UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TAÍS SUELEN VIANA

Avaliação da ecotoxicidade da água produzida de petróleo antes e após diferentes tratamentos em organismos aquáticos (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*)

Ribeirão Preto
2020

TAÍS SUELEN VIANA

Avaliação da ecotoxicidade da água produzida de petróleo antes e após diferentes tratamentos em organismos aquáticos (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Taís Suelen Viana
Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado o apresentada ao Programa de Pós-Graduação Toxicologia em 27/01/20201. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Viana, Taís Suelen
Avaliação da ecotoxicidade da água produzida de petróleo antes e após diferentes tratamentos em organismos aquáticos (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*). Ribeirão Preto, 2020.
159 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Oliveira, Danielle Palma de.

1. Água produzida de petróleo. 2. *Danio rerio*. 3. *Daphnia smilis*. 4. *Vibrio fischeri*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Taís Suelen Viana
Título do trabalho: Avaliação da ecotoxicidade da água produzida de petróleo antes e após diferentes tratamentos em organismos aquáticos (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Taís Suelen Viana
Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma de direta ou inderatamente para a realização deste trabalho, que só pude concluir graças a confiança e força que depositaram em mim.

À minha orientadora Dra. Danielle Palma de Oliveira por ter concedido à mim a oportunidade de trabalhar no laboratório EcoHumanTox, agradeço a todas as conversas e opoio que me deu para que esse trabalho fosse concluído da melhor forma possível. Meu mais sincero obrigada por tudo.

Ao professor Dr. João Luís Teixeira Pestana e Dr. Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares por terem me recebido no *Department of Biology and Centre for Environmental and Marine Studies* (CESAM) durante meu estágio de pesquisa na Universidade de Aveiro (Portugal), muito obrigada por todo suporte que mederam durante esse período que foi muito importante para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também imensamente a Dr. Diana Campos por toda paciencia e apoio durante o estágio, deixo aqui meus mais sinceros agradecimentos pela amizade, te levarei para sempre no meu coração.

À todo Setor de Laboratórios de Ribeirão Preto da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), pela parceria e suporte.

À Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni do Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus Araraquara pela parceria que pudemos firmar durante todo esse tempo. Um agradecimento especial a Mariana e Juliana por todo apoio e suporte que me deram.

Aos meus colegais de laboratório que tive a aportunidade de conhecer e trabalhar juntamente no laboratório EcoHumanTox. Um agradecimento especial aqueles que estão guardados no meu coração, obrigada Taísa, Tamires, Flávia, Gabriela, Renan e Carol.

Aos meus amigos da casa 109, a todos que já passaram pela moradia da pós-graduação pela amizade e companheirismo durante todos esses anos que pudemos morar juntos. Um agradecimento especial aos meus amigos Guilherme, Alesson, Alan velho, Luiza, Nayara, Jéssica, Yasmin, Edison, Filipe e Vivi, vocês são muito especiais para mim, deixo aqui meu adeus (o resto vocês sabem) e obrigada por estarem comigo nessa jornada, vou levar cada um de vocês no meu coração e jamais esquecerei tudo o que fizeram por mim.

À minha família por terem me opoiado e por me darem suporte para que eu possa estar aqui hoje, obridada Mãe e Bêbe, eu amo vocês. Sem o amor de vocês eu não teria conseguido.

Aos meus amigos que estão distantes mas que sempre estiverem presentes na minha vida, vocês são a luz no meu caminho. Obrigada Taísa, Dulce, Fernanda, Marina, Jéssica, Everton, Paulo, Jéssica, Amanda, Rodolfo, Kelly e Luíz, eu sei que vocês sempre torceram por mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro no país (processo 2018/01010-3) e no exterior (processo BEPE 2019/03940-0). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigada.

A mim,
por todo amor e dedicação que
desempenhei neste trabalho.

“A carne mais barata do mercado não tá mais de graça”
Elza Soares

“A favela venceu, fogo nos racistas”

(Djonga)

“Ohana quer dizer família.
Família quer dizer nunca abandonar ou esquecer.”
(Lilo e Stitch)

RESUMO

VIANA, T. S. **Avaliação da ecotoxicidade da água produzida de petróleo antes e após diferentes tratamentos em organismos aquáticos (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*).** 2020. 165f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A água produzida (AP) por indústrias petrolíferas é um resíduo altamente impactante para os ecossistemas. Quando descartada em ambientes aquáticos, pode contaminar a biota ali presente, além de ocasionar danos muitas vezes irreversíveis aos ecossistemas afetados. Sua toxicidade é devido à variedade de compostos que a constitui, como metais e uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Considerando o potencial poluidor deste resíduo, a AP necessita tratamentos eficazes para seu posterior descarte no ambiente. Os tratamentos convencionais utilizados muitas vezes não são eficientes para remover a toxicidade deste tipo de resíduo, sendo necessário o desenvolvimento e padronização de tratamentos alternativos. Dentro deste contexto, destacam-se os processos oxidativos avançados (POAs), como fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica, e tratamento com matérias adsorventes como a vermiculita magnetizada (VMT-mag), técnicas utilizadas neste trabalho para tratamento da AP. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência destes tratamentos na redução da toxicidade induzida por duas amostras de AP, identificadas como água de petróleo 1 (AP1) e água de petróleo 2 (AP2), em organismos aquáticos. A amostra AP1 foi tratada por meio de POAs (fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica) e avaliada a toxicidade antes e após os tratamentos através dos organismos *Danio rerio* (zebrafish)*, Daphnia similis* e *Vibrio fischeri.* A amostra AP2 foi tratada com VMT-mag e avaliada a toxicidade antes e após o tratamento com os organismos *Vibrio fischeri, Daphnia similis, Daphnia magna, Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina.* As seguintes técnicas foram empregadas aos organismos: com o *Danio rerio* foi aplicado a técnica *Embryo Acute Toxicity* (FET) e avaliada a letalidade e subletalidade em estágios embrio-larvais; com a *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* teste de toxicidade aguda; com a *Daphnia magna* efeitos sobre reprodução e taxa intrínseca de crescimento populacional (r); com o *Chironomus riparius* avaliação da mortalidade, crescimento e emergência; com a *Dugesia tigrina* a avaliação da mortalidade, locomoção, alimentação e regeneração após decapitação. Nossos testes indicam toxicidade para todos os organismos avaliados: efeitos (mortalidade, escoliose, falha na inflação da bexiga natatória) no estágio embio-larval de *Danio rerio*; toxicidade aguda aos organismos *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*; efeitos sobre a emergência dos organismos machos e fêmeas de *Chironomus riparius*, redução no tamanho das cabeças e corpo das larvas na amostra sem tratamento; além de efeitos comportamentais sobre a atividade locomotora e regeneração da cabeça das planárias *Dugesia tigrina* expostas à AP sem tratamento; efeitos sobre a reprodução e taxa intrínseca de crescimento populacional (r) dos microcrustáceos *Daphnia magna* com maior intensidade à amostra não tratada. Este estudo revela uma redução da toxicidade da AP tratada, demonstrando a importância de seu tratamento para o descarte em ambientes aquáticos. Nossos dados mostram que a exposição de diferentes organismos à AP afeta parâmetros letais e subletais e, por isso, devem ser tratadas antes do lançamento em corpos d'água. Adicionalmente, nossos dados mostram que so tratamentos propostos devem ser aprimorados, a fim de atingir a eficiência na remoção de todos os efeitos testados.

Palavras-chave: Água produzida, petróleo, ecotoxicologia, *Danio rerio* (zebrafish)*, Daphnia similis*, *Vibrio fischeri, Daphnia magna, Chironomus riparius, Dugesia tigrina*, vermiculita, fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização, ozonização fotoeletrocatalítica.

ABSTRACT

VIANA, T. S. **Evaluation of ecotoxicity of water produced from oil before and after different treatments in aquatic organisms (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* and *Dugesia tigrina*).** 2020. 165f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Produced water (PW) by oil companies is a highly impacting waste for ecosystems. When discarded in aquatic environments, it can contaminate the biota present there, in addition to causing often irreversible damage to the affected ecosystems. Its toxicity is due to the variety of compounds that constitute it, such as metals and a variety of organic and inorganic compounds. Considering the polluting potential of this waste, PW needs effective treatments for its subsequent disposal in the environment. The conventional treatments used are often not efficient to remove the toxicity of this type of waste, requiring the development and standardization of alternative treatments. Within this context, the advanced oxidative processes (POAs) stand out, such as photocatalysis, photoelectrocatalysis, ozonization and photoelectrocatalytic ozonation, and treatment with adsorbent materials such as magnetized vermiculite (VMT-mag), techniques used in this work for the treatment of PW. Thus, the objective of the present work was to evaluate the efficiency of these treatments in reducing the toxicity induced by two samples of PW, identified as petroleum water 1 (AP1) and petroleum water 2 (AP2), in aquatic organisms. The AP1 sample was treated by means of POAs (photocatalysis, photoelectrocatalysis, ozonation and photoelectrocatalytic ozonation) and toxicity was evaluated before and after treatments using the organisms *Danio rerio* (zebrafish), *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. The AP2 sample was treated with VMT-mag and toxicity was evaluated before and after treatment with Vibrio fischeri, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* and *Dugesia tigrina*. The following techniques were used for the organisms: with Danio rerio, the Embryo Acute Toxicity (FET) technique was applied and lethality and subletality were evaluated in embryo-larval stages; with *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri* acute toxicity test; with Daphnia magna effects on reproduction and intrinsic population growth rate (r); with *Chironomus riparius* assessment of mortality, growth and emergence; with *Dugesia tigrina* the evaluation of mortality, locomotion, food and regeneration after beheading. Our tests indicate toxicity for all evaluated organisms: effects (mortality, scoliosis, failure of inflation of the swimming bladder) in the embio-larval stage of *Danio rerio*; acute toxicity to *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri;* effects on the emergence of male and female *Chironomus riparius* organisms, reduction in head and body size of larvae in the untreated sample; in addition to behavioral effects on locomotor activity and head regeneration of planar *Dugesia tigrina* exposed to AP without treatment; effects on reproduction and intrinsic population growth rate (r) of *Daphnia magna* microcrustaceans with greater intensity to the untreated sample. This study reveals a reduction in the toxicity of the treated PW, demonstrating the importance of its treatment for disposal in aquatic environments. Our data show that the exposure of different organisms to PW affects lethal and sublethal parameters and, therefore, must be treated before being released into bodies of water. In addition, our data shows that the proposed treatments must be improved in order to achieve efficiency in removing all tested effects.

Keywords: Produced water, oil, ecotoxicology, Danio rerio (zebrafish), Daphnia similis, Vibrio fischeri, Daphnia magna, Chironomus riparius, Digresia tigrina, vermiculite, photocatalysis, photoelectrocatalysis, ozonization, photoelectrocatalytic ozonation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transformação termoquímica da matéria orgânica e a geração do petróleo 19

Figura 2. Ilustração da configuração típica de uma jazida de petróleo 20

Figura 3. Tipos de extração de petróleo. (A) produção em terra (*onshore*). (B) produção no mar *(offshore).* 21

Figura 4. Volume diário de Água Produzida de Petróleo em terra e no mar em comparação a produção toatal de óleo de 1992 a 2014. 27

Figura 5. Principais técnicas utlizadas para tratamento da Água Produzida de Petróleo (AP). 31

Figura 6. Estrutura da vermiculita, empregada no tratamento de amostras de água produzida de petróleo. 34

Figura 7. Peixes da espécie *Danio rerio* 37

Figura 8. Estágios de desenvolvimento embrionário do zebrafish até 144 horas pós fertilização (hpf) 39

Figura 9. Placas de petri contendo colônias de *Vibrio fischeri* 40

Figura 10. Microcrustáceo *Daphnia similis* 42

Figura 11. Inseto da espécie *Chironomus riparius* 43

Figura 12. Organismo *Dugesia tigrina* 45

Figura 13 Mudanças temporais no número de artigos em periódicos que relatam a utilização de planárias de água doce (barras cinza) e efeitos tóxicos específicos em planárias (barras pretas) (1900–2017) 47

Figura 14. Mapa de localização da Bacia Potiguar, Rio Grande do Norte, Brasil 53

Figura 15. Amostras de água produzida de petróleo, AP1 e AP2, sem tratamento mantidas resfriadas 54

Figura 16. Esquema ilustrativo dos testes realizados com cada amostra de água produzida (AP1 e AP2), antes e após os diferentes tipos de tratamento 54

Figura 17. Esquema ilustrativo dos laboratórios onde foram realizados cada um dos testes de toxicidade 55

Figura 18. Representação esquemática do: (A) ânodo Ti / TiO_2NTs com uma abertura lateral de 2 cm para o fluxo da solução; (B) o reator de 57

bolhas anulares, com injeção de microbolhas através de um difusor de vidro sinterizado. No centro, é possível encontrar um eletrodo cilíndrico de Ti/TiO_2NT irradiado internamente por uma lâmpada de 36 W UV-C e polarizado sob 2,5 V usando uma fonte de alimentação versus duas hastes de grafite .....

Figura 19. Aquário de reprodução de peixes da espécie *Danio rerio,* contendo dois machos e uma fêmea 59

Figura 20. Esquema ilustrativo da exposição de zebrafish para a realização do ensaio ao Fish Embrio Test (FET) 60

Figura 21. Esquema do teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* 63

Figura 22. Esquema ilustrativo do teste de toxicidade aguda com Daphnia similis em uma diluição 64

Figura 23. Medição da *Daphnia magna* adulta ao final do teste de 21 dias 65

Figura 24. Esquema ilustrativo do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna* 66

Figura 25. Teste de toxicidade crônica com *Chironomus riparius* – (A) Sistema com menos de 24h sem aeração. (B) Sistema completo, com aeração 67

Figura 26. Medições das larvas de *Chironomus riparius*. (A) Cabeça. (B) Corpo 68

Figura 27. *Chironomus riparius* separados para pesagem. (A) Secagem dos organismos guardados em etanol. (B) Pesagem individual dos organismos 68

Figura 28. Esquema ilustrativo do teste de toxicidade crônica com *Chironumos riparius* 69

Figura 29. Planária *Dugesia tigrina* com aproximadamente 1 cm, utilizada nos testes de toxicidade 70

Figura 30. Esquema ilustrativo a exposição das planárias *Dugesia tirgrina* para avaliação dos parâmetros de locomoção e alimentação 71

Figura 31. Planária *Dugesia tigrina* no teste de locomoção sobre prato transparente contendo linhas de grades de 0,5 cm 72

Figura 32. Avaliação de inibição alimentar com Planária *Dugesia tigrina*. (A) *Chironomus riparius* com 7 dias utilizados na alimentação das planárias. (B) Exposição individual das planárias com disposição de alimento em placas de 6 poços 72

Figura 33. Planária *Dugesia tigrina* decapitada acima da faringe para avaliação do crescimento da cabeça e regeneração dos fotorreceptores e aurículas 73

Figura 34. Esquema representativo do teste de regeneração da planária *Dugesia tigrina* 73

Figura 35. Avaliação da letalidade de *Danio rerio* expostos à amostra de água produzidade de petróleo. (A) Ovo coagulado observado após 24 hpf de exposição de embriões de Zebrafish à água de petróleo tratada por fotocatálise (diluição a 25%). (B) Organismo morto após 144 hpf, exposto a água de petróleo após o tratamento combinado de O_3 + fotoeletrocatálise de 12,5% 79

Figura 36. Embrião de zebrafish com falha na eclosão. (A) Organismo com 96 hpf exposto à AP1 diluída a 12,5%. (B) Organismo com 96 hpf exposto à AP tratada com O_3 (diluição de 12,5%) com dificuldade de eclosão 79

Figura 37. Larva de zebrafish com 144 hpf, exposto a água produzida de petróleo bruta, diluída a 12,5%, com malformação esquelética (escoliose) 80

Figura 38. Larva de zebrafish com 144 hpf exposto à água produzida de petróleo tratada por fotoeletrocatálise, diluída a 12,5%, com falha na inflação da bexiga natatória 80

Figura 39. Mortalidade observada após a exposição de embriões de zebrafish à amoastras tratadas por processos oxidativos avançados (POAs) em relação a amostra bruta, em diluições de 12,5% 81

Figura 40. Taxa de deformidades esqueléticas (escoliose) detectadas nos organismos expostos (*Danio rerio*) em relação aos tratamentos por processos oxidativos avançados (POAs) e a amostra de água produzida 1 sem tratamento, em diluições de 12,5% 82

Figura 41. Taxa de falha de eclosão nos organismos expostos (*Danio rerio*) em relação aos tratamentos por processos oxidativos avançados (POAs) e a amostra de água produzida 1 sem tratamento, em diluições de 12,5% 83

Figura 42. Comparação da falha na inflação da bexiga natatória nas larvas de Zebrafish expostos) em relação aos tratamentos por processos oxidativos avançados (POAs) e a amostra de água produzida 1 sem tratamento, em diluições de 12,5% 85

Figura 43. Inibição de luminescência observada nas bactérias *Vibrio fischeri* expostas a diferentes concentrações da (A) água produzida 1 (AP1) e após o tratamento por: (B) fotocatálise; (C) fotoeletrocatálise; (D) ozonização; e (E) ozonização fotoeletrocatalítica 87

Figura 44. Gráfico de comparação da porcentagem de mortalidade da *Daphnia similis* em relação ao controle negativo. (A) Água produzida AP1 sem tratamento. (B) AP1 tratada por fotocatálise. (C) AP1 tratada por fotoeletrocatálise. (D) AP1 tratada por ozonização. (E) AP1 tratada por ozonização fotoeletrocatalítica ... 89

Figura 45. Inibição de luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* exposta a diferentes concentrações. A) água produzida 2 (AP2) sem tratamento. B) AP2 tratada com a vermiculita magnetizada (VMT-mag) 93

Figura 46. Porcentagem de imobilidade em *Daphnia similis* em relação ao controle negativo. A) Água produzida de petóleo (AP2) sem tratamento. B) AP2 tratada com Vermiculita magnetizada (VMT-mag) 96

Figura 47. Mortalidade (%) de *Daphnia magna* ao final de 21 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 97

Figura 48. Número total de neonatos reproduzidos ao final de 21 dias de exposição da *Daphnia magna* às amostras de AP com e sem tratamento 97

Figura 49. Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) do número de neonatos reproduzidos ao final de 21 dias de exposição da *Daphnia magna* às amostras de AP2 com e sem tratamento 98

Figura 50. Tamanho (mm) final das *Daphnias magna* (mães) ao final de 21 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 102

Figura 51. Porcentagem de emergência dos mosquitos (*Chironomus riparius*) expostos a diferentes diluições da água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 105

Figura 52. Tempo total (dias) de emergência dos mosquitos (*Chironomus riparius*) expostos à diferentes diluições das amostras de água diluida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 105

Figura 53. Tempo (dias) de emergência dos organismos macho (*Chironomus riparius*) expostos à diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 106

Figura 54. Tempo (dias) de emergência dos organismos fêmeas (*Chironomus riparius*) expostos à diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 106

Figura 55. Peso (mg) dos *Chironmus riparius* machos expostos a diferentes diluições da água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) ao final de 10 dias 109

Figura 56. Peso (mg) dos *Chironmus riparius* fêmeas expostos a diferentes diluições de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) ao final de 10 dias 109

Figura 57. Tamanho do corpo (mm) das larvas de *Chironomus riparius* ao final de 10 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) em diferentes diluições 111

Figura 58. Tamanho (mm) do cabeça das larvas de *Chironomus riparius* ao final de 10 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 113

Figura 59. Número de linhas de grades cruzadas durante 3 minutos pelas planárias (*Dugesia tigrina*) após exposição de 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 115

Figura 60. Número de larvas de *Chironomus riparius* (7 dpe) consumidos pelas planárias (*Dugesia tigrina*) após exposição de 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 116

Figura 61. Tempo (dias) de regeneração dos fotorreceptores das planárias (*Dugesia tigrina*) expostas por 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) antes e após o tratamento com vermiculita magnetizada (VTM-mag) 119

Figura 62. Tempo (dias) de regeneração das aurículas das planárias (*Dugesia tigrina*) expostas por 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) antes e após o tratamento com vermiculita magnetizada (VTM-mag) 119

Figura 63. Níveis tróficos dos organismos utilizados na avaliação da toxicidade das amsotras de água produzida de petróleo, utilizados no presente trabalho 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frações típicas do petróleo	18
Tabela 2	Comparação das necessidades de água e geração de Água Produzida	22
Tabela 3	Principais componentes e sua concentração encontrada em amostras de água produzida de petróleo	23
Tabela 4	Efeitos observados decorrentes da exposição de diferentes organismos aquáticos à amostras de água produzida de petróleo (AP) e água produzida a partir do retorno de fraturamento hidráulico (APFH) encontrados na literatura	47
Tabela 5	Condições empregadas em cada um dos tratamentos oxidativos avançados realizados com a amostra 1 de água produzida	55
Tabela 6	Parâmetros avaliados em cada etapa de desenvolvimento dos embriões de zebrafish	61
Tabela 7	Compostos orgânicos com as suas respectivas abundâncias d íon molecular obtidos para a água produzida 1 (AP1) antes e ap os tratamentos com as técnicas fotocatálise (FC), fotoeletrocatáli (FEC), ozonização (O_3) e ozonização fotoeletrocatalíti ($FEC+O_3$)	77
Tabela 8	Efeitos observados após a exposição de embriões de zebrafish a diferentes diluições da amostra gerada após o tratamento de água de petróleo por fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e fotoeletrocatálise + ozonização. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão	79
Tabela 9	Valores correspondentes a CL_{50} e CE_{50} para os efeitos induzidos em embriões de zebrafish expostos às amostras de água produzida (AP) bruta e após os tratamentos por processos oxidativos avançados	86
Tabela 10	Número total de neonatos (*Daphnia similis*) imóveis após exposição a diferentes diluições da amostra de água produzida de petróleo com e sem tratramentos	88
Tabela 11	Valores correspondentes a CL_{50} induzidos em *Daphnia similis* no teste de toxicidade aguda	90
Tabela 12	Lista das substâncias encontradas na água produzida 2 (AP2) por Cromatografia à gás, acoplada à espectrometria de massas	92
Tabela 13	Número total de neonataos (*Daphnia similis*) imóveis por réplica (triplicata) após exposição a amostra de água produzida de	95

petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) .....

Tabela 14 Número total de nenotos (*Daphnia magna*) por réplica das diferentes diluições testadas para água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) ao longo de 21 dias 99

Tabela 15 Tamanho (mm) final das *Daphnia magna* ao final de 21 dias de exposição a diferentes diluições da amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag 102

Tabela 16 Número total de organismo mortos no teste de toxicidade aguda com neonatos de *Chironomus riparius* expostos a diferentes concentrações da amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 104

Tabela 17 Tamanho (mm) médio do corpo das larvas dos *Chironomus riparius* expostos a diferentes diluições de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 110

Tabela 18 Tamanho (mm) médio da cabeça das larvas dos *Chironomus riparius* expostos a diferentes diluições da água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 113

Tabela 19 Número total de organismo mortos no teste de toxicidade aguda com *Dugesia tigrina* expostas a diferentes concentrações da amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) 114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Água produzida
°C	Graus Celcius
ABNT	Assossiação Brasileira de Normas Técnicas
AP1	Água produzida 1
AP2	Água produzida 2
APFH	Água produzida a partir do retorno de fraturamento hidráulico
APs	Águas produzidas
ASTM	*American Society for Testing and Materials*
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
C. riparius	*Chironomus riparius*
CESAM	*Centre for Environmental and Marine Studies*
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
COD	Demanda de oxigênio químico
D. magna	*Daphnia magna*
D. rerio	*Danio rerio*
D. similis	*Daphnia similis*
D. tigrina	*Dugesia tigrina*
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FET	*Fish Embryo Test*
GLP	Gás liquefeito de petróleo
h	Horas
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
hpf	Horas pós fertilização
INCT-DATREM	Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos
IQ	Instituto de Química
mm	Milímetro
NBT	Norma Brasileira
TDS	sólidos dissolvidos totais
TOC	carbono orgânico total
TSS	Sólidos suspensos totais
UNESP	Universidade Estadual Paulista

V. ficheri	*Vibrio fischeri*
VMT-mag	Vermiculita magnetizada

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras Iii
Lista de tabelas Viii
Lista de abreviaturas e siglas X
1. INTRODUÇÃO 15
1.1 Água produzida (AP) 17
1.1.1 Impacto ambiental gerado pelo descarte de AP 27
1.1.2 Formas alternativas de tratamento da AP 30
1.1.2.1 Procesos Oxidativos Avançados (POAs) 31
1.1.2.2 Vermiculita 33
1.2 Organismos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos 35
1.2.1 Danio rerio 37
1.2.2 Vibrio fischeri 40
1.2.3 Daphnia similis e Daphnia magna 42
1.2.4 Chironomus riparius 43
1.2.5 Dugesia tigrina 45
1.2.6 Organismos já testados em AP 47
2. OBJETIVOS 50
3. MATERIAIS E MÉTODOS 52
3.1 Coleta das amostras de água produzida de petróleo 53
3.1.1 Tratamento AP1 55
3.1.2 Tratamento AP2 57
3.2 Salinidade 58
3.3 *Danio rerio* 58
3.3.1 Manutenção e obtenção dos ovos de Danio rerio 58
3.3.2 *Fish Embrio Test* (FET) 59
3.4 *Vibrio fischeri* 61
3.5 *Daphnia similis* 63
3.6 *Daphnia magna* (clone BEAK) 64
3.7 *Chironomus riparius* 66
3.7.1 Toxicidade aguda (Chironomus riparius) 66

3.7.2 Toxicidade crônica (Chironomus riparius) 66
3.8 *Dugesia tigrina* 69
3.8.1 Toxicidade agudam 70
3.8.2. Parâmetros Comportamentais 70
3.8.3. Parâmetro de regeneração 72
3.9 Análise estatística 73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
4.1 Estrutura 76
4.2 Amostra de água produzida de petróleo n. 1 (AP1) 76
4.2.1 Tratamento com POAs 76
4.2.2 Danio rerio 78
4.2.3 Vibrio Fischeri 86
4.2.4 Daphnia smilis 88
4.3 Amostra de água produzida de petróleo n. 2 (AP2) 91
4.3.1 Tratamento com Vermiculita magnetizada 91
4.3.2 Vibrio fischeri (Microtox) 93
4.3.3 Daphnia similis 95
4.3.4 Daphnia magna (clone BEAK) 96
4.3.5 Chironomus riparius 103
4.3.6 Dugesia tigrina 114
4.4 Discussão geral 121
5. CONCLUSÕES 123
REFERÊNCIAS 125

Capítulo
01

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Água produzida (AP) é um resíduo gerado pelo segmento petrolifero, que pode conter diferentes substâncias, tais como metais e compostos orgânicos e inorgânicos. Estes compostos podem ser nocivos ao ambiente, principalmente para ecossistemas aquáticos. Devido ao potencial poluidor desta amostra, a comunidade científica vem se mobilizando para tentar reduzir os impactos relacionados ao setor petroleiro, propondo tratamentos eficazes na redução e/ou remoção da toxicidade das águas produzidas (APs). Dentro deste contexto, este trabalho foi desenvolvido para responder a seguinte pergunta:

"A água produzida por empresas petrolíferas antes e após tratamentos pode ocasionar efeitos tóxicos à organismos aquáticos?"

