Tese de Doutorado UFRJ Rio de Janeiro;

Shin, K.H. & Kim, K.W. (2001). Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia foetida*), *Environmental Monitoring and Assessment*, 70, 93-103;

Sissino, C.L.S. (2002). *Destino dos resíduos sólidos urbanos e industriais no estado do Rio de Janeiro: avaliação toxicidade dos resíduos e suas implicações para o ambiente e para a saúde humana*, 102p. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

Sforzini, S., Boeri, M., Dagnino, A., Oliveri, L., Bolognesi, C., Viarengo, A. (2012). Genotoxicity assessment in *Eisenia andrei* coelomocytes: A study of induction of DNA damage and micronuclei in earthworm exposed to B[a]P and TCDD spiked soils, *Mutation Research*, 746, 35-41;

Zhu, J., Zhao, Z., Lu, Y. (2006). Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm, *Journal of Environmental Science*, 18 (6), 1210-1215.