Assim, nossa hipótese é que a AP seja um contaminante em potencial à biota aquática e necessita de tratamentos eficazes para a redução do impacto ambiental durante o processo produtivo do petróleo.

Desta maneira, foi realizado um trabalho multidisciplinar, em parceria com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni do Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus Araraquara, que juntamente com o nosso laboratório, participa do Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (INCT-DATREM). O grupo do IQ desenvolveu e padronizou diferentes tipos de tratamentos que foram aplicados a duas amostras distintas de AP.

Colaborando com esta rede multidisciplinar, nosso grupo, em parceria com o Setor de Laboratórios de Ribeirão Preto da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) sob supervisão do Gerente Dr. Eduardo Angelino Savazzi avaliou a eficiência dos tratamentos utilizando ensaios ecotoxicológicos, visando demonstrar a eficácia dos tratamentos das AP, na remoçaõ e/ou redução da toxicidade em organismos aquáticos. Adicionalmente, parte da avaliação ecotoxicológica das amostras foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. João L. T. Pestana, professor do *Department of Biology and*

Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), da Universidade de Aveiro, Portugal, durante a realização do estágio de pesquisa no exterior (BEPE 2019/03940-0), financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no período de 01/04/2019 a 28/09/2019.

1.1 Água produzida (AP)

As exigências do mercado consumidor na sociedade moderna, tanto relacionadas com a intensidade de consumo, quanto com a diversidade de produtos comercialmente disponíveis levou ao amplo desenvolvimento industrial. Mas trouxe como consequência a maior utilização de recursos naturais, especialmente combustíveis fósseis, como o petróleo e seus derivados, como gás liquefeito, gasolina, óleo diesel, querosene, asfalto, entre outros (ALMEIDA, 2006).

Além do uso intenso como combustível para variadas aplicações, os derivados de petróleo também constituem a matéria prima de diversos produtos industrializados, como tecidos sintéticos, colas, solventes, fitas adesivas, materiais plásticos, produtos de vitrificação, tintas, inseticidas, entre outros (ALMEIDA, 2006), que são produtos essenciais e de difícil substituição. Desta forma, o petróleo tornou-se um composto praticamente indispensável nos dias atuais. Porém, infelizmente, a indústria petrolífera, seja na extração do petróleo ou na produção de óleo e gás, é uma das atividades que acarretam grande impacto para o meio ambiente, independente do aspecto observado. Durante todas as etapas produtivas deste setor existem processos potencialmente poluidores (FRASER; ELLIS, 2009).

Petróleo, palavra derivada do latim *petra* (pedra) e *oleum* (óleo), no estado líquido é uma mistura complexa oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre negro e castanho-claro. Os óleos obtidos de diferentes reservatórios de petróleo possuem características diferentes, entretanto, todos possuem composição elementar semelhante, com cerca de 14% de hidrogênio e 87% de carbono, mostrando que seus principais constituintes são hidrocarbonetos. Outros constituintes aparecem sob a forma de compostos orgânicos, sendo os mais comuns o enxofre (0,06 a 8%), nitrogênio (0,11 a 1,7%) e oxigênio (0,1 a 2%). Além disso, metais também

podem ocorrer como sais de ácidos orgânicos, perfazendo cerca de 0,3% da composição do petróleo (THOMAS et al., 2001).

O estado físico do petróleo pode ser definido de acordo com o tamanho de suas moléculas. Quando a maioria é pequena, o seu estado físico é gasoso, por outro lado, quando são grandes, seu estado físico é liquido, nas condições normais de temperatura e pressão. Devido à complexidade da mistura de constituintes presentes no petróleo, normalmente a separação é feita de acordo com a faixa de ebulição dos compostos, obtendo frações típicas com características diferentes, como mostrado na Tabela 1 (THOMAS et al., 2001).

Tabela 1 – Frações típicas do petróleo

Fração	Temperatura de ebulição (°C)	Composição aproximada	Usos
Gás residual	–	$C_1 – C_2$	Gás combustível.
Gás liquefeito de petróleo (GLP)	Até 40	$C_3 – C_4$	Gás combustível engarrafado, uso doméstico e industrial.
Gasolina	40 – 175	$C_5 – C_{10}$	Combustível de automóveis, solvente.
Querosene	175 – 235	$C_{11} – C_{12}$	Iluminação, combustível de aviões e jato.
Gasóleo leve	235 – 305	$C_{13} – C_{17}$	Diesel, fornos.
Gasóleo pesado	305 – 400	$C_{18} – C_{25}$	combustível, matéria-prima para lubrificantes.
Lubrificantes	400 – 510	$C_{26} – C_{38}$	Óleos lubrificantes
Resíduo	Acima de 510	C_{38+}	asfalto, piche, impermeabilizantes.

Fonte: Adaptado de Thomas et al. (2001).

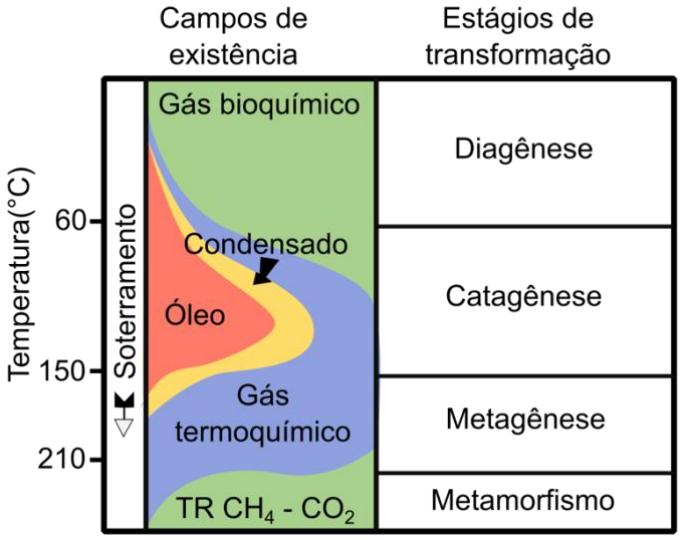
Como já citado, o petróleo é um combustível fóssil utilizado em vários seguimentos industriais, sendo considerado a maior riqueza de diversos países. Sua origem é decorrente da decomposição de matéria orgânica junto aos sedimentos, sob condições termoquímicas favoráveis para sua formação (SOUZA, 2010). A matéria orgânica é originada, fundamentalmente, de microrganismos e algas (que formam o fitoplâncton) ou por vegetais superiores, sob condições não-oxidantes em um ambiente de decomposição composto de sedimentos de baixa permeabilidade (ex. argila), de forma a inibir a ação da água circulante em seu interior (THOMAS et al., 2001).

Após a incorporação de matéria orgânica ao sedimento, ocorre o aumento da carga sedimentar e da temperatura, iniciando, então, o processo de formação (Figura 1) que passa pelos seguintes estágios evolutivos: diagênese,

catagênese, metagênese e metamorfismo. No estágio de diagênese, em temperaturas consideradas baixas (cerca de 65°C), ocorre atividade microbiana que transforma a matéria orgânica em querogênio, gerando metano bioquímico ou biogênico. Dando continuidade ao processo, na catagênse, ocorre aumento da temperatura para até 165°C, levando a quebra das moléculas de querogênio resultando na geração de hidrocarbonetos líquidos e gás. Na metagênese, a temperatura sobe para 210°C, ocorrendo quebra das moléculas dos hidrocarbonetos líquidos transformando-os em gás leve. Por fim, ocorre o metamorfismo, que através da elevação da temperatura o hidrocarboneto gerado é degradado, dando origem ao grafite, gás carbônico e alguns resíduos de metano (THOMAS et al., 2001).

O processo que leva à formação do petróleo é desencadeado pela interação desses fatores – matéria orgânica, sedimento e condições termoquímicas apropriadas (THOMAS et al., 2001).

Figura 1 – Transformação termoquímica da matéria orgânica e a geração do petróleo

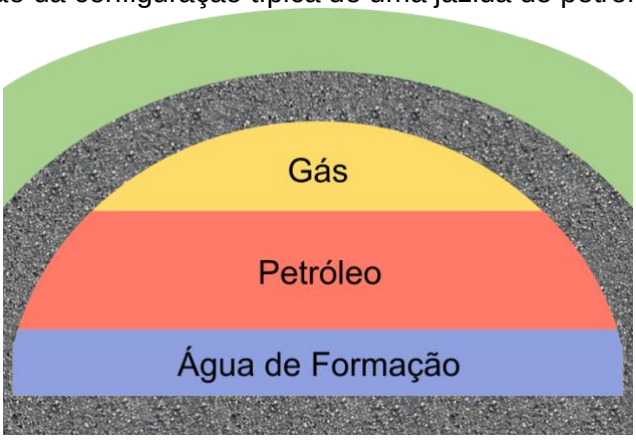


Fonte: Adaptado de Thomas et al. (2001).

As jazidas de petróleo e gás natural são formadas quando a geologia do terreno é favorável, ou seja, quando o óleo fica preso entre as camadas de rochas impermeáveis. Nas jazidas, a camada de petróleo é recoberta por uma camada de gás natural que flutua sobre uma de água salgada (água de formação), como ilustra a Figura 2. A extração é realizada por meio da perfuração de poços, por onde o petróleo jorra devido à pressão dos gases.

Contudo, quando a pressão é insuficiente, é necessário fazer o bombeamento do óleo (ALMEIDA, 2006).

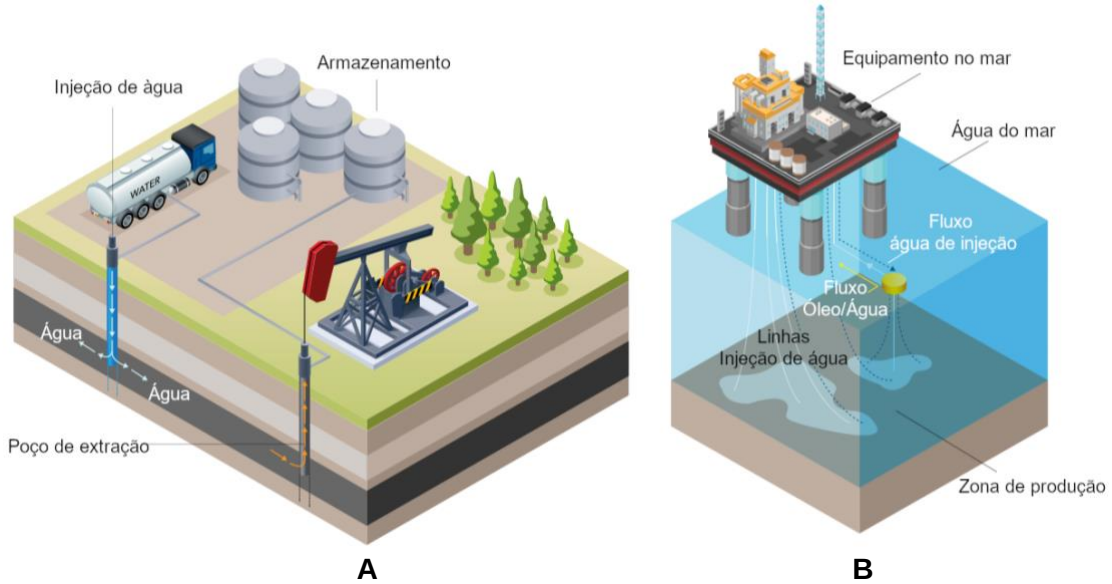
Figura 2 – Ilustração da configuração típica de uma jazida de petróleo.



Fonte: Autora.

Independente da formação original, a extração de petróleo é uma atividade potencialmente poluidora. Dentre os processos poluidores, podemos destacar a extração do petróleo tanto em zonas de produção em terra (*onshore*) quanto no mar (*offshore*) (MONDAL; WICKRAMASINGHE, 2008). No decorrer das atividades *offshore* (Figura 3A), as principais interações entre o meio ambiente e a operação da indústria de petróleo e gás, ocorrem basicamente na coluna d'água e no sedimento. Os impactos na coluna d'água se devem a fase de perfuração, decorrentes dos descartes operacionais. Já o sedimento marinho é suscetível a qualquer contaminante que precipite, após o contato com o ambiente aquático. Ainda que os oceanos tenham alta capacidade de redistribuição e diluição de contaminantes, esse compartimento, especialmente o sedimento possui grande tendência de acumular partículas ao longo do tempo (OGP, 2012 apud GOMES, 2014). Em atividades *onshore* (Figura 3B), as principais alterações observadas no ambiente onde ocorrem as atividades de exploração e produção de petróleo, são o desmatamento, destruição de ecossistemas, contaminação química do solo e de corpos hídricos (como contaminação de aquíferos), restrições a movimentação de fauna silvestre, além de riscos à saúde e segurança das populações do entorno, como o deslocamento de comunidades (MONTEIRO; JERÔNIMO, 2012).

Figura 3 – Tipos de extração de petróleo. (A) produção em terra (*onshore*). (B) produção no mar *(offshore).*



A **B**

Fonte: Adaptado de Xylem (2015).

Além disso, estas atividades produzem resíduos aquosos chamados águas produzidas (AP) também conhecidas como água de petróleo, sendo responsável pela maior parcela de resíduos provenientes dos processos produtivos de empresas petrolíferas (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009; GABARDO, 2007; MONDAL; WICKRAMASINGHE, 2008, VEIL et al., 2004).

Toda água em contato com o recurso de hidrocarboneto presente em um reservatório que é processada na superfície com o petróleo bruto ou gás natural é considerada como AP (VEIL et al., 2004). Rochas naturais em formações subsuperficiais são normalmente permeadas com fluidos como água, óleo ou gás, ou alguma combinação desses fluidos e, provavelmente as rochas das formações de petróleo estavam completamente saturadas com água antes da invasão e captura de petróleo (AMYX et al., 1960 apud VEIL et al., 2004). Como mostrado na Figura 2, as rochas que constituem os reservatórios normalmente contêm hidrocarbonetos de petróleo (líquido e gás) e água, pois os hidrocarbonetos menos densos migram para locais de captura, deslocando parte da água da formação para se tornarem reservatórios de hidrocarbonetos. Esta água aprisionada de forma natural é denominada como "água conata" ou "água de formação" e se torna água produzida (AP) apenas quando o reservatório é perfurado e seus fluidos são trazidos a superfície para produção de petróleo. As fontes dessa água incluem o fluxo acima ou abaixo da zona de hidrocarbonetos,

o fluxo de dentro da zona de hidrocarbonetos ou o fluxo de fluidos injetados e aditivos resultantes das atividades de produção (VEIL et al., 2004).

A água desempenha um papel extremamente importante durante a produção de petróleo e gás, sendo ela um elemento necessário para apoior a perfuração e fraturamento e, consequentemente, promover a produção adicional em muitas formações. A AP é gerada a partir de todos os tipos de poços de petróleo e gás, onde o volume e as características e perfil da taxa de fluxo variam bastante na forma com que o petróleo e gás são produzidos. A Tabela 2 mostra exemplos da necessidade de água e a consequente geração de AP para cada tipo de produção de empresas petrolíferas (VEIL, 2015).

Tabela 2 - Comparação das necessidades de água e geração de Água Produzida

Tipo de produção de petróleo e gás	Necessidades de água para produção	Água Produzida Gerada
Óleo e Gás Convencionais	- Necessidades modestas de perfuração e necessidade adicional de alguns poços que usam fraturamento hidráulico; - Normalmente, é necessária muita água para melhorar a recuperação à medida que o campo amadurece.	- Baixo volume inicialmente; - Aumento do volume ao longo do tempo; - Produção de água produzida ao longo da vida.
Cama metano de carvão	- Necessidades modestas de fraturamento hidráulico.	- Alto volume de água produzida inicialmente; - Diminui com o tempo.
Óleo e Gás de Xisto	- Grandes necessidades de fraturamento hidráulico.	- A taxa de retorno inicial é alta, mas cai rapidamente para muito baixa; - Baixo retorno da vida útil e produção de água produzida.
Petróleo Pesado	- Inundação de vapor para ajudar a transferir óleo pesado para os poços de produção - A produção de vapor requer água muito limpa para a alimentação da caldeira.	- Grande parte das águas residuais resulta do vapor injetado usado nas inundações de vapor.
Areias de óleo	- Injeção de vapor (ou água) usada em grandes volumes.	- Para métodos de produção *in situ*, um pouco de água é água de formação, mas grande parte é do vapor injetado; - Os métodos de produção de mineração de areia de petróleo e as etapas de processamento subsequentes também geram águas residuais.

Fonte: Adaptado de Veil (2015).

Tendo em vista que grande parte da AP é formada por água confinada (água de formação), a composição e características das substâncias químicas

que ocorrem de forma natural na AP estão relacionadas às particularidades de cada reservatório no que diz respeito à formação geológica, podend;;o conter compostos complexos que variam de concentração entre poços e ao longo da vida de um poço (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011). Dependendo da formação geológica que a AP é retirada, essa pode ser pelo menos quatro vezes mais salgada que água do mar, podendo conter metais, compostos radioativos entre outros compostos (FARAG; HARPER, 2014). Assim, a AP é uma moistura complexa composta por componentes de óleo dissolvidos e dispersos, minerais de formação, gases dissolvidos (como CO_2 e H_2S) e produtos sólidos, sendo que a composição orgânica e inorgânica varia de acordo com a formação geológica do poço e a vida útil do reservatório, assim como do tipo de hidrocarboneto produzido (IGUNNU, CHEN, 2014; MURRAY-GULDE et al., 2003). Os principais compostos encontrados na AP e suas concentrações são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais componentes e sua concentração encontrada em amostras de água produzida de petróleo.

Parâmetro	Concentração (mg/l)	Referências
Parâmetros mais importantes		
COD	1220 – 2600	(NASIRI; JAFARI, 2017; TIBBETTS et al., 1992; FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; EKINS; VANNER; FIREBRACE, 2007.)
TSS	1,2 – 1000	(IGUNNU; CHEN; 2014; NASIRI; JAFARI, 2017, TIBBETTS et al., 1992; FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; OZGUN et al., 2013.)
TOC	0 – 1500	(IGUNNU; CHEN; 2014; FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; NEFF; SAUER; HART, 2011.)
TDS	100 – 400.000	(DOLAN; CATH; HOGUE, 2018; FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; OZGUN et al., 2013; BREIT; OTTON, 2002; GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011; MANTELL, 2011.)
Ácidos orgânicos totais	0,001 – 10000	(IGUNNU; CHEN; 2014; NEFF; SAUER; HART, 2011; NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011.)
Produtos químicos para tratamento de produção		
Glicol	7,7 – 2000	(IGUNNU; CHEN, 2014; JOHNSEN et al., 2004.)
Inibidor de corrosão	0,3 – 10	(IGUNNU; CHEN, 2014; JOHNSEN et al., 2004.)

Inibidor de escala	0,2 – 30	(IGUNNU; CHEN, 2014; JOHNSEN et al., 2004.)
BTEX		
Benzeno	0,032 – 778,51	(OGP, 2002; NEFF; SAUER; HART, 2011; DÓREA, et al. 2007; KHAN, et al. 2016.)
Etilbenzeno	0,026 – 399,84	(OGP, 2002; NEFF; SAUER; HART, 2011; DÓREA, et al. 2007; KHAN, et al. 2016.)
Tolueno	0,058 – 5,86	(OGP, 2002; NEFF; SAUER; HART, 2011; DÓREA, et al. 2007; KHAN, et al. 2016.)
Xileno	0,01 – 1,29	(OGP, 2002; NEFF; SAUER; HART, 2011; DÓREA, et al. 2007; KHAN, et al. 2016.)
BTEX total	0,73 – 24,1	(OGP, 2002; TIBBETTS et al., 1992; OZGUN et al., 2013; OREM et al, 2014.)
Outros poluentes		
Hidrocarbonetos saturados	17 – 30	(NEFF; SAUER; HART, 2011; NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011.)
Óleo e graxas totais	2 – 560	(NASIRI; JAFARI, 2017; FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; OZGUN et al., 2013; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011.)
Fenol	0,001 – 10.000	(IGUNNU; CHEN; 2014; NASIRI; JAFARI, 2017, TIBBETTS et al., 1992; OZGUN et al., 2013.)
Metais		
Na	0 – 150.000	(TIBBETTS et al., 1992; BREIT; OTTON, 2002; KHAN, et al. 2016; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
Sr	0 – 6.250	(TIBBETTS et al., 1992; KHAN, et al. 2016; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011; FILLO; KORAIDO; EVANS, 1992.)
Zn	0,01 – 35	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
Li	0,038 – 64	(TIBBETTS et al., 1992; KHAN, et al. 2016; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
Al	0,4 – 410	(TIBBETTS et al., 1992; KHAN, et al. 2016; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
As	0,002 – 11	(FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; EKINS; VANNER; FIREBRACE, 2007; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011.)
Ba	0 – 850	(TIBBETTS et al., 1992; KHAN, et al. 2016; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011; FILLO; KORAIDO; EVANS, 1992.)
Cr	0,002 – 1,1	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011.)
Fe	0,1 – 1.100	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)

Mn	0,004 – 175	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
K	24 – 4.300	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
Pd	0,008 – 0,88	(TIBBETTS et al., 1992; FAKHRU'L-RAZI et al, 2009; EKINS; VANNER; FIREBRACE, 2007; BHADJA; KUNDU, 2012.)
Ti	0,01 – 0,7	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011.)
Outros íons		
Ba	5 – 95	(TIBBETTS et al., 1992; KHAN, et al. 2016; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011; FILLO; KORAIDO; EVANS, 1992.)
Ca^{2+}	0 – 74.000	(TIBBETTS et al., 1992; BREIT; OTTON, 2002; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
SO_4^{2-}	0 – 15.000	(TIBBETTS et al., 1992; BREIT; OTTON, 2002; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011; FILLO; KORAIDO; EVANS, 1992; JOHNSON et al., 2008; SHEPHERD et al, 1992; AYERS; PARKER, 2001; MCINTOSH; WALTER; MARTINI, 2002; MCINTOSH; WALTER, 2005.)
Mg^{2+}	0,9 – 6.000	(TIBBETTS et al., 1992; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011.)
HCO_3^-	0,15.000	(NASIRI; JAFARI, 2017; TIBBETTS et al., 1992; BREIT; OTTON, 2002; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011.)
Cl^-	0 – 270.000	(TIBBETTS et al., 1992; BREIT; OTTON, 2002; CLUFF et al., 2014; WARNER et al., 2014; GREGORY; VIDIC; DZOMBAK, 2011; YEUNG, ET AL, 2011; UTVIK, 1999; ALLEY et al; 2011; FILLO; KORAIDO; EVANS, 1992; USEPA, 2000.)

COD = Demanda de oxigênio químico; TSS = Sólidos suspensos totais; TOC = carbono orgânico total; TDS = sólidos dissolvidos totais; BTEX = benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno.
Fonte: Adaptado de AL-GHOUTI et al. 2019.

Nas operações de perfuração e extração, a AP é reutilizada visando maximizar a produção de óleo e gás, assim, grandes quantidades destes resíduos contaminados são produzidas contendo metais (Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ag, Ni, Zn); compostos orgânicos como benzeno, tolueno, xileno, fenol; compostos aromáticos halogenados, como clorofórmio e tricloroetileno, além de sólidos dissolvidos/suspensos (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). Outro processo bastante comum na extração de petróleo é a reinjeção de AP, visando a manutenção da pressão ou com a finalidade da maximização da produção (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011; VEIL, 2004). Para tanto, as indústrias adicionam altas

quantidades de outros produtos químicos tóxicos, para recuperação do óleo presente na água, tais como inibidores de corrosão e incrustação, metanol, glicol, polieletrólitos, além de uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, que variam ao longo da vida útil do poço (ROCHA et al., 2012).

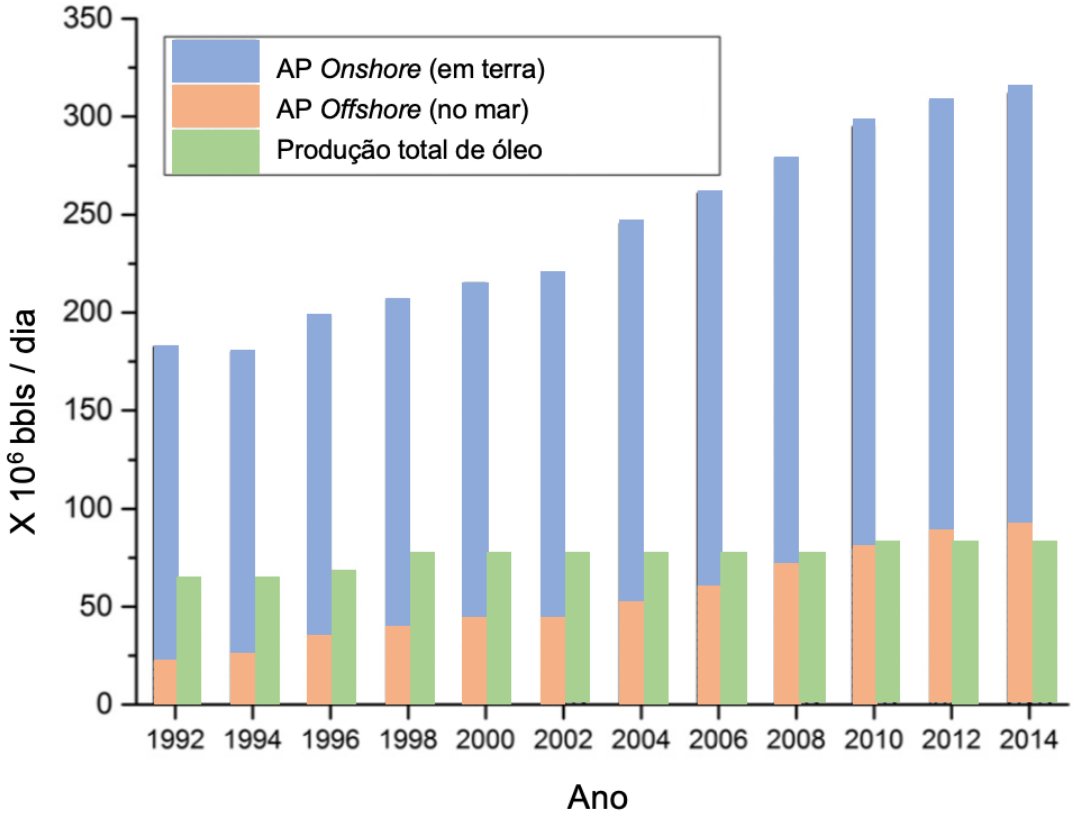
Adicionalmente, no processo de separação de óleo/água são inseridos aditivos químicos, que são misturas complexas de vários compostos moleculares. Essas misturas podem incluir inibidores de corrosão e absorvedores de oxigênio para reduzir a corrosão do equipamento; inibidores de escala para limitar os depósitos de incrustações minerais; biocidas para mitigar as incrustações bacterianas; disjuntores de emulsão e clarificadores para quebrar a emulsão de água em óleo; coagulantes, floculantes e clarificadores para remoção de sólidos; e solventes para reduzir os depósitos de parafina (CLINE, 1998, apud VEIL et al., 2004).

Frente ao exposto, esta água residuária é uma mistura extremamente complexa de diversas classes químicas, sendo considerada como um subproduto produzido por indústrias de produção de petróleo e gás (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009), sendo, geralmente, tratada pela indústria como um resíduo de descarte. Dentre as práticas mais comuns do gerenciamento da AP, destaca-se a aplicação ou descarga em solo, injeção na subsuperfície e o transporte externo. A aplicação ou descarga em terra é um método de descarte considerado barato, entretanto, só pode ocorrer caso esse resíduo possua uma qualidade relativamente boa, visando reduzir a contaminação do solo, água e vegetação do entorno. A injeção subsuperficial é a alternativa preferencial da indústria para o descarte da AP, porém, em alguns casos a reinjeção não é viável e/ou não pode ser realizada porque a formação subsuperficial não tem capacidade para receber a água. Nesse caso, o transporte para instalações externas e reinjeção em outros poços podem ser alternativas, pois, essas instalações normalmente localizam-se próximas a uma formação geológica passível de ser aceptora e viável para a injeção, porém, seu transporte é de custo relativamente alto para a indústria (GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011).

O volume de AP gerado nos processos petrolíferos é dependente da quantidade de água de formação presente no interior de um reservatório, assim como do adicional de água que é injetado no reservatório para forçar o óleo à superfície. Esse volume, porém, não permanece constante ao longo da extração,

à medida que o poço sofre maturação (envelhece), a quantidade de AP aumenta, podendo ser estimada numa relação água/óleo de cerca de 3:1, ou seja, quase 70% em AP, tornando a produção de água residuária várias vezes maior que o de óleo e/ou gás (Figura 4) (CODAY et al., 2014; FAKHRU'L-RAZI et al., 2009; WANDERA; WICKRAMASINGHE; HUSSON, 2011).

Figura 4 – Volume diário de Água Produzida de Petróleo em terra e no mar em comparação a produção toatal de óleo de 1992 a 2014.



Fonte: Adaptado de ZHENG et al. (2016)

Dentro deste contexto, o grande volume de AP gerado considerando a intensa extração de petróleo, somados à diversidade de estruturas químicas e toxicidade presentes em sua constituição, além da falta de conhecimento a longo prazo quanto os possíveis impactos ecológicos que possam ser produzidos, tornaram o descarte de águas produzidas de petróleo um problema ambiental que tem despertado a preocupação da comunidade científica nos últimos anos (BAKKE; KLUNGSØYR; SANNI, 2013).

1.1.1 Impacto ambiental gerado pelo descarte de AP

O ambiente aquático é extremamente complexo e diverso, pois compreende vários tipos de ecossistemas, tais como rios, lagos, estuários e oceanos. Todos esses ecossistemas são considerados como produtos dinâmicos de interações entre seus componentes bióticos e abióticos presentes em cada um deles. Caso ocorra uma contaminação desses ecossistemas, muitas vezes seus danos podem ser imensuráveis ou até mesmo irreparáveis, devido a vulnerabilidade dos organismos ali presentes, sua representatividade biológica, além da interação entre seus componentes (COSTA et al., 2008).

Os problemas ambientais induzidos pelo descarte da AP são relatados desde quando os primeiros poços de petróleo e gás foram perfurados, em meados do século XIX (GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011). Em todas as regiões onde o petróleo e o gás são produzidos, ocorrem efeitos ambientais em decorrência do descarte da água produzida e, dentre os efeitos mais significativos podemos destacar: (i) a degradação da qualidade da água do solo e da superfície; (ii) morte de plantas e alteração da textura do solo; (iii) erosão resultante dos solos e assoreamento de cursos d'água próximos; (iv) contaminação de equipamentos de produção e solos por águas produzidas por rádio e iodo; e (v) efeitos adversos nos ecossistemas (OTTON, 2006).

O impacto ambiental decorrente do descarte da água produzida é determinado pela toxicidade e quantidade dos constituintes presentes. Alguns destes compostos podem ser removidos ou ter sua concentração reduzida no meio em que se encontra, devido à decomposição, evaporação, transformação em compostos com menor toxicidade ou até mesmo, por meio de deposição em sedimentos. No entanto, a maior preocupação é quanto a parcela dos compostos tóxicos que permanece soluvel em água, sendo passível de interação direta com a biota aquática (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009). Em muitos casos, esse resíduo passa por tratamento para posterior descarte no ambiente (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011), porém, mesmo após o tratamento, a AP pode ainda conter contaminantes que podem ser tóxicos à biota aquática, representando uma ameaça a sua saúde e a biodiversidade (FARMEN et al., 2010).

Assim, o descarte de AP não tratadas ou após tratamento ineficiente pode ser prejudicial ao ambiente, pois podem conter níveis elevados de íons dissolvidos (sais), hidrocarbonetos e oligoelementos (GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011). Dentre os íons dissolvidos, o sódio é o cátion mais comum

encontrado nas APs e, caso esse resíduo entre em contato com o solo, o excesso de sódio pode causar deficiência em outros cátions em plantas, pois quando o sódio encontra-se em altos níveis, compete com o cálcio, magnésio e potássio na absorção pelas raízes (GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011). Além disso, níveis elevados de sódio também podem inibir a infiltração de água no solo, devido a alterações na estrutura e retenção das moléculas de água (DAVIS; WASKOM; BAUDER, 2007).

Ainda, se a AP tratada for utilizada na irrigação, deve-se levar em consideração que esta pode infiltrar em fontes de águas subterrâneas localizadas próximas à superfície, podendo contaminar este recurso. Adicionalmente, o acúmulo do mineral decorrente da troca iônica subsuperficial pode alterar a qualidade da água dos aquíferos subjacentes rasos (GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011).

Oligoelementos, incluindo boro, lítio, bromo, flúor e rádio podem ocorrer em concentrações elevadas em algumas APs. Muitos destes oligoelementos são fitotóxicos e possuem a capacidade de se adsorver ao solo, podendo permanecer neste compartimento após a água salina ter sido removida. Além disso, lodos contendo rádio são encontrados em equipamentos de campo petrolífero que são descartados em solos, representado, desta forma, riscos adicionais ao ecossistemas e a saúde humana (GUERRA; DAHM; DUNDORF, 2011).

Frente ao exposto, a presença de compostos químicos diversos em amostras de AP, pode representar uma ameaça à biota aquática quando descartada nos recursos hídricos, ou como dito anteriormente, quando ela é usada para irrigação podendo acarretar diversos problemas ao solo e as culturas (VEIL et al., 2004).

Devido à grande variedade de produtos químicos em diferentes concentrações presentes na AP, é difícil definir o potencial tóxico de uma determinada amostra deste efluente, sendo neste caso impossível descrever individualmente a toxidade dos vários componentes presentes e, posteriormente, tentar estimar a toxicidade da mistura constituinte da AP (HOLDWAY, 2002). A identificação precisa de quais compostos ou classe de compostos são responsáveis pela toxicidade de uma determinada amostra de AP é um dos

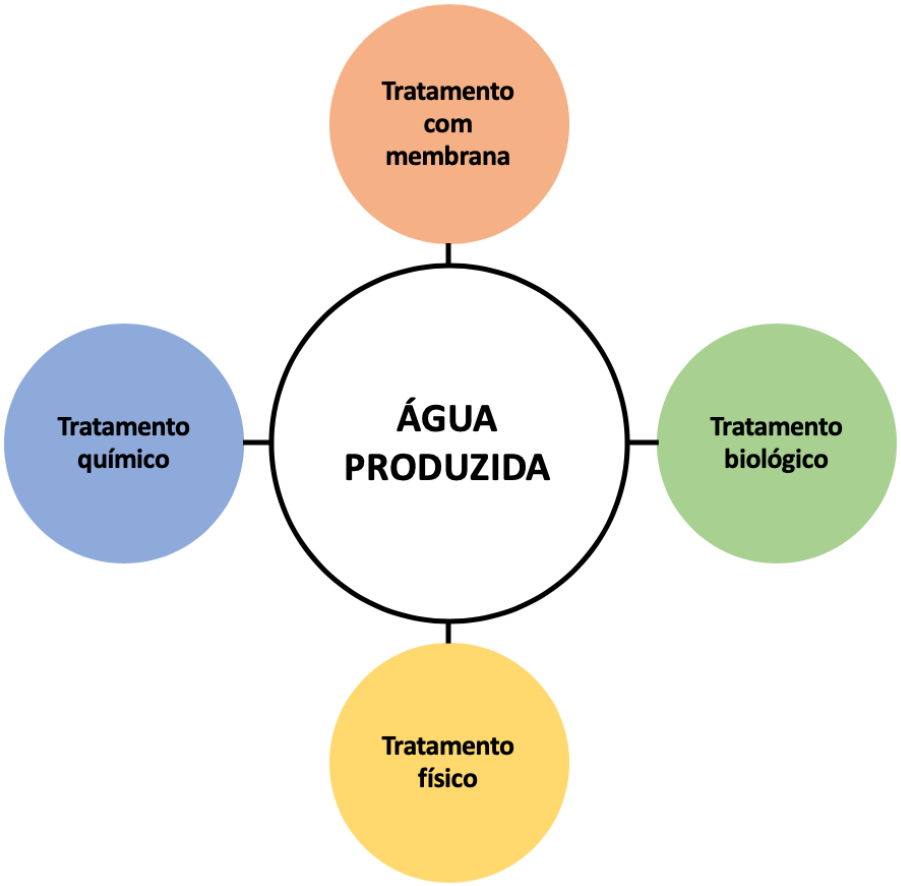
grandes obstáculos na avaliação, monitoramento e gerenciamento desta mistura complexa (BRETAS, 2011).

Perante a crescente exploração dos recursos fósseis pela indústria petrolífera, tornam-se necessários mais estudos sobre as características toxicológicas dos resíduos gerados (AP) por esse seguimento, assim como o desenvolvimento de pesquisas que contribuam com a manutenção e integridade da biota afetada (BRETAS, 2011), por meio de tratamentos eficazes. Considerando que a demanda global de energia até 2040 aumentará em até 37%, impulsionando o petróleo, o carvão e o gás natural como as principais fontes de energia da civilização moderna, espera-se como consequência, um aumento no volume de águas residuais (água de petróleo), geradas pela indústria petrolífera, estimado em 437 milhões de barris por dia (ALZAHRANI et al., 2013, GWI, 2011). Desta forma, tornou-se importante o desenvolvimento de tratamentos capazes de reduzir o impacto ambiental do lançamento desses resíduos.

1.1.2 Formas alternativas de tratamento da AP

Os métodos convencionais normalmente empregados para tratar a AP são filtração, flotação e membrana de separação (DENG et al., 2005), ou por processos químicos, físicos, biológicos e por membranas (Figura 5) (NASIRI; JAFARI; PARNIANKHOY, 2017) processos esses que envolvem apenas a transferência de fase, mas não a eliminação ou degradação dos compostos presentes na AP. Estes tratamentos convencionais muitas vezes não são suficientes para a remoção/degradação dos contaminantes presentes, devido à complexidade e toxicidade de diferentes compostos existentes em uma única amostra, sendo, portanto, necessária a utilização de processos mais complexos e sofisticados (BRITO et al. 2019) como os processos oxidativos avançados (POAs) ou materiais adsorventes como a vermiculita.

Figura 5 – Principais técnicas utlizadas para tratamento da Água Produzida de Petróleo (AP).



Fonte: Adaptado de Nasiri, Jafari e Parniankhoy (2017).

1.1.2.1 Procesos Oxidativos Avançados (POAs)

Recentemente, alguns autores vêm investigando os POAs como alternativa para o tratamento de AP, como por exemplo o tratamento fotocatalítico químico e eletroquímico dos compostos orgânicos presentes na água. Dentre eles, podemos destacar trabalhos que utilizaram a oxidação eletroquímica de AP utilizando ânodos de óxido metálico (RAMALHO; MARTÍNEZ-HUITLE; SILVA, 2010; SANTOS; DEZOTTI; DUTRA, 2013), oxidação fotocatalítica (ADAMS; CAMPBELL; ROBERTSON, 2008) e oxidação fotoeletrocatalítica utilizando semicondutoes de TiO_2 (JARAMILLO-GUTIÉRREZ et al., 2016; LI et al., 2006).

Neste trabalho, foram avaliadas as técnicas de fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica.

Os POAs consistem na geração de espécies muito reativas, como radicais hidroxila (•OH) à partir do H_2O_2, que oxidam uma variedade de poluentes de maneira rápida e não seletiva, sendo esta uma característica muito importante para o tratamento de amostras aquosas complexas, podendo ser uma solução ambiental eficiente (ANDREOZZI et al., 1999, FUKUNAGA, 2003). A fotocatálise é um processo pelo qual ocorre a excitação com luz de energia maior que o *band gap* (Eg), ou seja, a quantidade de energia necessária para que o semicondutor possa conduzir corrente elétrica, ocasionando a geração de pares de elétron/lacuna (e-/h+), de forma a aprisionar elétrons e lacunas pelas espécies adsorvidas, ocorrendo reações redox entre espécies adsorvidas e cargas fotogeradoras e dessorção dos produtos da reação reduz, seguida da regeneração do semicondutor (ZIOLLI; JARDIM, 1998).

A oxidação fotoeletroquímica (fotoeletrocatálise) é a junção das tecnologias eletroquímicas e fotoquímicas, utilizada para aumentar a eficiência na degradação de poluentes orgânicos da fotocatálise. A vantagem da fotoeletrocatálise em relação à catálise é a aplicação de um potencial através de um fotoeletrodo no qual o catalisador está apoiado. Essa configuração permite a separação mais efetiva das cargas geradas, tornando maior o tempo de vida dos pares de elétrons-lacunas, aumentando assim, a eficiência do processo, sendo baseado na reação fotoquímica que acontece na superfície do TiO_2 sob um fóton incidente de luz UV com energia *hv* (OSUGI et al., 2005; ZANONI; SENE; ANDERSON, 2003).

O ozônio é considerado um oxidante poderoso e o tratamento de água e águas residuais utilizando esta substância é conhecido como ozonização. O ozônio pode reagir com poluentes orgânicos por meio de ação direta (de forma seletiva e relativamente lenta) devido a oxidação do ozônio molecular, ou de forma indireta (de maneira oxidativa mais rápida e não seletiva) quando radicais •OH são gerados pela decomposição de ozônio, essa ação indireta também é denominada como ozonização catalítica, ou seja, também é um POA. Ao final do tratamento, ocorre a formação de compostos recalcitrantes devido à decomposição do ozônio, que é dependente do pH, dos catalizadores e da irradiação UV (AGUSTINA; ANG; VAREEK, 2005; BESSEGATO et al., 2016; NAWROCKI; KASPRZYK-HORDERN, 2010).

O processo de ozonização fotoeletrocatalítica é a combinação da fotoeletrocatálise utilizando eletrodo TiO_2NT e a ozonização (O_3), sendo considerado um tratamento eficiente, capaz de promover uma maior degradação e mineralização de compostos orgânicos em água residuais. Umas das desvantagens do tratamento por fotoeletrocatálise é a baixa degradação de compostos altamente concentrados, assim, a adição/combinação à ozonização pode suprir essa deficiência, fazendo com que esse processo combinado se torne mais eficiente do que quando utilizados separadamente (BESSEGATO et al., 2016).

1.1.2.2 Vermiculita

Vermiculita é o nome mineralógico dado ao silicato laminar hidratado de íons de magnésio, alumínio e ferro (DUMAN; TUNÇ, 2008, DUMAN; TUNÇ; POLAT, 2015). É um mineral expansível (2:1) que se forma a partir da alteração de mica (DUMAN; TUNÇ, 2008). Como pode ser observado em sua estrutura (Figura 6), esse mineral é composto por diversos óxidos metálicos. Além disso, não ocorre a alteração da estrutura cristalina com a adição de cátions e moléculas a camada, onde pode haver uma possível alteração no seu grau de cristalinidade após adição de íons e remoção de água através de tratamento térmico, que é necessário para sua capacidade adsortiva (BALEK et al., 2007; DUMAN; TUNÇ, 2008; MOUZDAHIR et al. 2009; VALKOV; SIMHA, 2012).

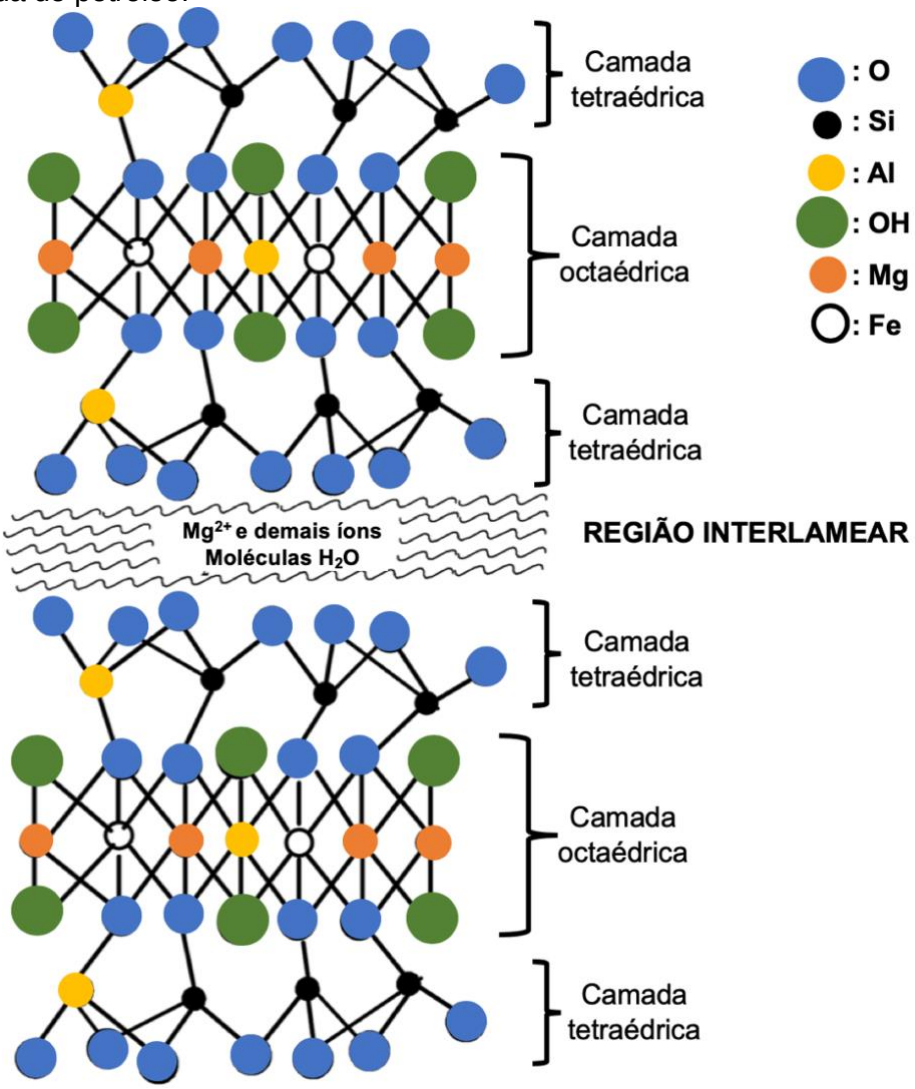
A vermiculita possuí capacidade de troca catiônica muito alta (120–150 meq/100 g) devido a substituições de Mg^{2+} e Fe^{2+} em vez de Al^{3+} nas posições octaédricas e, em maior grau, a substituições de Al^{3+} em local de Si^{4+} nas posições tetraédricas. Além disso, a vermiculita incha menos que as smecitas em decorrência da sua maior carga nas chapas tetraédricas e possuem maior grau de plasticidade que o caulim e mica. Portanto, essas propriedades tornam esse mineral adequado no emprego como sorventes naturais de baixo custo para o tratamento de águas industriais e de processamento de águas residuais a fim de se evitar a liberação de poluentes (MALANDRINO et al., 2006).

A vermiculita pode adsorver metais pesados e outros poluentes por meio de dois mecanismos diferentes: 1) troca catiônica nos locais planares, resultante das interações entre íons metálicos e carga permanente negativa (complexos da esfera externa), e (2) formação de complexos da esfera interna por meio dos

grupos $Si^{-}O^{-}$ e $Al^{-}O^{-}$ nas bordas dos componentes de argila (MERCIER; DETELLIER, 1995; KRAEPIEL; KELLER; MOREL, 1999).

A vermiculita é comercializada na forma expandida em diferentes granulações e empregada em diversos setores industriais, como por exemplo, na agricultura e horticultura, visando reter e carrear água para o condicionamento de solos; na construção civil na fabricação de blocos e placas e isolamento térmico e acústico e revestimento de paredes, na fabricação de de embalagens e produtos industrializados. No ambiente, vem sendo pesquisada na remediação de solos contaminados de derivados de petróleo, na adsorção de metais pesados e remoção de contaminantes orgânicos e na purificação de água residuárias contendo sais (UGARTE; MONTE, 2005).

Figura 6 – Estrutura da vermiculita, empregada no tratamento de amostras de água produzida de petróleo.



Fonte: Adaptado de Duman e Tunç (2008)

1.2 Organimos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos

Ecossistemas aquáticos possuem características específicas, dentre elas o aceleramento da taxa de transferência de nutrientes e metabólitos por meio de membranas celulares, ocasionando a potencialização da absorção e transformação de matéria pelos organismos aquáticos. Além disso, a dinâmica de processos biogeoquímicos (ciclagem de nutrientes) é mais veloz, tendo como consequência elevadas taxas de produtividade primária. Outra característica bastante importante é a viscosidade da água, pois através dela ocorre a alta mobilidade de organismos aquáticos (ex. peixes) ou a locomoção quase que totalmente através do movimento de massas de água. As propriedades físicas da água, como calor específico e índice de refração luminosa, são importantes para determinações espaciais (principalmente verticais) na distribuição térmica e luminosa no ambiente aquático, o que impacta diretamente a distribuição dos organismos no ambiente. Por fim, a fluidez da água junto a sua capacidade de solubilização, determinam em geral, que barreiras à dispersão sejam tipicamente fracas entre vários *habitats* do ambiente aquático, proporcionando uma dinâmica na troca de nutrientes e de substâncias químicas, além da maior movimentação de propágulos (ESTEVES; CALIMAN, 2011).

Segundo Esteves e Caliman (2011), os meios aquáticos possuem diversos compartimentos, como por exemplo os lagos que são divididos em: região litorânea ou ripária, região limnética ou pelágica, região bentônica e interface água-ar. Entretanto, essa classificação é apenas didática, pois, esses compartimentos não são isolados dentro do ecossistema aquático, convivendo em constante interação com trocas de matérias e energia. Portanto, no caso de uma contaminação ambiental por substâncias químicas, pode ocorrer impacto direto ou indireto em todo um ecossistema aquático, podendo atingir proporções inesperadamente complexas.

A dispersão de um contaminante no ambiente aquático é mais complexa que na atmosfera. Existem muitas diferenças no volume de diluição, característica de mistura e velocidade de transporte entre os diferentes compartimentos aquáticos (rios, lagos, mares, estuários e oceanos) tornando uma abordagem geral mais difícil. Portanto, além das interações de contaminantes com os componentes abióticos do ambiente também ocorre a

interação mais ativa com a biosfera, o que facilita a transferência do contaminante para o meio biótico do sistema (SISINNO; MOREIRA, 2013).

Para avaliação de contaminações de meios aquáticos são realizados análises da qualidade de água e da carga poluidora de efluentes e outras amostras aquosas. Para tanto, frequentemente são utilizadas as análises físico-químicas como demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos em suspensão, entre outros parâmetros de caráter orgânico e inorgânico, cujos limites são estabelecidos de acordo com a legislação ambiental vigente. No entanto, esses parâmetros são muito abrangentes e não são suficientes para determinar o potencial tóxico de um contaminante, ou seja, não conseguem distinguir entre substâncias potencialmente tóxicas aos sistemas biológicos daquelas que apresentam baixo risco. Desta forma, é necessária a complementação dos dados analíticos empregando testes de ecotoxicidade na avaliação do risco ambiental por contaminantes (COSTA et al., 2008).

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, sensíveis a substâncias químicas, avaliados através de alterações (morfológicas, fisiológicas ou comportamentais) após a exposição a contaminantes ambientais. Essas exposições são realizadas com diferentes concentrações da amostra a ser testada por um período controlado, podendo ser realizadas em exposições agudas ou crônicas. A exposição a um agente tóxico é considerada aguda quando ocorre em único evento ou em curto período de tempo, por outro lado, na crônica a exposição ao agente tóxico ocorre de forma gradativa ao longo da vida do organismo, geralmente em baixas concentrações (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008).

Segundo Domingues e Bertoletti (2006), os organismos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos devem pertencer a grupos taxionômicos representativos do ecossistema, sendo recomendável a utilização de organismos de diferentes níveis tróficos distintos, para que se possa obter uma indicação da variabilidade natural da sensibilidade dos organismos.

Diferentes organismos (vertebrados e invertebrados) podem ser utilizados na avaliação ecotoxicológica, entretanto é recomendável que tenha seletividade constante e elevada ao contaminante, grande disponibilidade e abundância, estabilidade genética, biologia conhecida, representatividade no seu nível trófico

e relevância ambiental, além da necessidade de fácil cultivo e de adaptação às condições em laboratório. Dentre os organismos-teste mais utilizados podemos citar: algas, crustáceos, bactérias e peixes (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Como citado anteriormente, a avaliação ecotoxicológica de contaminações ambientais deve ser realizada com organismos de diferentes níveis tróficos. Desta forma, existem discussões sobre o uso ético de organismos em teste laboratoriais, principalmente o uso de vertebrados (SCHOLZ et al., 2008; SCHOLZ et al., 2013). Em decorrência disso, há um forte debate para utilização de métodos alternativos à experimentação animal (BRAUNBECK et al., 2005; LAMMER et al., 2009; EMBRY et al., 2010; SCHOLZ et al., 2013; BUSQUET et al., 2014), desta forma, o princípio dos 3Rs (*Reduction, Replacement, Refinement*) (RUSSELL; BURCH, 1959) pode ser aplicada na escolha dos testes e organismos a serem utilizados.

De forma a atender essa demanda, neste trabalho foram realizados apenas teste alternativos, utilizando organismos de diferentes níveis tróficos: *Danio rerio* (estágio embrio-larval)*, Vibrio fischeri, Daphnia similis, Daphnia magna, Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*.

1.2.1.1 Danio rerio

Figura 7 – Peixes da espécie *Danio rerio*

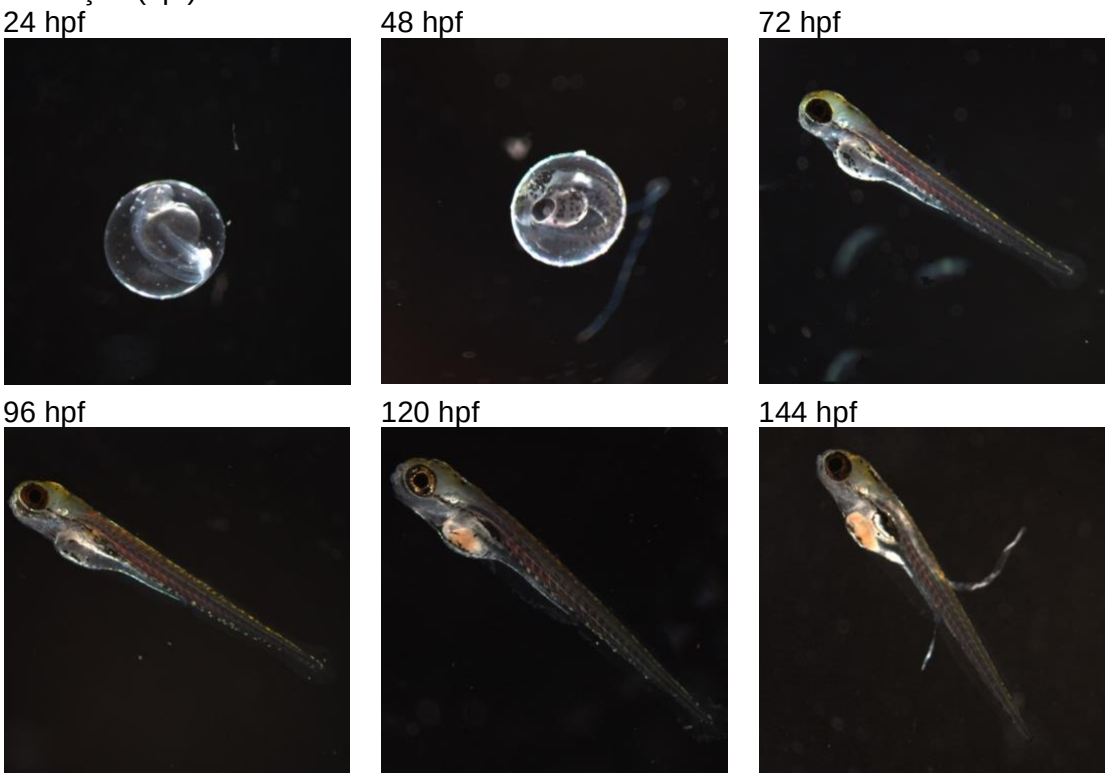
Fonte: https://faunalytics.org/can-zebrafish-needs-be-met-in-captivity/

Neste trabalho forma utilizados peixes da espécie *Danio rerio* (Figura 7), pertencentes a Família Cyprinidae, originários da Índia e do Paquistão que possuem ampla distribuição geográfica com hábitos alimentares amnívoro. O *Danio rerio* também é conhecido como zebrafish (nome difundido na comunidade científica), peixe zebra ou paulistinha (ABNT, 2016).

O zebrafish é um modelo animal importante para os estudos de desenvolvimento de vertebrados e funções genéticas relacionadas, além de estudos ecotoxicológicos. Devido ao rápido desenvolvimento e sensibilidade dos embriões, são considerados como bons organismos-teste para determinação da toxicidade aguda à contaminantes ambientais. Nos últimos anos, o teste com o embrião deste peixe tem sido incentivado, pois é visto como um substituto para o teste agudo com o peixe adulto, de acordo com a regulamentação europeia de proteção aos animais utilizados para fins experimentais, pois os testes com embriões de zebrafish de até 120h são considerados como testes alternativos *in vitro* (BRAUNBECK et al., 2005; COUNCIL DIRECTIVE 86/609/EEC 1986; NAGEL, 2002).

Dentre as vantagens da utilização deste peixe, citam-se seu desenvolvimento rápido (Figura 8), bem caracterizado e muito similar ao de outros vertebrados (incluindo os humanos); desenvolvimento embrionário externo e transparente protegido por um córion também transparente, o que permite o monitoramento fácil das mudanças morfológicas por estereomicroscopia (HOWE et al., 2013). Ainda como vantagens, podemos destacar a alta taxa de reprodução, considerando que uma única fêmea pode produzir em média 100 a 300 ovos em cada reprodução. Além disso, o peixe adulto possui apenas 3 cm de comprimento, o que facilita seu cultivo pois não necessita grandes espaços. Suas larvas possuem apenas 1 a 4 mm de comprimento, e podem viver até sete dias em único poço de placa de 6 ou 24 poços sobrevivendo apenas com os nutrientes armazenados no saco vitelínico. Adicionalmente, trata-se de um modelo com facilidade de aplicação e avaliação em testes de toxicidade (HILL et al., 2005; LEE et al., 2012; MCCOLLUM et al., 2011; MCGRATH; LI, 2008; SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011; YANG et al., 2009).

Figura 8 – Estágios de desenvolvimento embrionário do zebrafish até 144 horas pós fertilização (hpf).

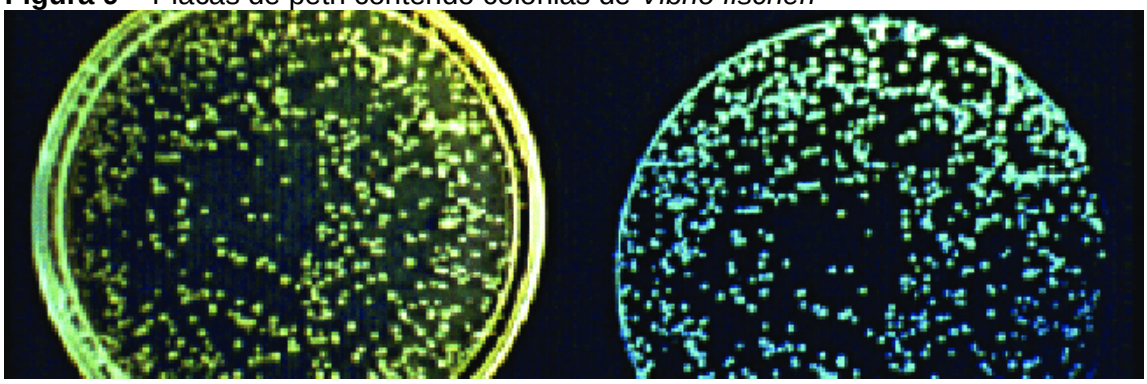


Fonte: Autora

Considerando a provável constituição da água de petróleo (AP), podendo conter metais, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), além de compostos radioativos, neste trabalho, foi utilizado o *Fish Embryo Test* (FET) proposto por Nagel (2002) com algumas adaptações, baseado na OECD (nº 236) para a avaliação da eficiência dos tratamentos na remoção da toxicidade das amostras em questão. Este ensaio é capaz de detectar uma ampla gama de efeitos tóxicos, desde efeitos letais até subletais como capacidade de eclosão, pigmentação, batimentos cardíacos, curvatura da cauda, edemas cardíacos e oculares, entre diversos outros por meio de observações visuais de malformações embrionárias (OECD, 2013).

1.2.1.2 Vibrio fischeri

Figura 9 – Placas de petri contendo colônias de *Vibrio fischeri*



Fonte: Glöckner et al. 2012

Bioensaios bacterianos, normalmente, ocorrem em cinco categorias: crescimento populacional, consumo de substrato, respiração, luminescência relcionada à síntese de ATP e ensaios de inibição de bioluminescência. Dentre as espécies mais utilizadas para os testes de bioluminescência, destaca-se a *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi* e *Pseudomonas fluorescens*, já nos ensaios de inibição metabólica incluem *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida*. A popularidade dos ensaios bacterianos é decorrente do fato das bactérias serem parte integrante do ecossistema, além de se tratar de ensaios relativamente rápidos e simples (PARVEZ et al., 2006).

A *Vibrio fischeri* (Figura 9), também conhecida como *Photobacterium fisheri,* é uma bactéria gram-negativa, com formato de bastonete, flagelada e não patogênica, distribuida de forma onipresente em ambientes marinhos subtropicais e temperados (ABBAS et al., 2018). É considerado um organismo de vida livre (planctônico) ou como um colonizador do órgão reprodutor de luz (fotóforo) em lulas e peixes como um simbionte amutuístico (RUBY; NEALSON, 1976), que ocasiona a luminescêscia do organismo tanto para camuflagem como para predação (RUBY; MCFALL-NGAI, 1999). Essa bactéria é frequentemente utilizada em ensaios ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade aguda de substâncias.

O ensaio com o *Vibrio Fischeri* é, frequentemente, escolhido como o primeiro teste numa bateria de teste baseados na velocidade e custo. Muitos pesquisadores apontam o ensaio de bioluminescência com *Vibrio fischeri* como um dos mais sensíveis para uma ampla gama de produtos químicos quando

comparado com outros ensaios bacterianos (FARRÉ et al., 2001; FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA, 2011; GATIDOU; STASINAKIS; IATROU, 2015; HEINLAAN et al., 2008; RANKE et al., 2004; ROSADO; USERO; MORILLO, 2016; VENTURA et al., 2014).

Segundo Harmel (2004, apud FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA 2011) bactérias luminescentes produzem luz quando oxidam simultaneamente riboflavina 5 – fosfato (FMNH2) e um aldeído de cadeia longa (RCHO) na presença de oxigênio. A emissão da luz pela bactéria é resultante da reação da molécula de flavina que fica eletronicamente excitada e, em seguida, ocorre a emissão da fluorescência por meio do retorno do elétron ao seu estado inicial. A bactéria *V. fischeri* apenas reduz sua produção de luz na presença de um composto tóxico que altere ou iniba seu processo de produção.

Microtox® é um teste de toxidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* NRRL B 11177 baseado na inibição de bioluminescência do organismo. O teste é uma marca registrada pela empresa Microbics Corporation e hoje é de propriedade da Strategic Diagnostic Inc. (GHIRARDINI et al., 2009). O teste Microtox® consiste na exposição da bactéria *V. fischeri* a diferentes concentrações da amostra a ser testada. Se houver uma relação dose-resposta entre as concentrações da soluções teste e a luz emanada em relação ao controle, ocorre uma redução da emissão dessa luz, e o efeito é quantificado. A medida da intensidade da luminescência emitida pela *V. fischeri* é realizada automaticamente através de um programa computacional (BENNETT, CUBBAGE, 1992).

Existem diversos fatores que tornaram o teste do Microtox® amplamente aceito em todo o mundo, tanto em programas de monitoramento como para triagem ambiental. Dentre esses fatores, podemos citar o baixo volume de amostra necessária, relevância ecológica, sensibilidade, reprodutibilidade e padronização do teste. O Microtox® pode ser usado para testar amostras líquidas e sólidas visando: (i) avaliação da toxicidade dos compostos puros; (ii) monitorização das águas superficiais ou águas residuais; (iii) controle da qualidade do fluxo de água nas estações de tratamento de águas residuais; (iv) ensaio de amostras ambientais sólidas (solo ou sedimentos) ou extraídas de matrizes líquidas ou extratos salinos); (v) estudar a toxicidade de substâncias

liberadas pela degradação de materiais; e (vi) controlar as ações de mediação do solo e do sedimento (GHIRARDINI et al., 2009).

1.2.1.3 Daphnia similis e Daphnia magna

Figura 10 – Microcrustáceo *Daphnia similis*

Fonte: Autora

O gênero *Daphnia* (Figura 10) compreende microcrustáceos zooplanctônicos, organismos muito sensíveis a contaminantes ambientais. Por isso, esses cladóceros são bastante empregados em ensaios ecotoxicológicos em decorrência da sua pequena estrutura, alta sensibilidade a diversas substâncias tóxicas, ampla distribuição geográfica, elevada densidade e crescimento populacional acelerado (GUTIERREZ; PAGGI; GAGNETEN, 2012; SARMA; NANDINI, 2006).

Os daphnídeos (Crustacea, Cladocera) são popularmente chamados de pulga d'água, sendo este um organismo aquático filtrador que ocupa papel imprescindível na cadeia alimentar, como fonte de alimento para peixes e invertebrados predadores, além de terem papel no controle populacional de algas, que podem interferir na qualidade da água de recursos hídricos. Dentre os ensaios ecotoxicológicos mais aplicados mundialmente, destacam-se aqueles empregando os organismos *Daphnia magna* e *Daphnia similis* em ensaios de toxicidade aguda e a *Ceriodaphnia dubia* para testes de toxicidade crônica (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Em testes ecotoxicológicos é recomendada a utilização de espécies temperadas como a *Daphnia magna* e a *Daphnia pulex*. Porém, também é possível utilizar outras espécies, como a *Daphnia similis*, desde que também sejam sensíveis. Além disso, no estudo realizado por Buratini, Bertoletti e

Zagatto (2004) foram descritas similaridades entre o comportamento e sensibilidade das espécies *D. similis* e *D. magna.* Assim, o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB, inseriu a espécie *D. similis* como um organismo-teste, não só devido às vantagens citadas acima, mas também devido ao fato de que a espécie *D. similis*, embora não seja nativa do Brasil, é mais bem adaptada à baixa dureza da água do estado de São Paulo, quando comparada à *D. magna* (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004). Além disso, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) recomenda o uso da *D. similis* como um organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos de toxicidade aguda, (ABNT NBR 12713:2016), o que tem impulsionado o uso do organismo no Brasil (ABNT, 2016; BEATRICI, 2001). Por fim, o teste com o organismo também é normatizado pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), o que possibilita a comparação de resultados com diversos estudos realizados pelo mundo (OECD, 1997).

Diversos trabalhos utilizaram a *D. similis* em ensaios ecotoxicológicos (BRAZ et al., 2014; DE-CARVALHO et al., 1998; FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA, 2011; LIU et al., 2002; SOTERO-SANTOS; ROCHA; POVINELLI, 2005), demonstrando que a espécie é um bom organismo na avaliação da toxicidade aguda devido a sensibilidade apresentada a diversas substâncias, assim como a *Daphnia magna.*

1.2.1.4 Chironomus riparius

Figura 11 – Inseto da espécie *Chironomus riparius*

Fonte: Autora

O *Chironomus riparius* (Figura 11) é uma espécie aquática durante os estágios iniciais de desenvolvimento amplamente utilizada em estudos de

ecotoxicidade, sendo considerada uma espécie padrão para avaliação da contaminação de água e sedimento (CAMPOS et al, 2017). Chironomidae é a família dipterana mais amplamente distribuída pelo globo e suas larvas estão presentes em diversos habitats, tais como terrestres e aquáticos (marinhos e de água doce) (TAENZLER et al. 2007; SERRA et al., 2016), tendo uma população estimada em 15 mil espécies (ARMITAGE et al., 1995).

Os chironomideos, também conhecidos como mosquitos não-carnudos, possuem ciclo de vida em quatro estágios de metamorfose: ovos, larvas (quatro estágios) e pupas na água e um estágio adulto terrestre (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 2012; HALPERN; SENDEROVICH, 2015, BELEZA et al., 2019). Cerca de 90% da vida de um chironomideo é na fase aquática (TAENZLER et al., 2007). Em condições laboratoriais o *C. riparius* emerge entre 15 e 17 dias após o primeiro estágio (WATTS, PASCOE 1996; WATTS et al. 2001) e vivem por cerca de 4 dias quando adultos (RISTOLA et al. 2001), além disso os machos emergem alguns dias antes das fêmeas através do fenómeno de protandria (TAENZLER et al., 2007). Existem diversos fatores que tornam o *Chironomus riparius* como organismo modelo recomendado para avaliar a toxicidade dos poluentes aquáticos, tais como pequeno tamanho, tempo de geração curto e facilidade de cultura em condições de laboratório (OCDE 235, 2011).

Esses organismos são considerados macroinvertebrados aquáticos e são essenciais para o funcionamento de ecossistemas aquáticos, pois atuam nos processos ecológicos de transferência de energia e de ciclagem de nutrientes, além de possuírem papel crucial na movimentação de contaminantes presentes no sedimento (PÉRY et al. 2002; KUHLMANN et al., 2012). As larvas de quironomídeos são predadoras, assim como também são presas importantes para outros macroinvertebrados, invertebrados e vertebrados (HOLKER, STIEF, 2005 ; XIE et al., 2019).

Estes mosquitos são bons indicadores da qualidade de recursos hídricos, pois podem viver em situações extremas, respondendo aos impactos de origem antrópica. Por serem indivíduos de mobilidade reduzida e estarem associadas ao sedimento (durante o período larval e pupas), os chironomídeos são os primeiros a manifestarem os efeitos deletérios dos contaminantes, pois o

sedimento é o ponto final de grande parte da carga poluidora no ambiente aquático (KUHLMANN et al., 2012).

1.2.1.5 Dugesia tigrina

Figura 12 –Organismo *Dugesia tigrina*

Fonte: Autora

Planária de água doce (Figura 12) é um termo comumente utilizado para se referir a uma ampla gama de membros de água doce e de vida livre do tradicional táxon Tubellaria em Platelmintes, especialmente aqueles da ordem Tricladida (ex. *Dugesia tigrina*). Esses organismos possuem distribuição mundial, fazem parte dos bentos e habitam a vegetação flutuante em ambientes não poluídos de água doce (EHLERS, 1984; NOREÑA et al., 2015; SCHOCKAERT et al., 2008). Além disso, possuem papel na cadeia alimentar como predador de outros invertebrados aquáticos de seu habitat circundante, assumindo desta forma o papel de consumidores secundários (SHEIMAN; KRESHCHENKO, 2015; WU; LI, 2018). A reprodução desses organismos hermafroditas pode ser de forma sexual ou assexuada (WU; LI, 2018).

A utilização de planárias tem sido bastante estimulada como alternativa ao uso de vertebrados em estudos Toxicológicos em decorrência de vários fatores, tais como: (i) fácil aquisição, podendo ocorrer facilmente na natureza ou comercialmente; (ii) custo de manutenção relativamente baixo, pois os organismos podem ser armazenados em água da torneira desclorada, água de nascente ou água reconstituída, e alimentação é a base de fígado cru e/ou gema de ovo; (iii) manipulação experimental simples, devido seu pequeno tamanho não havendo necessidade de grandes volumes de amostras a serem testadas;

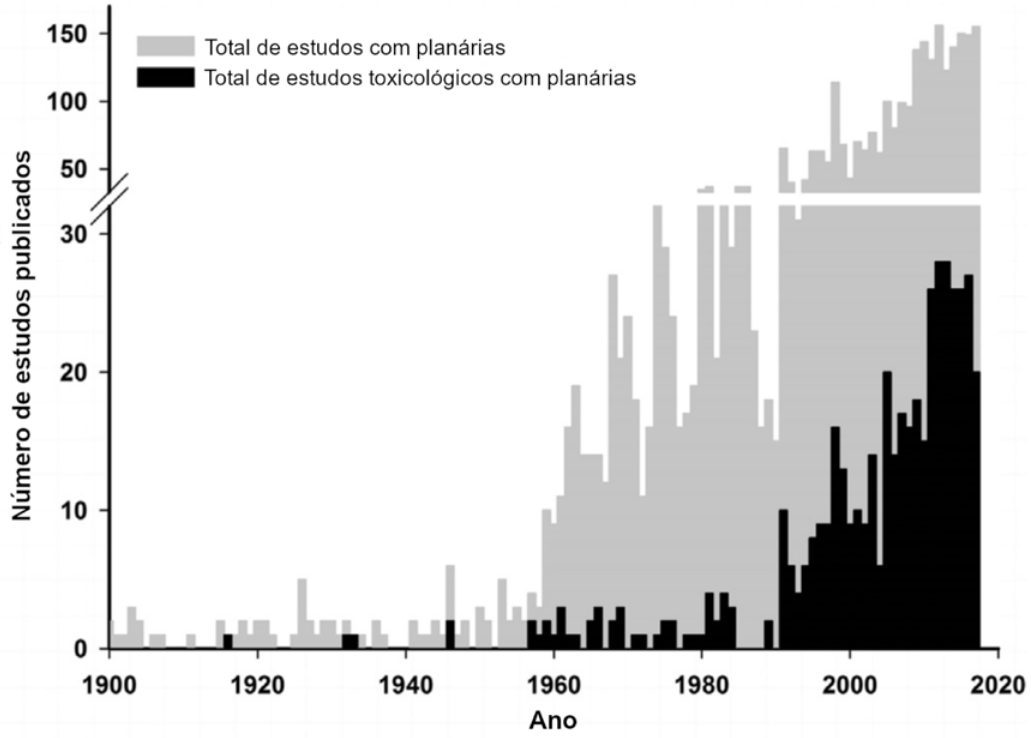
(iv) além de produzirem informações toxicológicas úteis de indivíduos que podem ser extrapolados para populações ou comunidades (NOREÑA et al., 2015).

As planárias de água doce são utilizadas em estudos de genotoxicidade, tumorigenicidade, neurotoxicidade e toxicidade reprodutiva, sendo extremamente relevante para avaliar efeitos ecotoxicológicos, como potencial bioindicador para qualidade de ambientes aquáticos (WU; LI, 2018). Os testes com esses organismos normalmente ocorrem com indivíduos vivos, que são imersos em uma amostra solúvel em água, seguida de amostragem e avaliação da toxicidade. As substâncias ali presentes penetram nos corpos das planárias através de difusão cutânea pela parede corporal (KAPU; SCHAEFFER, 1991).

Dentre as várias espécies de planárias utilizadas e ensaios de toxicidade, destaca-se a espécie *Dugesia tigrina* (também conhecida na literatura como *Girardia tigrina*) polimórfica e cosmopolita, nativa em ecossistema de água doce tropical (América) e bastante difundida de forma exótica na Europa, Ásia e Austrália (KAWAKATSU et al., 1976, SASAKI, 2001; BUENO-SILVA, FISCHER, 2005). Essa espécie é conhecida pela fisionomia, com cabeça triangular (que difere do corpo pela presença de aurículas e dois ocelos fotossensíveis), pigmentação dérmica específica, a superfície ventral do corpo translúcida que se diferencia da dorsal (castanho pigmentado) (HYMAN, 1939 apud RIBEIRO, 2012), como pode ser observado na Figura 12.

Apesar da importância da realização de testes de toxicidade com espécimes padronizadas, é interessante também a utilização de organismos regionais (PREZA, SMITH, 2001), como a por exemplo a planária *Dugesia tigrina*, que apesar de não possuir ainda testes padronizados, tem se mostrado bastante promissora em testes ecotoxicológicos (PREZA, SMITH, 2001; KNAKIEVICZ, FERREIRA, 2008; RAMAKRISHNAN, DESAER, 2011; SARAIVA et al., 2018; LÓPEZ et al., 2019). Além disso, a utilização de planárias em diferentes estudos tem crescido nos últimos 30 anos, assim como aqueles que utilizam o organismo em testes de toxicidade, conforme pode ser observado na Figura 13 (WU, LI, 2018).

Figura 13 - Mudanças temporais no número de artigos em periódicos que relatam a utilização de planárias de água doce (barras cinza) e efeitos tóxicos específicos em planárias (barras pretas) (1900–2017).



Fonte: (WU, LI, 2018).

1.2.1.6 Organismos já testados em AP

A comunidade científica vem avaliando os efeitos tóxicos da AP há muitos anos em diferentes organismos aquáticos, como pode ser observado na Tabela 4. Esses testes toxicológicos são importantes para determinação dos efeitos deletérios em ambientes aquáticos, e seus dados podem ser extrapolados a níveis ecossistemicos.

Tabela 4 - Efeitos observados decorrentes da exposição de diferentes organismos aquáticos à amostras de água produzida de petróleo (AP) e água produzida a partir do retorno de fraturamento hidráulico (APFH) encontrados na literatura.

Efluente	Organismos	Parâmetro avaliado	Fonte
AP	- *Acartia tonsa* (copépode)	Toxicidade aguda e crônica	GIRLING, 1989.
AP	- *Skeletonema costatum* (alga); - *Artemia salina* (crustáceo);	Toxicidade aguda	BRENDEHAUG et al, 1992.

	- *Photobacterium phosphoreum* (bactéria).		
AP	- *Skeletonema acartia* (bactéria) - *Vibrio fischeri*	Toxicidade aguda	FLYNN; BUTLER; VANCE, 1996
AP	- *Ceriodaphnia dubia* (daphnia) - *Pimephales pro-melas* (peixe) - *Mysidopsis bahia* (mysid); - *Cyprinodon variegatus* (peixe)	Toxicidade aguda	SAUER et al, 1997.
AP	- *Vibrio fischeri*	Toxicidade aguda	HENDERSON et al., 1999.
APFH	- *Vibrio fischeri*; - *Paracentrotus lividus* (ouriço-do-mar)	Toxicidade aguda	MANFRA et al., 2007.
AP	- *Gadus morhua*	Toxicidade crônica	MEIER et al., 2007.
AP de formação	- *Vibrio fischeri*; - *Dunaliella tertiolecta* (alga); - *Phaeodactylum tricornutum* (alga) - *Artemia franciscana* (crustáceo); - *Ti- griopus fulv*us (crustáceo) - Dicentarchus labra (peixe)	Toxicidade aguda	MANFRA et al., 2010.
AP	- *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris)	Toxicidade aguda	FARMEN et al., 2010.
AP	- *Vibrio fischeri*; - *Poecilia vivípara* (peixe)	Toxidade aguda	CORRÊA et al, 2010.
AP	*Mytilus edulis* (mexilhão)	Toxicidade crônica	BROOKS et al., 2011
AP	*Gadus morhua*	Toxicidade crônica	SUNDT; BJÖRKBLOM, 2011.
AP	- *Vibrio fischeri*	Toxicidade aguda	ALZAHRANI et al., 2013.
APFH	- *Danio rerio* (peixe)	Toxicidade aguda e crônica	FOLKERTS et al., 2017a
APFH	- *Danio rerio*	Toxidade aguda	FOLKERTS et al., 2017b
APFH	- *Danio rerio*	Toxicidade aguda	HE et al., 2017.
APFH	- *Oncorhynchus mykiss*	Toxicidade aguda	HE et al., 2017.
APFH	- *Daphnia magna* (microcrustáceo)	Toxicidade aguda e crônica	BLEWETT et al, 2017a
APFH	- *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris)	Toxicidade aguda	BLEWETT et al., 2017b.
APFH	*Daphnia magna*	Toxidade aguda	BLEWETT et al., 2018.
AP	- *Crassostrea gigas* (ostra) - *Vibrio fischeri* (bactéria)	Toxicidade aguda	AJUZIEOGU; ODOKUMA, 2018

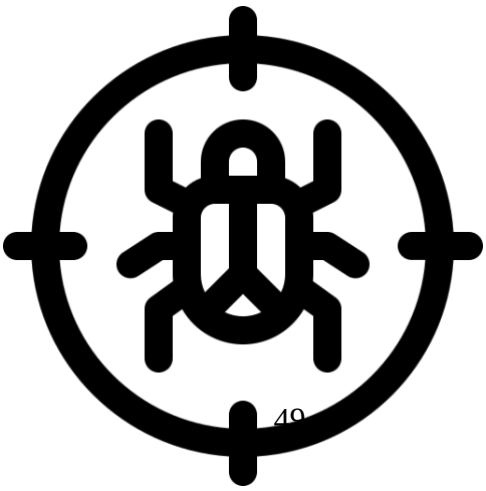
AP	- *Vibrio fischeri*	Toxicidade aguda	AJUZIEOGU; ODOKUMA; CHIKERE, 2018.
APFH	- *Danio rerio*	Toxicidade aguda e embriolarval	HE et al., 2018.
APFH	- *Danio rerio*	Toxicidade aguda	HALE et al., 2019
APFH	- *Gadus morhua* (bacalhau do atlântico); - *Melanogrammus aeglefinus* (peixe).	Toxicidade aguda	HANSEN et al, 2019
APFH	- *Daphnia magna*; - *Lumbriculus variegatus* (anelídeo); - *Danio r*erio; - *Oncorhynchus mykiss*	Toxicidade aguda	FOLKERTS et al., 2019.
APFH	- *Daphnia magna*	Toxicidade aguda	DELOMPRÉ et al., 2019.
AP	- *Daphnia magna* - *Danio rerio*	Toxicidade aguda e de desenvolvimento	MCLAUGHLIN et al., 2020.

Fonte: Autora.

Como pode ser observado (Tabela 4) já foram realizados diversos testes ecotoxicológicos em diferentes organismos aquáticos expostos a AP e seus derivados, como por exemplo a água produzida a partir do retorno de fraturamento hidráulico (APFH). Porém, existe a necessidade de mais testes com diferentes AP em variados organismos aquáticos de níveis tróficos distintos, pois como já foi dito a AP possui características e toxicidades variaveis de acordo com a região, o poço, a água de formação e os outros químicos que são eventualmente adicionados e podem apresentar efeitos deletérios diferentes a organismos aquáticos. Desta forma, há a necessidades de mais estudos que elucidem as características e efeitos tóxicos da AP a níveis populacionais e ecotoxicológicos, podendo futuramente serem extrapolados a outros níveis organizacionais. Além disso, existem poucos e/ou nenhum estudo na literatura dos efeitos embrionários, de testes com as espécies *Dugesia tigrina* e *Chironomus riparius* aos possíveis efeitos tóxcos da AP.

Capítulo
02

OBJETIVOS



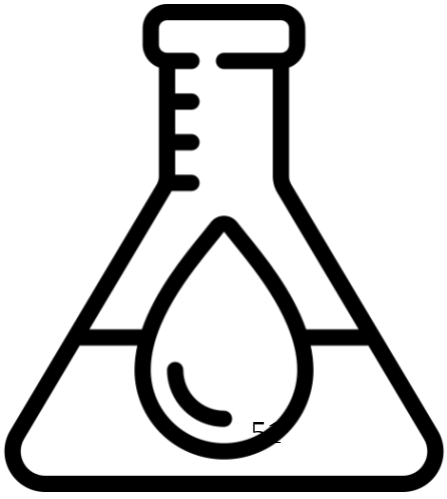
O objetivo geral do trabalho foi avaliar a toxicidade de duas amostras de água produzida, aqui denominadas água de produzida 1 (**AP1**) e água produzida 2 (**AP2**), antes e após de diferentes tratamentos, visando avaliar a eficiência na remoção e/ou redução da toxicidade destas amostras para organismos aquáticos.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- **AP1**:
  - Avaliar a toxicidade da AP1 antes e após o tratamento por meio de processos oxidativos avançados (POAs), de fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica para os estágios embrio-larvais de peixes da espécie *Danio rerio*, por meio da determinação da letalidade e subletalidade;
  - Avaliar a toxicidade aguda da amostra antes e após os mesmos tratamentos para o microcrustáceo *Daphnia similis* e a bactéria marinha *Vibrio fischeri*.
- **AP2**:
  - Avaliar da toxicidade aguda da AP2 sem tratamento e após o tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) empregando o microcrustáceo *Daphnia similis* e bactéria marinha *Vibrio fischeri*;
  - Determinar a influência do tratamento (VMT-mag) na taxa intrínseca de aumento populacional (r), número total de neonatos e tamanho final das fêmeas em *Daphnia magna;*
  - Avaliar a mortalidade, crescimento e emergência induzida a mosquitos *Chironomus riparius* após a exposição à amostra bruta e tratada com vermiculita;
  - Avaliar a mortalidade, locomoção, alimentação e regeneração após decapitação de planária *Dugesia tigrina* à amostra bruta e tratada com vermiculita.

Capítulo
03

MATERIAIS E MÉTODOS

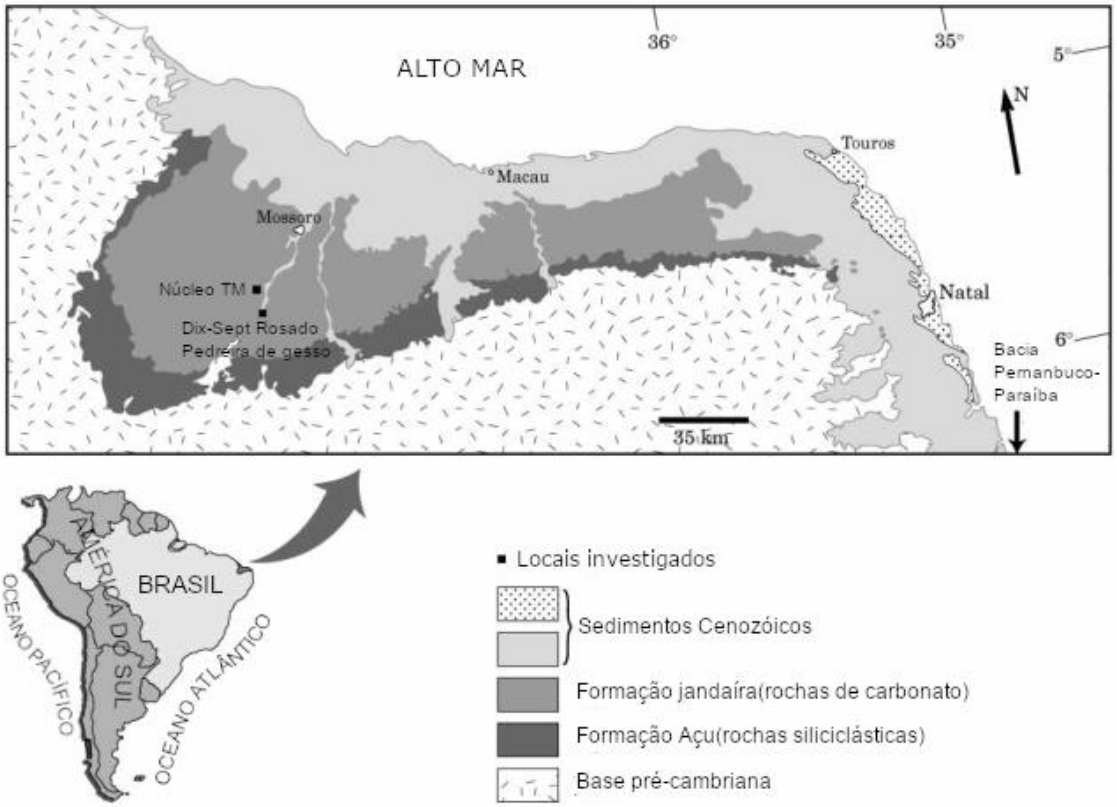


3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras de água produzida de petróleo

Foram coletadas duas amostras de água produzida de petróleo, identificadas como AP1 e AP2. Ambas foram coletadas em reservatórios localizados na parte norte da Bacia Potiguar, no Rio Grande do Norte - Brasil, conforme Figura 14. Os efluentes sem tratamento (AP1 e AP2), além das cinco amostras pós-tratamento (fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização, ozonização fotoeletrocatalítica e vermeculita magnetiza) foram disponibilizadas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

Figura 14 – Mapa de localização da Bacia Potiguar, Rio Grande do Norte, Brasil.



Fonte: Adaptado de Lana e Carvalho (2002)

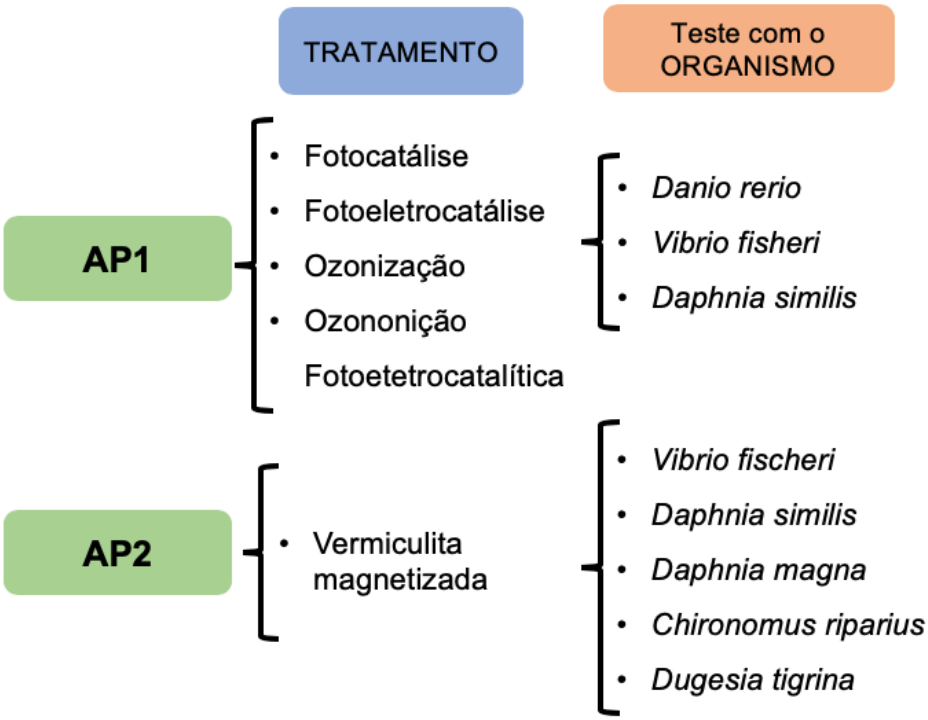
As amostras foram coletas do mesmo reservatório, no entanto, em épocas diferentes e, por isso, foram aqui denominadas como AP1 e AP2 (Figura 15). A AP1 foi coletada em 2016 e a AP2 foi coletada em 2019

Figura 15 – Amostras de água produzida de petróleo, AP1 e AP2, sem tratamento mantidas resfriadas.

Fonte: Autora.

Devido à quantidade de amostra, bem como estágio de desenvolvimento do projeto, foram utilizados testes diferentes com as amostras Figura 16, em diferentes laboratórios Figura 17, de acordo com a disponibilidade na época do recebimento das amostras. A amostra AP1 foi recebida no início do projeto de mestrado e a AP2 foi recebida durante o estágio de pesquisa no exterior.

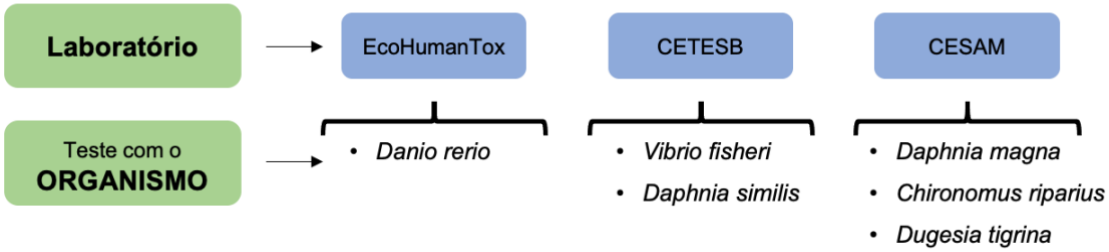
Figura 16 – Esquema ilustrativo dos testes realizados com cada amostra de água produzida (AP1 e AP2), antes e após os diferentes tipos de tratamento.



AP1 = amostra 1 de água produzida; AP2 = amostras 2 de água produzida.

Fonte: Autora

Figura 17 – Esquema ilustrativo dos laboratórios onde foram realizados cada um dos testes de toxicidade.



EcoHumanTox = Laboratório EcoHumanTox; CETESB = Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; CESAM = *Centre for Environmental and Marine Studies.*

Fonte: Autora

3.1.1 Tratamento AP1

O tratamento da AP1 foi realizado com a aplicação de eletrodos de nanotubos de TiO2 em quatro diferentes técnicas (fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica) em 1L (500 ml de efluente diluído em 500 ml de água destilada) por Brito et. al., (2019), conforme a Tabela 5. Após os tratamentos, Brito et. al., (2019) avaliaram as propriedades físico-químicas, como condutividade (multiparâmetro pHtek CD-8B), turbidez (turbidímetro portátil Quimis Q279P), cor (mg de unidades PtCo/L; colorímetro Hanna Instruments HI83200), demanda química de oxigênio e conteúdo de carbono (carbono orgânico e inorgânico total; modelo Shimadzu TOC-VCPN).

Tabela 5 – Condições empregadas em cada um dos tratamentos oxidativos avançados realizados com a amostra 1 de água produzida.

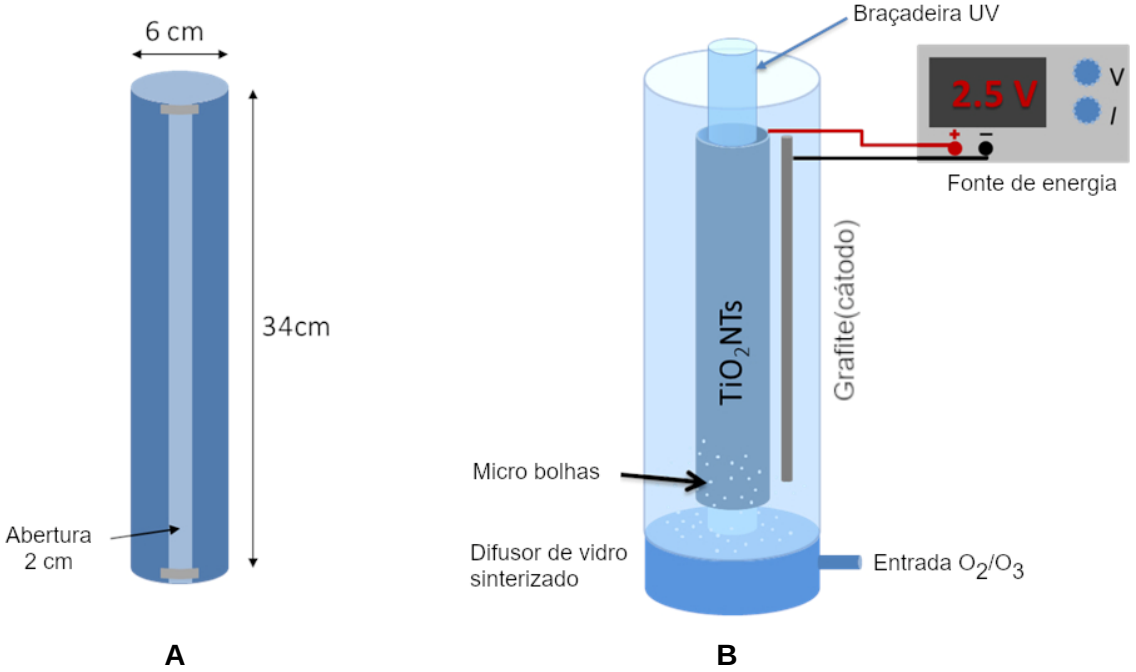
Técnica	Metodologia
Fotocatálise	emprego de luz UV-C de 36 W incidindo sob o semicondutor $NtTiO_2$
Fotoeletrocatálise	emprego de luz UV/C de 36 W incidindo sob o semicondutor $NtTiO_2$ acoplado a aplicação de potencial 1,0 V.
Ozonização	borbulhamento de ozônio ao efluente com fluxo de 1.25×10^{-4} mol min^{-1}
O_3 + Fotoeletrocatálise	aplicação de luz e potencial de 1,0 V sob o semicondutor ao mesmo tempo em que é borbulhado ozônio ao resíduo

O_3 + Fotoeletrocatálise = Ozonização fotoeletrocatalítica.
Fonte: Adaptado Brito (2019)

Para os tratamentos fotocatalíticos e fotoeletrocatalíticos, Brito et al. (2019) construíram um elétrodo cilíndrico de matriz de nanotubos TiO_2 (TiO_2NT), com área geométrica de 600 cm^2 e abertura lateral para o fluxo da solução, conforme pode ser observado na Figura 18A.

Os tratamentos da AP1 foram realizados em um reator de bolhas anulares (ABR) de 63,5 mm e diâmetro com apenas dois eletrodos (Figura 18B), por um período de 90 min para os tratamentos de fotocatálise, fotoetrocatálise, ozonização de ozonização fotoeletrocatalíca, na proporção de 1:1 (AP1 e água destilada) conforme a descrição a seguir. Ao fundo do reator foi inserido um borbulhador de vidro sintetizado para injeção de O_2 ou O_3 funcionando com 1 L de AP1. Para os tratamentos envolvendo luz (Tabela X), foi inserida uma lâmpada UV-C 36 W (Osram) no centro do reator e ao redor da lâmpada o TiO_2NT. Além disso, duas varetas de grafite de diâmetro de 1 cm foram utilizadas como cátodos, com tensão e polarização de 2,5 V controlada por uma fonte de alimentação Tectrol TC 60-02XA1A. O ozônio foi gerado por um ozonizador O_3 R modelo ID-05 (Brasil), no qual a taxa de entrada de ozônio ($3{,}85 \times 10^{-4}$ mol min^{-1}) foi fornecida a uma vazão de O_2 de 3 L min^{-1} monitorada com um medidor de vazão Cole-Parmer (0,4-5 L min^{-1}) no qual a quantidade de ozônio produzida foi controlada por um analisador de ozônio (Anseros GM-OEM, 254 nm). Por fim, os tratamentos que não necessitavam de O_3, foi gerado O_2 em borbulhamento no mesmo fluxo que o O_3 para transporte de massa.

Figura 18 - Representação esquemática do: (A) ânodo Ti / TiO_2NTs com uma abertura lateral de 2 cm para o fluxo da solução; (B) o reator de bolhas anulares, com injeção de microbolhas através de um difusor de vidro sinterizado. No centro, é possível encontrar um eletrodo cilíndrico de Ti/TiO_2NT irradiado internamente por uma lâmpada de 36 W UV-C e polarizado sob 2,5 V usando uma fonte de alimentação versus duas hastes de grafite.



Fonte: Modificado de Brito et. al., (2019)

3.1.2 Tratamento AP2

O tratamento da AP2 foi realizado empregando a vermiculita magnetizada (VMT-mag) obtida por prévio tratamento térmico da vermiculita expandida natural e posterior co-precipatação de nanopartículas de magnetita *in situ*, proposto por Bartilotti et al. (2019). O Primeiro tratamento do material proposto por Mouzdahir et al (2009) envolve calcinação do mineral a temperatura de 900 °C/3 min a 10 °C min^{-1}. Já a sua magnetização envolve a suspensão por borbulhamento de gás nitrogênio deste mineral tratado termicamente em balão de 100 mL contendo 30 mL de água ultrapura com cloretos de ferro(II) e ferro(III) hidratados P.A. diluídos na proporção mineral-cloretos de 1:1 (m/m). Em meio inerte, foi adicionado hidróxido de amônio concentrado lentamente por 30 min e sistema mantido em suspensão por mais 1h (MASCOLO; PEI; RIN, 2013). Ao final, o mineral magentizado foi separado do excesso de nanopartículas de magnetita por meio de lavagem com água ultrapura e separação magnética e, então, seco a 70°C e armazenado em frasco de vidro dentro de um dessecador (BARTILOTTI et al., 2019).

O mineral magnetizado foi caracterizado e analisado quanto ao seu potencial adsortivo a poluentes da AP2 por Bartilotti et al. (2019) que propôs o contato da vermiculita magnetizada com a amostra na proporção 30 mg/mL (MYSORE; VIRARAGHAVA, 2005) em agitação mecânica médica por até 30 min utilizando separação magnética para obter o sobrenadante. Para a realização dos bioensaios, o líquido foi filtrado (filtro 0,45 µm) e, posteriormente armazenado, em garrafas de politereftalato de etileno, mantidas a 4ºC (BARTILOTTI et al., 2019).

3.2 Salinidade

A salinidade das amostras (AP1 e AP2 antes e após os tratamentos foi mensurada utilizando o equipamento Sper Scientific 300035 pelo método de refração seguindo as recomendações do fabricante. Antes da análise da salinidade das amostras, foi feita a calibração do equipamento com água desionizada, tendo obtido valores de refração entre 1.3329 e 1.3331(considerados adequados pelo fabricante). Após a calibração, a analise da refração foi realizada empregando 1 ml da amostra a ser analisada.

3.3 *Danio rerio*

3.3.1 Manutenção e obtenção dos ovos de Danio rerio

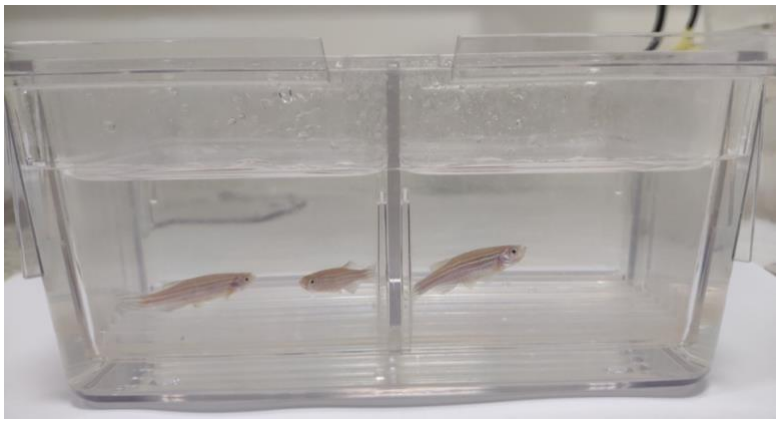
Todo o protocolo de avaliação de toxicidade previsto neste projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCFRP, USP (CEUA, protocolo número 17.1.937.60.4, emitido em 14 de dezembro de 2017- Anexo 1).

Machos e fêmeas de zebrafish adultos foram mantidos juntos em água reconstituída e padronizada de acordo com as ISO 7346-1 e 7346-2 (ISO, 1996) no equipamento ZebTech (Techniplast), à temperatura de 26±1°C, fotoperíodo de 14 h claro e 10 h escuro e mantidos com alimentação à base de ração comercial e camarão de água salgada.

Para o acasalamento e aquisição dos ovos, foram colocados dois machos e uma fêmea (proporção 2:1) no dia anterior a desova em um sistema reprodutor próprio que mantém machos e fêmea separados, conforme pode ser observado

na Figura 19. Esse sistema permite a troca de água entre os espaços ocupados pelos organismos, sem contato físico, permitindo o contato das fêmeas com os feromônios liberados pelos machos durante toda a noite, otimizando o acasalamento.

Figura 19 – Aquário de reprodução de peixes da espécie *Danio rerio,* contendo dois machos e uma fêmea.



Fonte: Autora

O acasalamento dos organismos ocorria na manhã seguinte após iluminação do aquário, quando a grade de separação entre machos e fêmea era retirada. Os organismos eram, então, mantidos juntos por cerca de 1h e 30 minutos. O sistema conta ainda com gradeamento na parte inferior do aquário, que impede que os adultos se alimentem dos ovos fecundados. Os ovos foram coletados 30 minutos após a desova, transferidos para uma placa de Petri e lavados com água reconstituída padronizada para posterior separação entre aqueles fecundados, que poderiam ser utilizados no ensaio, e não fertilizados que foram descartados, com auxílio de microscópio de dissecação (SZM-168, Motic). Para os experimentos, foram selecionados ovos que alcançarem o estágio de blástula.

3.3.2 Fish Embrio Test (FET)

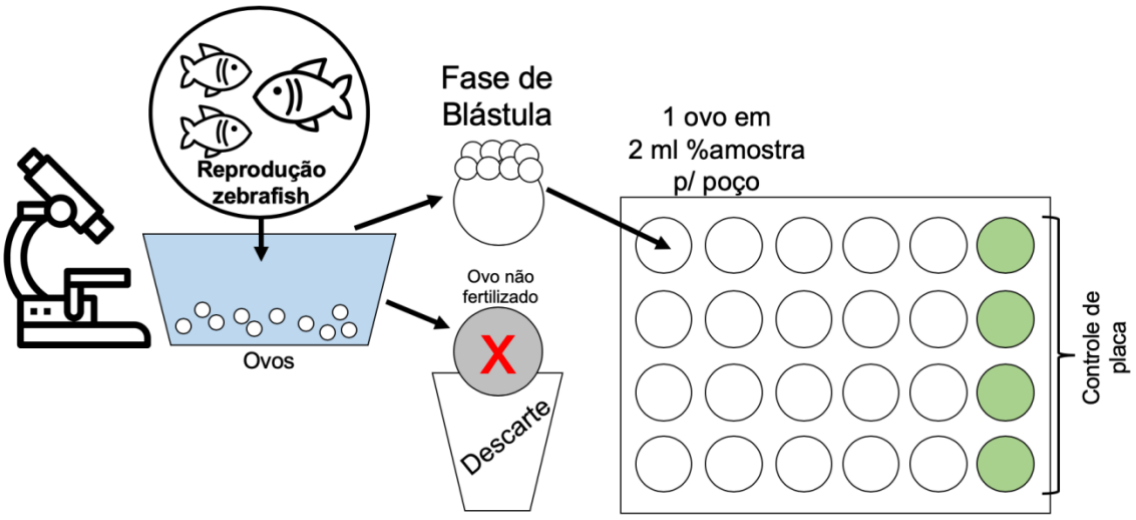
As alterações no desenvolvimento em embriões de zebrafish foram avaliadas de acordo com Nagel (2002) e OECD Guideline 239 (OECD, 2013), com pequenas modificações.

Para realização do teste, foi utilizada a amostra AP1 bruta e após tratamento por fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização

fotoeletrocatalítica. As amostras burtas e tratadas foram autoclavadas e, posteriormente filtradas. Todas as amostras foram testadas nas diluições de 25%, 12,5%, 7,5%, 5% e 2,5% com água padronizada OECD, contendo cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, bicarbonato de sódio e cloreto de potássio (OECD, 2013). Para realização do FET foram utilizados 3,4-dicloroanilina e água padronizada OECD como controle positivo e negativo, repectivamente.

Foram utilizados 24 ovos fertilizados, distribuídos em placas de cultura de 24 poços em triplicata (por diluição de cada amostra mais o controle de placa com apenas água OECD) e incubados a 26°C ± 1°C com ciclo de 14h de luz e 10h de escuro. As avaliações foram iniciadas após 8 horas e, posteriormente, a cada 24h até 144horas, com o auxílio de estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) acoplado com câmera (LV-TV, Nikon, Japão). A Fígura 20 a seguir ilustra esse processo.

Figura 20 – Esquema ilustrativo da exposição de zebrafish para a realização do ensaio ao Fish Embrio Test (FET).



Fonte: Autora

Foram utilizados os indicadores de letalidade, sub-leatlidade e teratogenicidade recomendados por Nagel (2002) e apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros avaliados em cada etapa de desenvolvimento dos embriões de zebrafih.

ENDPOINTS	Tempo de exposição (hpf)						
	8	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
Letalidade							
Coagulação	x	x	x	x	x	x	x
Não desprendimento da cauda		x	x	x	x	x	x
Ausência de somitos		x	x	x	x	x	x
Ausência de batimentos cardíacos			x	x	x	x	x
Subletalidade							
Edema cardíaco ou de saco vitelínico				x	x	x	x
Ausência de pigmentação			x	x	x	x	x
Bexiga natatória não inflada							x
Teratogenicidade							
Não eclosão					x	x	x
Malformação da cabeça e olhos		x	x	x	x	x	x
Crescimento retardado		x	x	x	x	x	x
Deformidades esqueléticas				x	x	x	x

(hpf) = horas pós fertilização
Fonte: Adaptado de NAGEL, 2002.

A avaliação da letalidade foi calculada através da concentração letal média (CL_{50}), por meio da observação da coagulação dos embriões, irregularidades na formação dos somitos, problemas na liberação da cauda e perda de batimentos cardíacos. A sub-letalidade foi calculada por meio da concentração efetiva média (CE_{50}), definida por alterações no saco vitelino, defeitos na inflação da bexiga natatória, edemas do pericárdio e saco vitelino, deformações esqueléticas e incapacidade de eclosão. Os valores de CL_{50} e CE_{50} dos testes de toxicidade aguda foram calculados com o software Trimmed Sperman-Karber (HAMILTON et al, 1977) no qual os valores encontrados foram utilizados para caracterizar a toxidade aguda da AP bruta e após o tratamento por POAs.

3.4 *Vibrio fischeri*

Os testes com a bactéria *Vibrio fischeri* foram realizadas seguindo a norma ABNT NBR 15411-3 (ABNT, 2012) no setor de laboratório de Ribeirão

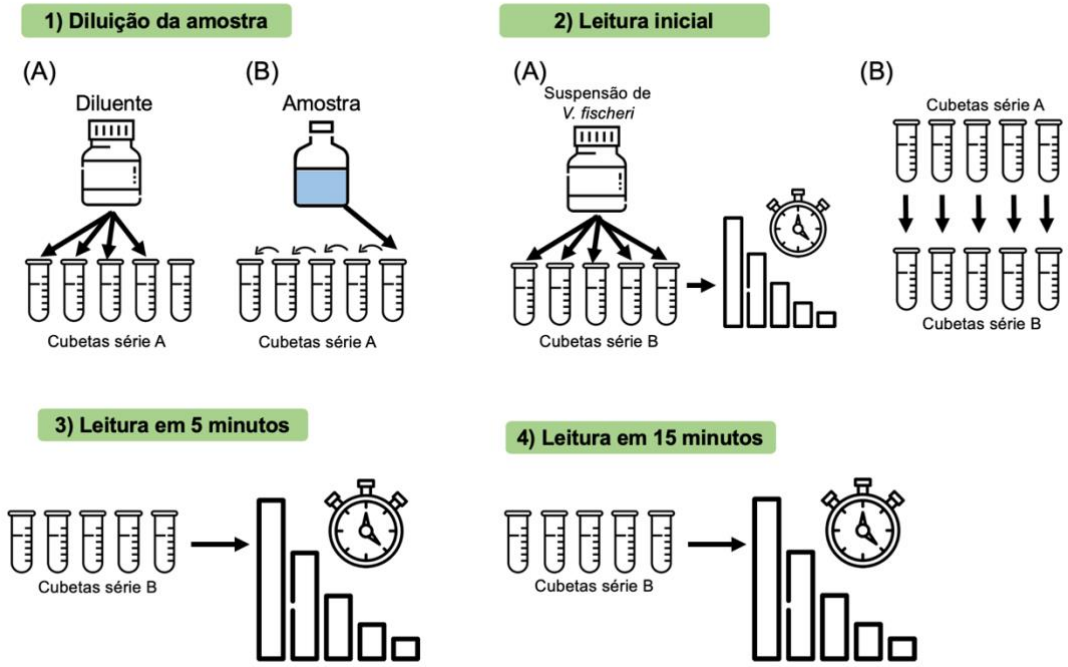
Preto da Companhia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), sob supervisão do gerente Dr. Eduardo Angelino Savazzi.

O teste consiste na exposição das bactérias antes e após as amostras por um período de 5 e 15 minutos, com posterior medição da luminescência emitida pela *Vibrio fischeri*. A diferença da intensidade de luz emitida é comparada com o controle, no qual a amostra é substituída pelo diluente (NaCl 2%). Os testes foram executados no aparelho Microtox, composto por um luminômetro de precisão com unidade integrada de medição e comando e um termobloco de temperatura controlada. Os procedimentos de execução do ensaio foram determinados pelo software Microtox, tais como a sequência das amostras a ser inserida no equipamento, tempo de incubação, leituras e cálculos dos resultados (CETESB, 2012).

Para realização do teste foram utlizadas culturas liofilizadas com aproximadamente 10^8 bactérias à temperatura entre -20 e -25ºC, reconstituídas em solução salina. A primeira medição de luz das bactérias foi realizada após resuspensão de alíquota contendo 10^6 células distribuídas em cubetas. Na sequência, foram adicionadas às cubetas contendo a suspensão bacteriana, a amostra testada e o diluente, utilizado como controle negativo, conforme pode ser observado no esquema da Figura 21 (CETESB, 2012). Foram utilizadas duas concentrações iniciais, uma de 90% para as amostras AP1, fotocatálise, fotoeletrocatálise e ozonização fotoeletrocatalítica. E outra concentração inicial de 81,9% para as amostras ozonização, AP2 e AP2 VMT-mag.

A razão da diferença das concentração iniciais deve-se ao fato que as amostras com cenecntração inicial de 90% possuiam salinidade maior que 20g/L de NaCl equivalente, e assim não necessitam a adição da solução de ajuste osmótico, apenas a adição da solução reagente (ressuspensão de *Vibrio fischeri*), neste caso as amostras partem da concentração de 90% e através de diluições 1/1 são utilizadas as concentrações de 45%, 22,5%, 11,25%, 5,62%, 2,81% e 1,41%. As amostras que partiram da concentração de 81,9% precisaram da adição, além da solução reagente, da solução de ajuste osmótico. Desta forma suas concentrações analisadas foram de 81,9%, 40,95%, 20,48%, 10,24%, 5,12%, 2,56% e 1,28% .

Figura 21 - Esquema do teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri.*



Fonte: Autora

3.5 *Daphnia similis*

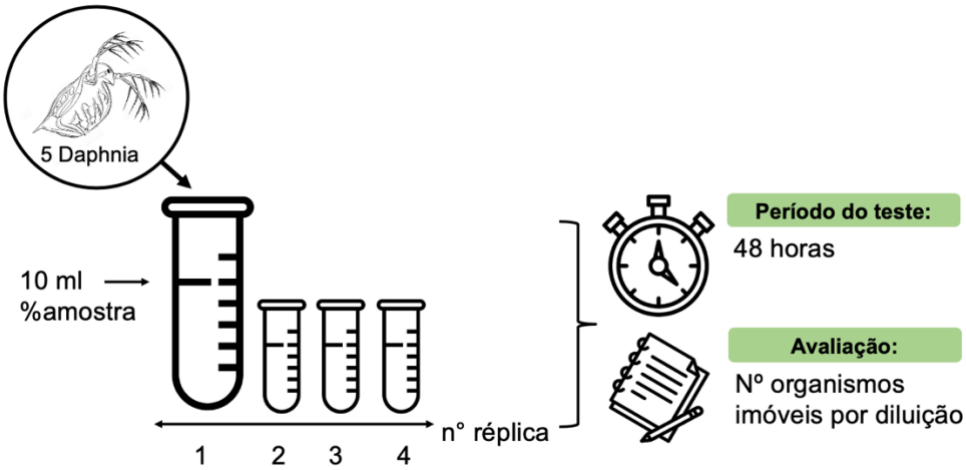
As *Daphnia similis* foram mantidas no Setor de Laboratórios de Ribeirão Preto da CETESB, onde foram realizados os testes. Os organismos foram mantidos a 20 ± 2ºC com intensidade luminosa de 1000 lux sob um fotoperíodo de 16: 8 h (claro/escuro) e alimentados diariamente com as algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram realizados seguindo as recomendações da norma ABTN NBR 12713, com neonatos obtidos por partenogênese a partir da segunda postura, com idade entre 6 e 24h de nascimento, oriundos de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias

O teste foi realizado com no mínimo 5 soluções-teste (10 ml) em 4 réplicas, além do controle negativo, que foi preparado apenas com água de diluição, também em triplicata, nas seguintes diluições: AP1 e POAs (0,781%, 1,562%, 3,125%, 6,25% e 12,5%,) AP2 (0,78%, 1,56%, 3,12%, 4,16%, 5,2%, 6,25% e 12,5%) e AP2 tratada com VMT-mag (0,78%, 1,56%, 3,25%, 6,25%,

8,33%, 10,42% e 12,5%). O oxigênio dissolvido, assim como o pH foi medido no início e no fim do ensaio, na menor e na maior concentração das soluções-testes além do controle. Foram utilizados 5 neonatos por recipiente-teste, transferidos cuidadosamente com auxílio de uma pipeta ou conta-gotas, liberados o mais próximo possível da solução de forma a evitar a entrada de ar sob sua carapaça e sua possível flutuação. Após a transferência dos organismos para os respectivos recipientes-teste, esse foram cobertos e mantidos à temperatura ente 18°C e 22°C por 48h em ambiente escuro e sem alimentação. Ao completar a exposição de 48h, os números de organismos móveis e imóveis foram contados manualmente para o cálculo da CE_{50} (Figura 22)

Figura 22 – Esquema ilustrativo do teste de toxicidade aguda com Daphnia similis em uma diluição.



Fonte: Autora

3.6 *Daphnia magna* (clone BEAK)

Daphnia magna (clone Beack) foi cultivada, nas mesmas condições descritas por Abe et al. (2019) no laboratório CEASAM da Universidade de Aveiro, em água padronizada *American Society for Testing and Materials* (ASTM) enriquecida com extrato orgânico (extrato de alga marinha, fornecido pela Glenside Organics Ltd., UK), com fotoperíodo 16:8h (claro/escuro) e temperatura de 20 ± 2 C. Os organismos foram mantidos em aquários de 1L em uma densidade de 18 a 25 organismos por litro, com alimentação a base de alga verde Raphi- docelis subcapitata (3.105 células/mL/organismo), com renovação do meio a cada dois dias. Nos bioensaios foram utilizados neonatos (até 24h) da

3ª ou 4ª linhagem de adultos cultivados, distribuídos aleatoriamente em diferentes tratamentos.

Os testes de toxicidade crônica de 21 dias com o organismo Daphnia *magna* (Figura 23) foram realizados de acordo com a diretriz OECD n° 211 (OECD, 2012). Para tanto, foram utilizadas cinco diluições (0,125%, 0,32%, 0,8%, 2% e 5%) distribuídas em 10 replicas por diluição, contendo um organismo com até 24 horas pós-eclosão em 50 ml de amostra de AP2 com e sem tratamento mais o controle negativo apenas com água de cultivo (Figura 24). O meio e o alimento foram trocados a cada dois dias. Ao longo dos 21 dias de teste, monitoramos a mortalidade, o número de neonatos produzidos, o tempo da primeira ninhada e o número de ninhadas em cada repetição foram registrados para calcular a taxa intrínseca de aumento populacional (r) usando a equação de Euler (LOTKA, 1913)

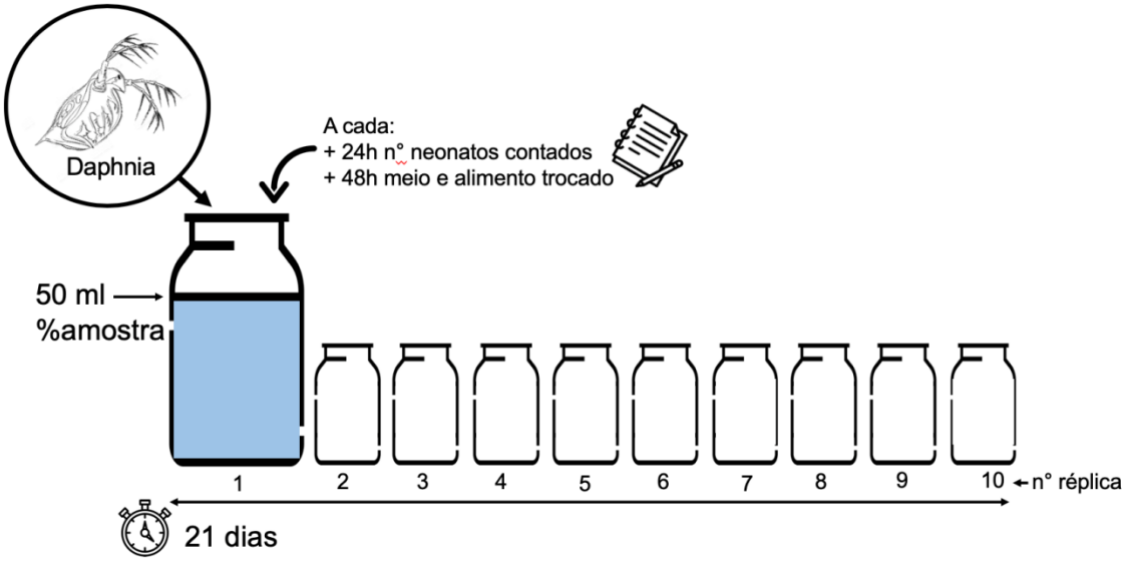
$$1 = \sum_{x=0}^{x} e^{-rx}\, lxmx$$

onde r é a taxa de aumento da população (dia -1), x é a classe de idade em dias (0 ... n), lx é a probabilidade de sobreviver até a idade x e mx é a fecundidade na idade x.

Figura 23 –Medição da *Daphnia magna* adulta ao final do teste de 21 dias.

Fonte: Autora

Figura 24 – Esquema ilustrativo do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna.*



Fonte: Autora

3.7 *Chironomus riparius*

Os mosquitos foram mantidos nas mesmas condições descritas por Campos et al. (2017) no laboratório CEASAM da Universidade de Aveiro, Portugal, com uma camada de sedimento orgânico e uma de água reconstituída (ASTM, 1980), a temperatura de 20 ± 1°C e fotoperíodo de 16 h claro e 8 h escuro. A alimentação das larvas ocorreu a cada dois dias, a base de ração de Tetramin® macerada, com troca da água uma vez por semana.

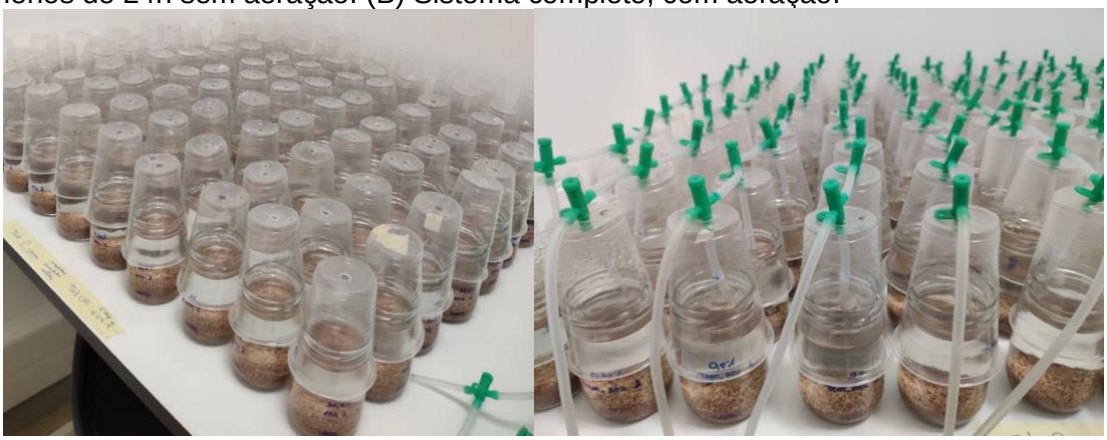
3.7.1 Toxicidade aguda (Chironomus riparius)

Para o teste de toxicidade aguda foram utilizadas 5 réplicas em placas de 6 poços contendo 10 ml da amostra a ser testada com 5 chironomideos com até 24 horas pós-eclosão, nas diluições de 1,5625%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% tanto da amostra de AP2 com e sem tratamento mais o controle negativo contendo apenas água de cultivo. O teste teve duração de 48h sem qualquer tipo de alimentação, onde a cada 24h foram avaliados e contabilizados o número de organismos mortos.

3.7.2 Toxicidade crônica (Chironomus riparius)

Com os organismos *Chironomus riparius* foram realizados testes de mortalidade, crescimento (corpo e cabeça), emergência e peso conforme descritos por Campos et al. (2017). O teste de toxicidade crônica de 28 dias foi realizado de acordo com a norma OECD 218, com modificações (OECD, 2004). Os organismos foram expostos em frascos de vidro com sedimento artificial e alimentação a base de ração Tetramin®. As larvas com 48 hpf foram expostas a cinco diferentes diluições das amostras de AP bruta e tratada (0,32%, 0,8%, 2%, 5% e 12,5%), além de um tratamento controle negativo contendo apenas água de cultivo. Para o teste foram utilizados 50g (peso seco) de sedimentos artificial, contaminado com 150 ml de cada amostra, com 5 larvas cada, reservados por 24h sem aeração (Figura 25A), a aeração do sistema ocorreu das seguintes 24h e até o final do teste (Figura 25B). Temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade em todos os tratamentos em três repetições escolhidos aleatoriamente foram avaliados.

Figura 25 – Teste de toxicidade crônica com *Chironomus riparius* – (A) Sistema com menos de 24h sem aeração. (B) Sistema completo, com aeração.



A **B**

Fonte: Autora

Na avaliação dos efeitos, foram utilizadas 10 réplicas com cinco larvas cada. Os organismos foram alimentados em dias alternados com ração Tetramin® macerada em solução (0,5 mg por organismo por dia), sob as mesmas condições descritas para manutenção dos organismos em laboratório. Após 10 dias, os organismos de metade das réplicas (5 réplicas) foram removidos e mantidos em etanol 70% para medições larvais (corpo e cabeça) com auxílio de um estereomicroscópio de dissecação acoplado com um

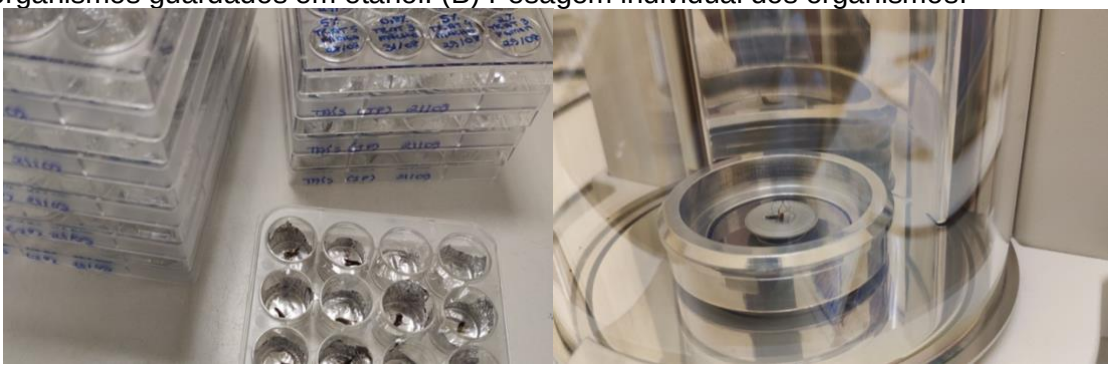
micrômetro ocular (Figura 26). O restante dos organismos das réplicas (5 restantes) foi mantido até 28 dias (final do teste). O número de mosquito adultos foi registrado diariamente para avaliar a emergência (dividido entre machos e fêmeas) e o tempo médio de emergência dos organismos. Os mosquitos emergentes foram separados quanto o sexo das diferentes diluições, mantidos em etanol 10% para posterior pesagem (Figura 27). O esquema (Figura 28) demonstra a montagem do teste crônico para uma diluição.

Figura 26 – Medições das larvas de *Chironomus riparius*. (A) Cabeça. (B) Corpo.

A **B**

Fonte: Autora

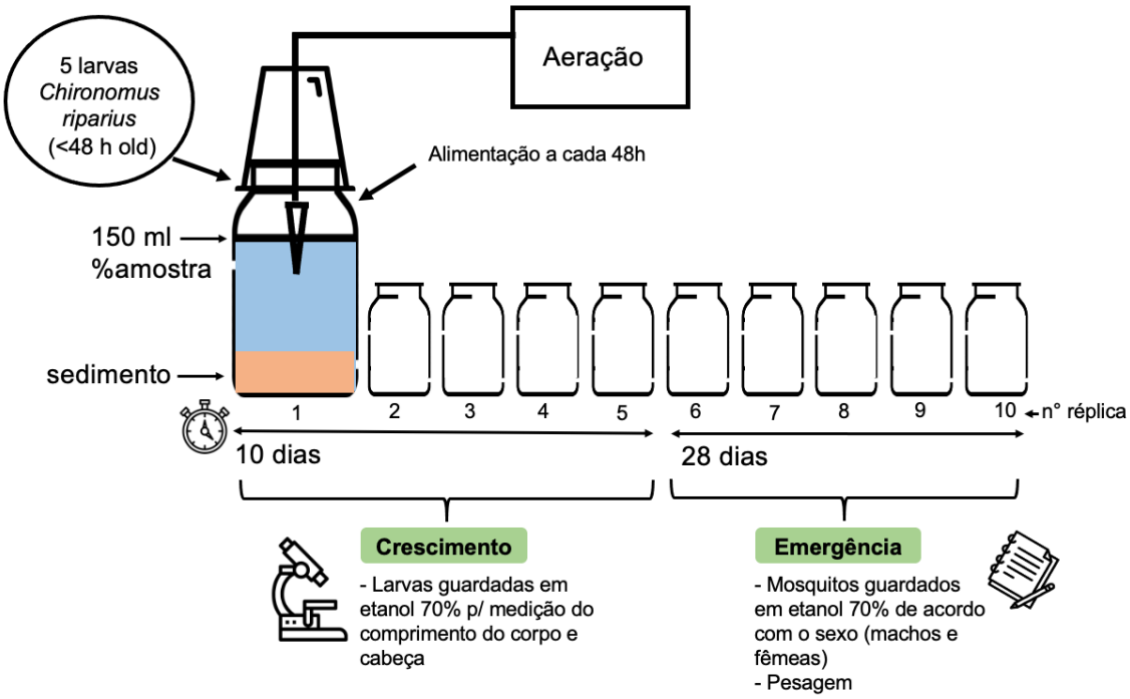
Figura 27 – *Chironomus riparius* separados para pesagem. (A) Secagem dos organismos guardados em etanol. (B) Pesagem individual dos organismos.



A **B**

Fonte: Autora

Figura 28 – Esquema ilustrativo do teste de toxicidade crônica com *Chironumos riparius*.

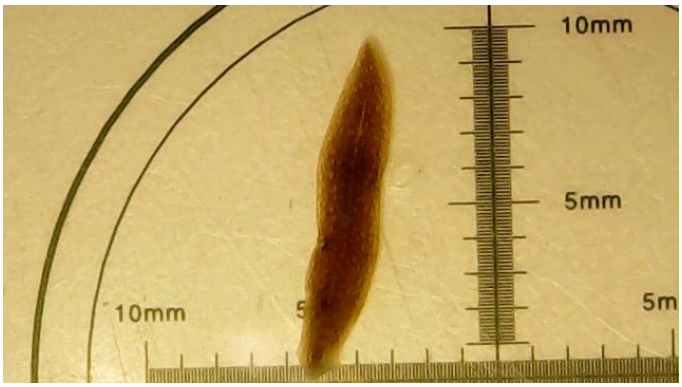


Fonte: Autora

3.8 *Dugesia tigrina*

As planárias foram mantidas no laboratório CEASAM em recipientes de plástico com uma cama de água reconstituída (ASTM, 2004), com fotoperíodo sem exposição a luz e temperatura de 20 ± 1°C. A alimentação ocorreu uma vez por semana a base de fígado de galinha, com troca da água após a alimentação e a cada 2 dias. Para o experimento foram utilizadas planárias com aproximadamente 1,0 cm de comprimento (Figura 29), privadas de alimentação por uma semana a fim de se evitar falsos positivos em decorrência da ingestão do alimento (WU; PERSINGER, 2011) e para padronizar as exposições a substância a ser testada (OVIEDO et al., 2008).

Figura 29 – Planária *Dugesia tigrina* com aproximadamente 1 cm, utilizada nos testes de toxicidade.



Fonte: Autora

3.8.1 Toxicidade aguda

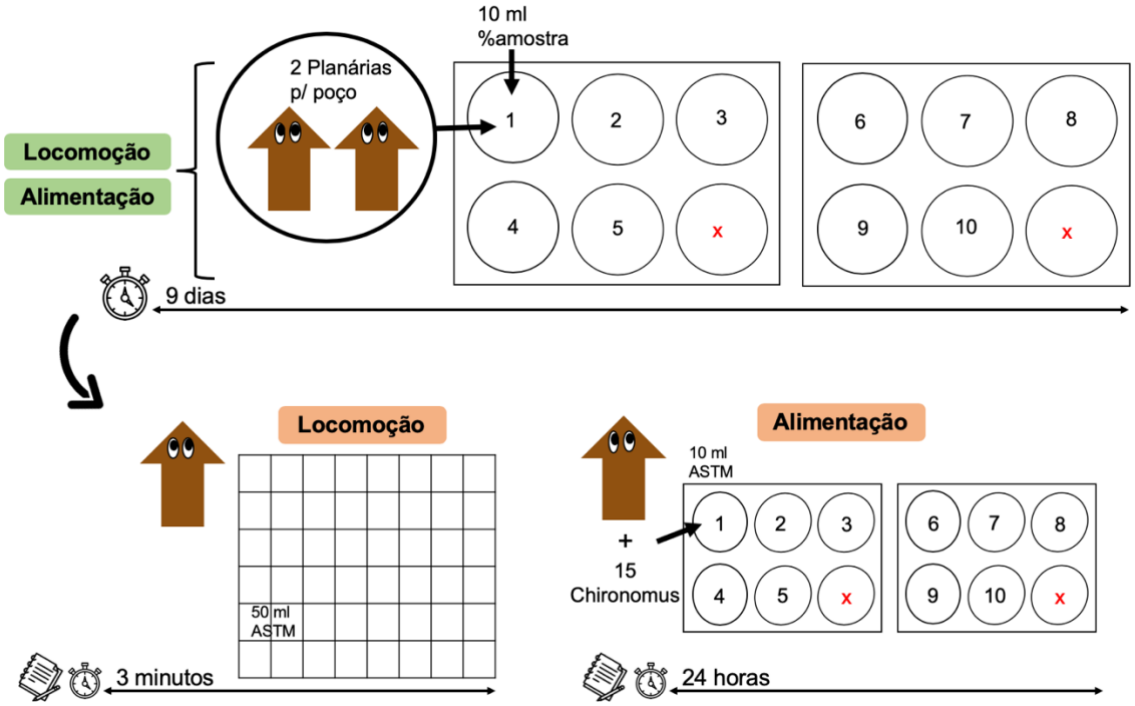
Para o teste de toxicidade aguda foram determinadas 7 diluições das amostras de AP2 bruta e tratada (1,5625%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%), além do controle negativo (ASTM). O teste foi realizado em placas de 6 poços, com 5 réplicas, contendo 5 planárias por poço com 10 ml da solução a ser testada. O teste ocorreu até 96h, sendo que a cada 24h os organismos foram avaliados e a possível mortalidade foi registrada.

3.8.2. Parâmetros Comportamentais

Foram realizados três testes comportamentais, locomoção, alimentação e regeneração para as amostras AP2 tratadada e sem tratamento.

Para os testes de locomoção e alimentação, os organismos foram expostos à 5 diferentes diluições sub-letais (0,32%, 0,8%, 2%, 5% e 12,5%) das amostras por um período de 9 dias com renovação do meio a cada 3 dias, além do controle negativo com meio ASTM. A exposição foi realizada em placas de 6 poços, contendo 10ml de cada amostra a ser testada. O teste foi realizado com 10 réplicas, com duas planárias por poço, por diluição. Após a exposição os organismos foram separados para medição dos parâmetros de locomoção e alimentação (Figura 30).

Figura 30 – Esquema ilustrativo a exposição das planárias *Dugesia tirgrina* para avaliação dos parâmetros de locomoção e alimentação.

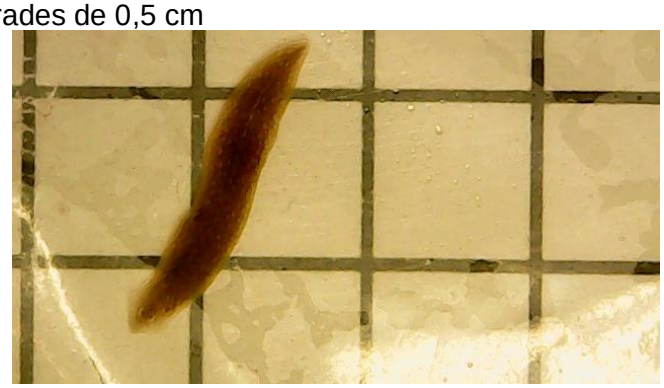


Fonte: Autora

- *Locomoção*

Após a exposição das planárias, a atividade locomotora foi avaliada de acordo com Raffa et al. (2001) e Pagán et al. (2009) com pequenas modificações. Cada planária foi transferida para um prato transparente contendo 50 ml de meio ASTM, sobre uma folha quadriculada contendo espaçamentos de 0,5 cm (Figura 31). A atividade locomotora de cada organismo foi calculada de acordo com o número de linhas de grades cruzadas por um período de 3 min em uma sala bem iluminada, após 30 segundos de aclimatação dos organismos. Os resultados obtidos foram calculados como o número médio de linhas de grade cruzadas por diluição.

Figura 31 – Planária *Dugesia tigrina* no teste de locomoção sobre prato transparente contendo linhas de grades de 0,5 cm



Fonte: Autora

- *Inibição Alimentar*

Após a exposição, foram transferidas 10 planárias, de cada diluição testada, individualmente para placas de 6 poços contendo 10 ml de meio ASTM (1 planária por poço). Em cada poço, foram adicionadas 15 larvas de *Chironomus riparius* (sete dias de idade) (Figura 32) e o número de larvas consumidas foi registrado nos períodos de 4h, 12h e 24h.

Figura 32 – Avaliação de inibição alimentar com Planária *Dugesia tigrina*. (A) *Chironomus riparius* com 7 dias utilizados na alimentação das planárias. (B) Exposição individual das planárias com disposição de alimento em placas de 6 poços.

A **B**

Fonte: Autora

3.8.3. Parâmetro de regeneração

Para o teste de regeneração da cabeça foi necessário decapitar as planárias a serem expostas acima da faringe (Figura 33). Os organismos decapitados foram expostos as mesmas diluições (AP2 bruta e tratada) descritas anteriormente para os parâmetros de locomoção e alimentação sob as

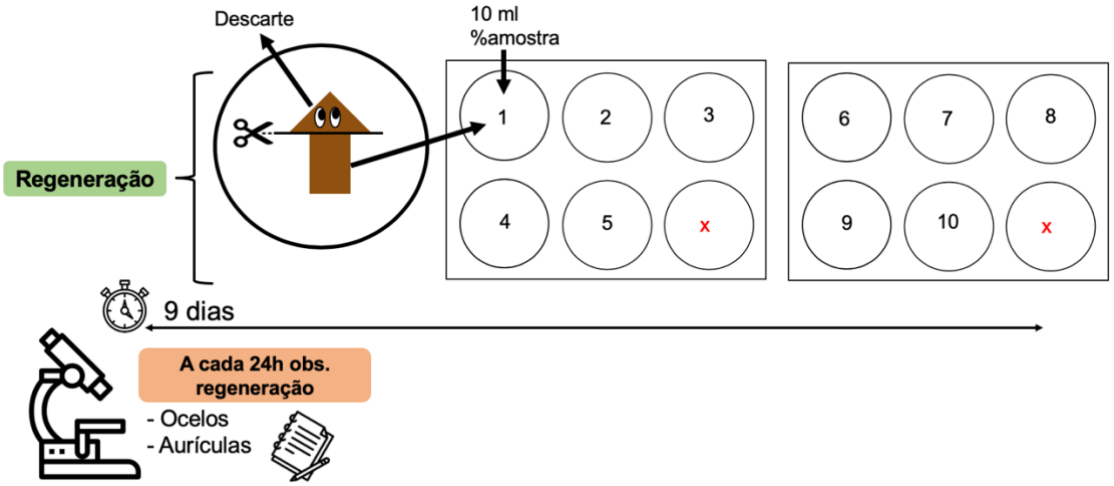
mesmas condições laboratoriais, além de um controle negativo contendo apenas meio ASTM.

Figura 33 –Planária *Dugesia tigrina* decapitada acima da faringe para avaliação do crescimento da cabeça e regeneração dos fotorreceptores e aurículas.

Fonte: Autora

Os organismos foram expostos em 10 replicas (contendo uma planária decapitada em cada) em placas de 6 poços contendo 10 ml de cada diluição, por um período de 9 dias, com troca da solução a cada 48h. A cada 24h, os organismos de cada uma das diluições foram avaliados quanto ao processo de regeneração cefálica, até a formação de fotorreceptores e das aurículas, com o auxílio de microscópio estéreo Zeiss (LED KL 300), conforme Figura 34.

Figura 34 – Esquema representativo do teste de regeneração da planária *Dugesia tigrina.*



Fonte: Autora

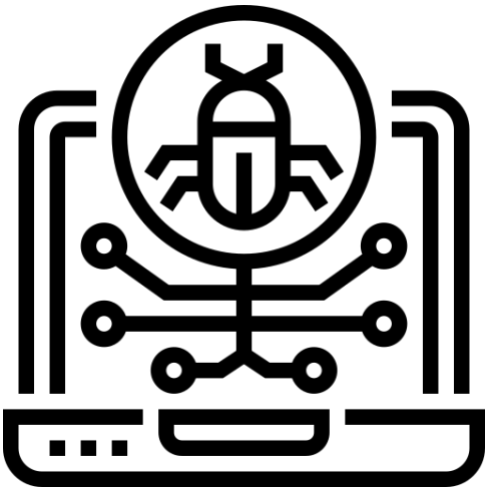
3.9 Análise estatística

O software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) foi usado para análises estatísticas. Após a verificação da

normalidade e homogeneidade (teste de Kolmogorov-Smirnov e testes de Barlett, respectivamente), foi realizada análise de variância one-way (ANOVA) e aplicado o teste de Dunnett para verificar diferenças significativas entre os tratamentos e controles. No caso de falha na normalidade e/ou teste de homocedasticidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A menor concentração de efeito observado foi determinada quando diferenças significativas foram encontradas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 0,05.

Capítulo
04

RESULTADOS E DISCUSSÃO



. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estrutura

Os resultados bem como a discussão foram agrupados por amostra e, desta forma, este item está subdividido em AP1 e AP2.

4.2 Amostra de água produzida de petróleo n. 1 (AP1)

4.2.1 Tratamento com POAs

De acordo com Brito et al., (2019), a avaliação da redução de cor do efluente sem tratamento (AP1), mostra que todos os tramentos foram eficientes, na seguinte ordem: ozonização fotoeletrocatalítica > ozonização > fotoeletrocatálise > fotocatálise. O tratamento combinado (fotoeletrocatálise e ozonização) foi o que melhor reduziu a cor da AP1, com uma porcentagem de remoção de 97% após duas horas de tratamento.

A tubidez da AP1 também descresceu de forma drástica com os tratamentos, tendo sido obsevada uma eficiência de mais de 90%, sendo que a ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica apresentaram melhores resultados (BRITO et al., 2019). Sendo esse um comportamento já observado em outros estudos após a aplicação de O_3 em efluentes, mostratando que o tratamento por O_3 apresenta alta capacidade de reduzir cor e turbidez de soluções residuais (BESSEGATO et al., 2016; CARDOSO et al., 2016).

Já em relação à condutividade, os tratamentos por fotocatálise, fotoeletrocatálise e ozonização apresentaram resultados similares de redução, com porcentagem em torno de 38%, sendo o tratamento combiando (fotoeletrocatálise e ozonização) o mais eficaz (BRITO et al., 2019).

Todos os tratamentos foram capazes de reduzir a demanda química de oxigênio (DQO), sendo que ozonização fotoeletrocatalítica foi a quem melhor apresentou resultados, com uma redução que atingiu 73% (BRITO et al., 2019).

A fotoeletrocatálise apresentou resultados superiores de redução de carbono orgânico, total e inorgânico quando comparada a técnica de fotocatálise ao tratamento da AP1.

A técnida de ozonização fotoeletrocatalítica foi a que melhor apresentou resultados na redução da concentração tanto de cloreto quanto de fluoreto, atingido remoção de 35% e 96% respectiviamente (BRITO et al., 2019).

Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS), Brito et al., (2019) identificaram 12 compostos orgânicos na AP1 antes dos tratamentos, conforme observado na Tabela 7. Os compostos identificados como eucaliptol, 1,7,7-trimetil-1-biciclo [2,2,1] heptan-2-ona, terpineol, 4-(1,1-dimetiletil), ciclohexano, acetato de isobornila, dietilftalato e ácido octadecanóico (ácido esteárico), foram degradados a níveis não mais identificáveis em todas as técnicas empregadas após 2h de tratamento. Entretanto, o composto ácido octadec-9-enóico (oleína) foi apenas degradado após aplicação das ténicas de fotoeletrocatálise e de ozonização fotoeletrocatalítica. Os compostos benzaldeído, álcool benzílico, octadecano e ácido hexadecanóico tiveram reduções na abundância do íon molecular, com maior eficiência para o tratamento de fotoeletrocatálise para o álcool benzílico, octadecano e o ácido hexadecanóico, enquanto o benzezldeído foi melhor degradado pela ozonização fotoeletrocatalítica (BRITO et al., 2019).

Tabela 7 - Compostos orgânicos com as suas respectivas abundâncias do íon molecular obtidos para a água produzida 1 (AP1) antes e após os tratamentos com as técnicas fotocatálise (FC), fotoeletrocatálise (FEC), ozonização (O_3) e ozonização fotoeletrocatalítica (FEC+O_3).

Composto	Íon molec.	Íon molecular				
		AP1	FC	O_3	FEC	FEC + O_3
Benzaldeído	m/z 105	10653.81	5437.11	6193.25	8701.01	3012.8
Eucaliptol	m/z 108.1	133085.67	N/A	N/A	N/A	N/A
Álcool Benzílico	m/z 79.1	113631.53	48126.62	32162.94	21666.34	36281.0
1,7,7-trimetil-1-biciclo [2,2,1]heptan 2-ona	m/z 95.1	207541.47	N/A	N/A	N/A	N/A
Terpineol	m/z 93.1	15313.49	N/A	N/A	N/A	N/A
4-(1,1-dimetiletil) ciclohexano	m/z 98.1	1483302.25	N/A	N/A	N/A	N/A
Acetato de isobornila	m/z 93.1	51842.73	N/A	N/A	N/A	N/A
Dietilftalato	m/z 149	27604.6	N/A	N/A	N/A	N/A
Octa-decano	m/z 57.1	26573.66	2037.0	4676.76	2170.51	9779.5
Ácido hexa-decanóico	m/z 73.1	22211.37	2457.81	5958.81	1064.96	15420.53
Ácido octadec-9- enóico (oleína)	m/z 55.1	8661.37	1250.0	2146.7	N/A	N/A
Ácido octadeca-nóico (ácido esteárico)	m/z 73.1	4894.41	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = não avaliado.

Fonte: Adaptado de Brito (2019)

4.2.2 Danio rerio

A salinidade da AP1 sem tratamento foi de 44 g/L enquanto dos tratamentos de fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica foi de, respectivamente, 46, 42, 45 e 49 g/L. Considerando que as amostras foram diluidas para a realização dos testes em organismos aquáticos, sendo a maior concentração de 25%, a salinidade final das amostras variou entre 10,5 a 12,25 g/L. Portanto, não induzindo toxicidade aos organismos relacionada a osmolaridade (VENÂNCIO et al., 2020).

A amostra AP1, antes e após os tratamentos (fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica), induziu a diferentes efeitos nos estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish, porém, diferentes intensidades, como apresentado na Tabela 8. Todos os efeitos citados na Tabela 6 (item 3.2.2) foram avaliados, no entanto, os efeitos observados após a exposição foram letalidade, falha na eclosão, malformações esqueléticas e não inflação da bexiga natatória, conforme ilustrado nas Figuras 35 a 38.

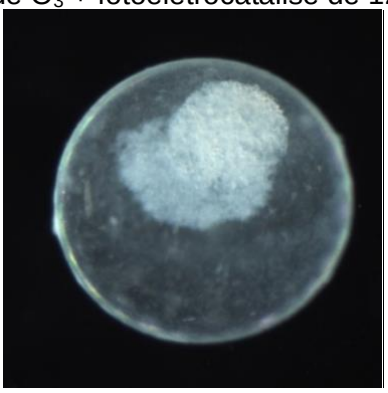
Tabela 8 - Efeitos observados após a exposição de embriões de zebrafish a diferentes diluições da amostra gerada após o tratamento de água de petróleo por fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e fotoeletrocatálise + ozonização. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

ÁGUA PRODUZIDA 1				
Diluição (%)	**Efeito Observado**			
	Mortalidade (%)	**Escoliose (%)**	**Não inflação da bexiga natatória (%)**	**Falha na eclosão (%)**
25,0	100	0	0	0
12,5	25,0 (± 15)	29,44 (±14,6)	100	77,21 (±12,9)
7,5	1,7 (± 2.9)	0	6,92 (±8,1)	11,66 (±20,2)
5,0	1,7 (± 2.9)	0	0	1,66 (±2,9)
2,5	0	1,66 (± 2,88)	0	1,66 (±2,9)
Tratamento com fotocatálise				
25	100	0	0	0
12,5	35(± 30,4)	7,5 (± 8,44)	100 (± 0)	6,00 (5,88) *
7,5	0	0	0	0
5	1,7 (± 2,9)	0	0	0
2,5	0	0	0	0
Tratamento com fotoeltrocatálise				
25	100	0	0	0
12,5	43,3 (± 34,0)	49,7 (± 29,37)	100 (± 0)	61,97 (± 27,87)
7,5	0	0	6,66 (11,54)	0
5	1.7 (± 2,9)	0	0	0
2,5	6.7 (± 7,6)	0	3,33 (5,77)	1,66 (2,88)

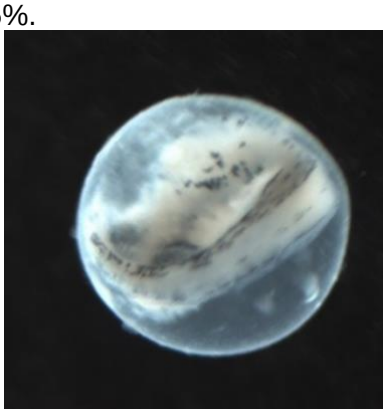
Tratamento com O_3				
25	100	0	0	0
12,5	23,3 (± 17,6)	50,26 (± 30,78)	97,77 (± 3,85)	50,99 (± 21,63)
7,5	6,7 (± 11,5)	5 (± 8,66)	3,33 (± 2,88)	1,66 (± 2,88)
5	1,7 (± 2,9)	0	0	0
2,5	0	0	1,66 (± 2,88)	0
Tratamento com fotoeletrocatálise + O_3				
25	100	0	0	0
12,5	16,7 (± 14,4)	1,66 (± 2,88) *	100 (± 0)	75,55 (± 31,5)
7,5	0	0	0	0
5	3,3 (± 5,8)	0	0	0
2,5	0	0	0	0

(*) = diferença significativa entre amostra bruta ($p \leq 0,05$)
Fonte: Autora.

Figura 35 – Avaliação da letalidade de *Danio rerio* expostos à amostra de água produzidade de petróleo. (A) Ovo coagulado observado após 24 hpf de exposição de embriões de Zebrafish à água de petróleo tratada por fotocatálise (diluição a 25%). (B) Organismo morto após 144 hpf, exposto a água de petróleo após o tratamento combinado de O_3 + fotoeletrocatálise de 12,5%.



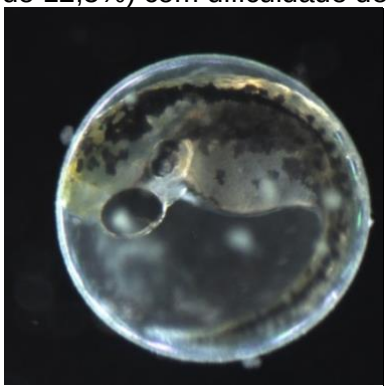
A



B

(hpf) = horas pós fertilização
Fonte: Autora

Figura 36 – Embrião de zebrafish com falha na eclosão. (A) Organismo com 96 hpf exposto à AP1 diluída a 12,5%. (B) Organismo com 96 hpf exposto à AP tratada com O_3 (diluição de 12,5%) com dificuldade de eclosão.

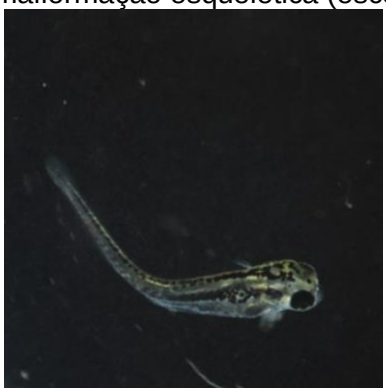


A

B

(hpf) = horas pós fertilização
Fonte: Autora

Figura 37 – Larva de zebrafish com 144 hpf, exposto a água produzida de petróleo bruta, diluída a 12,5%, com malformação esquelética (escoliose)



(hpf) = horas pós fertilização
Fonte: Autora.

Figura 38 - Larva de zebrafish com 144 hpf exposto à água produzida de petróleo tratada por fotoeletrocatálise, diluída a 12,5%, com falha na inflação da bexiga natatória.

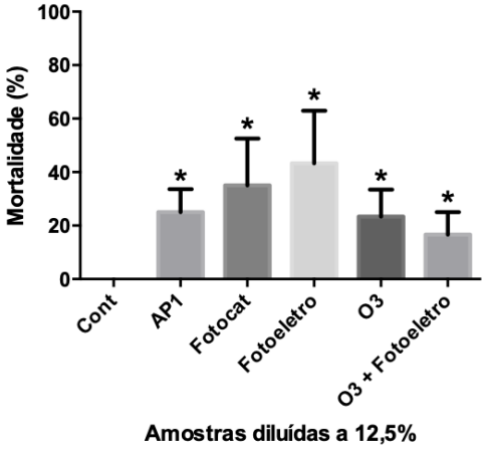
(hpf) = horas pós fertilização
Fonte: Autora.

A Tabela 8 mostra uma comparação entre a toxicidade da amostra bruta (AP1) e após seus diferentes tratamentos. Nossos resultados mostram que todas as amostras diluídas a 25%, tanto bruta quando após os diferentes tratamentos, induziram a morte de todos os organismos expostos. Assim como Carlsson et al. (2014), em seu estudo com AP bruta de plataformas de produção de óleo e gás/condensado do Mar do Norte da Noruega, também observaram toxicidade aguda relevante nas amostras pouco diluídas. Os autores avaliaram a embriotoxicidade induzida pelas frações solúveis em água e de partículas/óleo dos efluentes de AP de várias plataformas da região, detectando efeitos como alterações no movimento, pigmentação, frequência cardíaca, tempo de eclosão, além de malformações embrionárias em zebrafish (CARLSSON et al.,2014).

As amostras tratadas pelos diferentes POAs nas maiores diluições (2,5%, 5% e 7,5%) não induziram a toxicidade aguda relevante. Alguns organismos desenvolveram efeitos letais e subletais após a exposição às amostras mais diluídas, porém não foram significativos em relação ao controle. Assim, para comparar a eficiência dos tratamentos, utilizamos a diluição de 12,5%.

Considerando as amostras diluídas a 12,5%, observamos que nenhum dos tratamentos reduziu de forma significativa ($p \leq 0,05$) a mortalidade dos organismos quando comparados a AP1 (Figura 39), mostrando que mesmo após os tratamentos, ainda existem compostos em concentrações capazes de levar à letalidade a uma parcela dos organismos expostos.

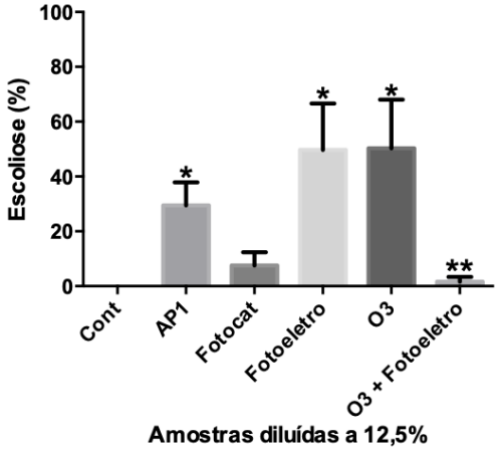
Figura 39 – Mortalidade observada após a exposição de embriões de zebrafish à amoastras tratadas por processos oxidativos avançados (POAs) em relação a amostra bruta, em diluições de 12,5%.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo ($p \leq 0,05$); Cont = controle negativo; AP1 = água produzida 1; Fotocat = fotocatálise; Fotoeletro = foteletrocatálise; O3 = ozonização; O3 + Fotoeletro = ozonização fotoeletrocatalítica.
Fonte: Autora.

Todas as amostras diluídas a 12,5% induziram efeitos subletais com intensidade menor ou maior quando comparadas à AP1. Com relação as deformidades esqueléticas, observamos que o tratamento combinado de fotoeletrocatálise e ozonização foi o mais eficaz na redução da indução à escoliose em comparação com a AP1, com redução de mais de 90% nos casos de escoliose. Entretanto, os demais tratamentos não interferiram neste efeito (Figura 40).

Figura 40 – Taxa de deformidades esqueléticas (escoliose) detectadas nos organismos expostos (*Danio rerio*) em relação aos tratamentos por processos oxidativos avançados (POAs) e a amostra de água produzida 1 sem tratamento, em diluições de 12,5%.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); (**) = diferença significativa entre amostra bruta (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP1 = água produzida 1; Fotocat = fotocatálise; Fotoeletro = foteletrocatálise; O3 = ozonização; O3 + Fotoeletro = ozonização fotoeletrocatalítica. Fonte: Autora.

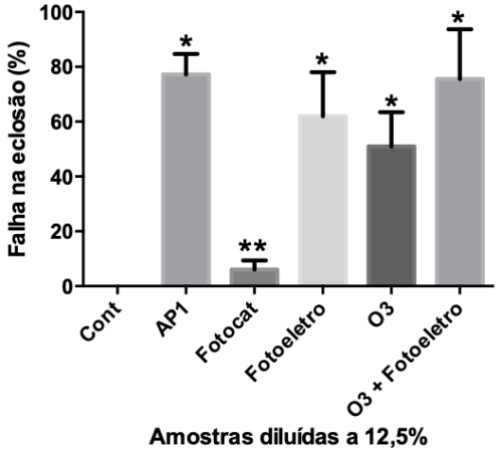
O esqueleto axial, também conhecido como coluna vertebral, é a príncipal estrutura óssea dos peixes, portanto desempenha papel fundamental para o desenvolvimento saúdavel do organismo (LEPREVOST; SIRE, 2014). Essa estrutura é dividida dorsalmente e vertebralemnte em espinhas neurais e hemais (MOREIRA et al, 2001). As deformidades esqueléticas em teleósteos podem ocorrer devido a diversos fatores, tais como genética dos animais e alimentação e a qualidade da água (LEPREVOST; SIRE, 2014), como obsevado neste trabalho, tendo impacto na sobrevivência do organismo assim como na captura de presas e fuga de predadores.

Várias deformidades esqueléticas em embriões de zebrafish também foram detectadas no trabalho realizado por Zhou et al., (2009). Os autores estudaram o inseticida Cartap [S,S′-(2-dimetilamino trimetilen) bis (thiocarbamate)] e observaram notocorda ondulada, tronco em curva, defeito de somito e menor eixo do tronco, além de outros efeitos como saco vitelínico maior do que o normal e menor pigmentação de melanina em comparação com os controles. Outras amostras ambientais contaminandas também induzem a alterações esqueléticas em embriões de zebrafish, tais como o toxafeno (pesticida) (PEREZ-RODRIGUEZ et al.,2020); ésteres prioritários de ácido ftálico (PU et al., 2020); cádmio (Cd) (KIM et al., 2018);fungicidas comerciais de

benzamida (ZHANG et al., 2020), Dieldrin (pesticida lipofílico) (SARTY; COWIE; MARTYNIUK, 2017) e; varfarina (medicamento anticoagulante e rodenticida) (GRANADEIRO et al., 2019).

De acordo com Nagel (2002), os ovos de zebrafish devem eclodir em até 96hpf. Como podemos observar na Tabela 8, a AP1 e após os diferentes tratamentos induziram a falha na eclosão dos organismos no período de 96 hpf. No entanto, o tratamento por fotocatálise foi capaz de reduzir em 90% este efeito, na diluição de 12,5%, como pode ser observado na Figura 41. Os demais tratamentos (12,5%), embora não tenham reduzido a falha de eclosão, não ocasionaram efeitos nas menores diluições, como o ocorrido na AP1, o que demonstra uma redução desse efeito, ainda que não tão pronunciada.

Figura 41 – Taxa de falha de eclosão nos organismos expostos (*Danio rerio*) em relação aos tratamentos por processos oxidativos avançados (POAs) e a amostra de água produzida 1 sem tratamento, em diluições de 12,5%.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); (**) = diferença significativa entre amostra bruta (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP1 = água produzida 1; Fotocat = fotocatálise; Fotoeletro = foteletrocatálise; O3 = ozonização; O3 + Fotoeletro = ozonização fotoeletrocatalítica
Fonte: Autora.

Além do trabalho de Carlsson et al. (2014) que avaliou a AP bruta em embriões de zebrafish, outros trabalhos também relatam a eclosão tardia em peixes expostos a sedimentos e efluentes industrias, contendo compostos químicos como praguicidas, alquilfenóis e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (GORMLEY, TEATHER, 2003; HALLARE et al., 2005; HORNG, COLS. 2010; NAKAYAMA et al., 2005; PANTER et al., 2006; TODD, VAN LEEUWEN, 2002; ZHA, WANG, 2006). O modo de ação para o atraso e/ou falha na eclosão é raramente relatado, porém Carls e Thedinga (2010) sugerem que

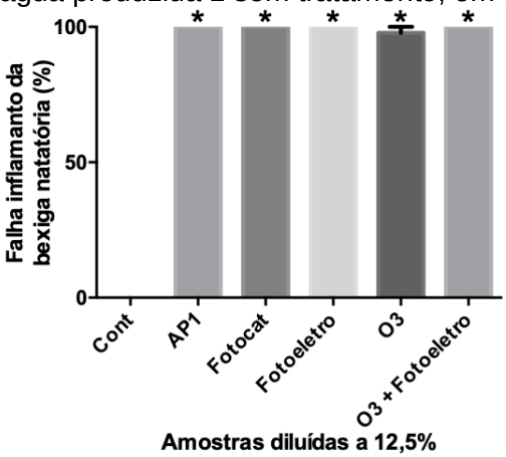
esse efeito ocorra devido a um atraso no desenvolvimento embrionário, o que leva a um tempo de eclosão maior do que ocorreria naturalmente. O movimento espontâneo é o primeiro movimento ocorrido durante o crescimento do embrião de zebrafish, origina-se da medula espinhal e é desencadeado pelo desenvolvimento de motoneurônios que estimulam os músculos (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998; BRUSTEIN et al., 2003). Como o movimento nunca param por completamente a eclosão é considerada como uma causa eventual (KIMMEL et al., 1974). Portanto, a diminuição de movimentação espontânea é a principal causa do atraso ou falha da eclosão (XIA; ZHENG; ZHOU, 2017). O movimento espontâneo e a locomoção do embrião de zebrafish são reflexos de sua atividade neuronal. A diminuição da movimentação espontânea já foi relatada anteriormente, sugerindo algum tipo de neurotoxicidade (WANG et al., 2013; LU et al., 2014; IRONS et al., 2013; CHEN et al., 2012). A falha na eclosão tem como consequência a morte, pois o organismo não teria alimento suficiente dentro do córion para manter a vida, necessitando da busca ativa pelo alimento que estaria impedida pela não eclosão. Neste trabalho, observamos a morte de um organismo ao final de 144 hpf.

O zebrafish é considerado um peixe predador, potanto sua alimentação requer boa natação ativa para detecção de presas e coordenação corporal para caçar rotíferos. Durante o primeiro dia de desenvolvimento (24 hpf), o movimento do corpo do embrião já é evidente, devido às frequentes contrações ocorridas dentro do córion, porém o nado livre só ocorre após as 144 hpf, com a inflação da bexiga natatória. Antes desse período o zebrafish passa a maior parte do tempo inativo, deitado de lado. Ou seja, a flutuabilidade na água propiciada pela bexiga natatória só é atingida após a sua inflação que deve ocorrer entre 96 a 144 hpf (STRAHALE et al., 2012). Assim, a bexiga natatória somente foi avaliada após 144 hpf.

A falha na inflação da bexiga natatória, foi observada mesmo após todos os tratamentos (Figura 42). Nenhum dos tratamentos apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparada a AP1. Entretanto, a falha na inflação da bexiga natatória na AP1 já foi detectada na diluição de 7,5% (Tabela 8), o que não foi obervado no tratamento nos tratamentos de fotocatálise, ozonização e o tratamento combiando de ozonização e fotoeletrocatálise. O mesmo ocorreu no trabalho publicado por Li et al. (2011), que constatou a falha na inflação da

bexiga natatória em embriões de zebrafish expostos ao retardante de chamas heterocíclico bromado tris (2, 3-dibromopropil) isocianurato.

Figura 42 – Comparação da falha na inflação da bexiga natatória nas larvas de Zebrafish expostos) em relação aos tratamentos por processos oxidativos avançados (POAs) e a amostra de água produzida 1 sem tratamento, em diluições de 12,5%.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; Fotocat = fotocatálise; Fotoeletro = foteletrocatálise; O3 = ozonização; O3 + Fotoeletro = ozonização fotoeletrocatalítica.
Fonte: Autora.

O fato de ter ocorrido a falha na inflação na bexiga natatória tanto na amostra AP1 como após os tratamentos pode interferir na sobrevivência do organismo, pois afetaria negativamente seu potencial de natação e predação, tornando desta forma o peixe mais suscetível a predação, bem como inapto a obter seu próprio alimento, comprometendo desta forma sua funcionalidade.

Após a realização do teste FET foi calculado os valores de CL_{50} e CE_{50} para os efeitos ocorridos nos embriões de zebrafish, conforme Tabela 9. Como pode ser verificado, os valores de CL_{50} não diferiram muito em relação à amostra bruta e após os tratamentos, variando entre 13,54% a 15,72%. Estes dados somados aos outros valores de CE_{50} mostram que os tratamentos por processos oxidativos avançados não surtiram efeito em relação a espécie *Danio rerio.*

Tabela 9 – Valores correspondentes a CL_{50} e CE_{50} para os efeitos induzidos em embriões de zebrafish expostos às amostras de água produzida (AP) bruta e após os tratamentos por processos oxidativos avançados.

Amostra	**PARÂMETRO AVALIADO**		
	(CL_{50}) Mortalidade	(CE_{50}) Não inflamento da bexiga natatória	(CE_{50}) Falha Eclosão
AP1	14,95% (13,92 - 16,06)	10,37% (19,61 – 10.96)	11,59 % (10,23-13,12)
Fotocatálise	14,32% (13,29 - 15,42)	11,11% (*)	-
Fotoeletrocatálise	13,54% (12,48 - 14,68)	11,67% (10,42 – 13,08)	-
O_3	14,76% (13,70 – 15,09)	10,46% (9,92 – 11,03)	-
O_3 + Fotoeletrocatálise	15,72% (14,77 – 16,74)	10,19% (*)	11,48% (*)

Fonte: Autora.

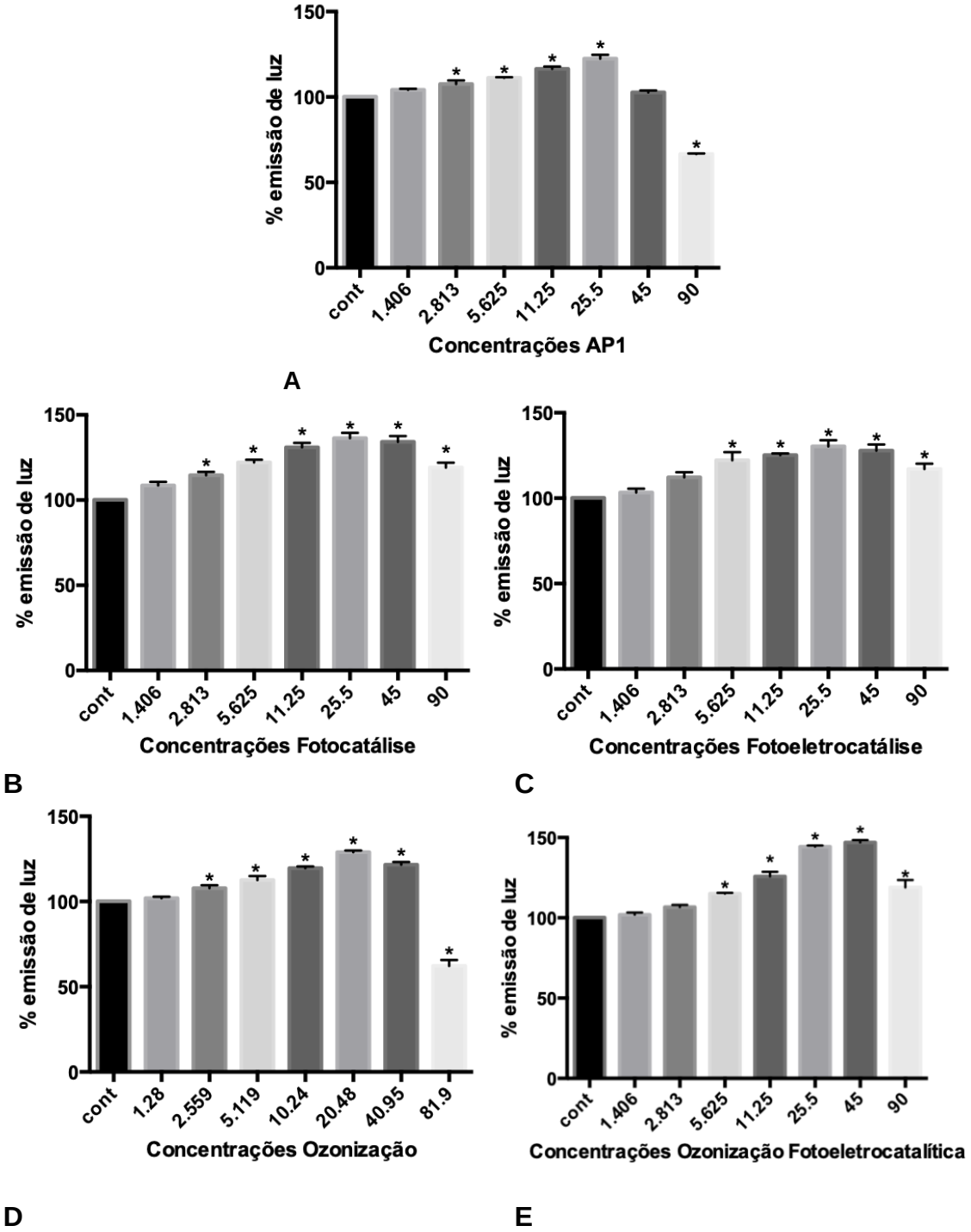
Os dados relativos à toxicidade induzida em Zebrafish pela amostra de AP1 antes e após tratamento foram publicados no periódico abaixo:

BRITO, J.F.; BESSEGATO, G.G.; SOUZA, P.R.F.T.; **VIANA, T.S.;** OLIVEIRA, D.P.; MARTÍNEZ-HUITLE, C.A.; ZANONI, M.V.B.Combination of Photoelectrocatalysis and Ozonation as a Good Strategy for Organics Oxidation and Decreased Toxicity in Oil-ProducedWater. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 166, p. H3231-H3238, 2019.

4.2.3 *Vibrio Fischeri*

O teste de toxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri* mostrou uma redução da toxicidade nos tratamentos por fotocatálise, fotoeletrocatálise e ozonização fotoeletrocatalíca (Figura 43B, C, E) quando comparado a amostra AP1 (Figura 43A) que foi tóxica à bactéria. Entretanto, o tratamento apenas por ozonização não reduziu o efeito (Figura 43D), mantendo a toxicidade da amostra.

Figura 43 – Inibição de luminescência observada nas bactérias *Vibrio fischeri* expostas a diferentes concentrações da (A) água produzida 1 (AP1) e após o tratamento por: (B) fotocatálise; (C) fotoeletrocatálise; (D) ozonização; e (E) ozonização fotoeletrocatalítica.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo;.
Fonte: Autora.

Como pode ser observado na Figura 43, parece ter ocorrido uma resposta estimulatória compensatória ao estresse relacionado à exposição da bactéria *Vibrio fischeri* aos tratamentos e a AP1, e não uma resposta benéfica ao

organismo nas amostras mais diluidas. Essa resposta não é observada com o aumento da dose (amostras mais concentradas).

4.2.4 *Daphnia smilis*

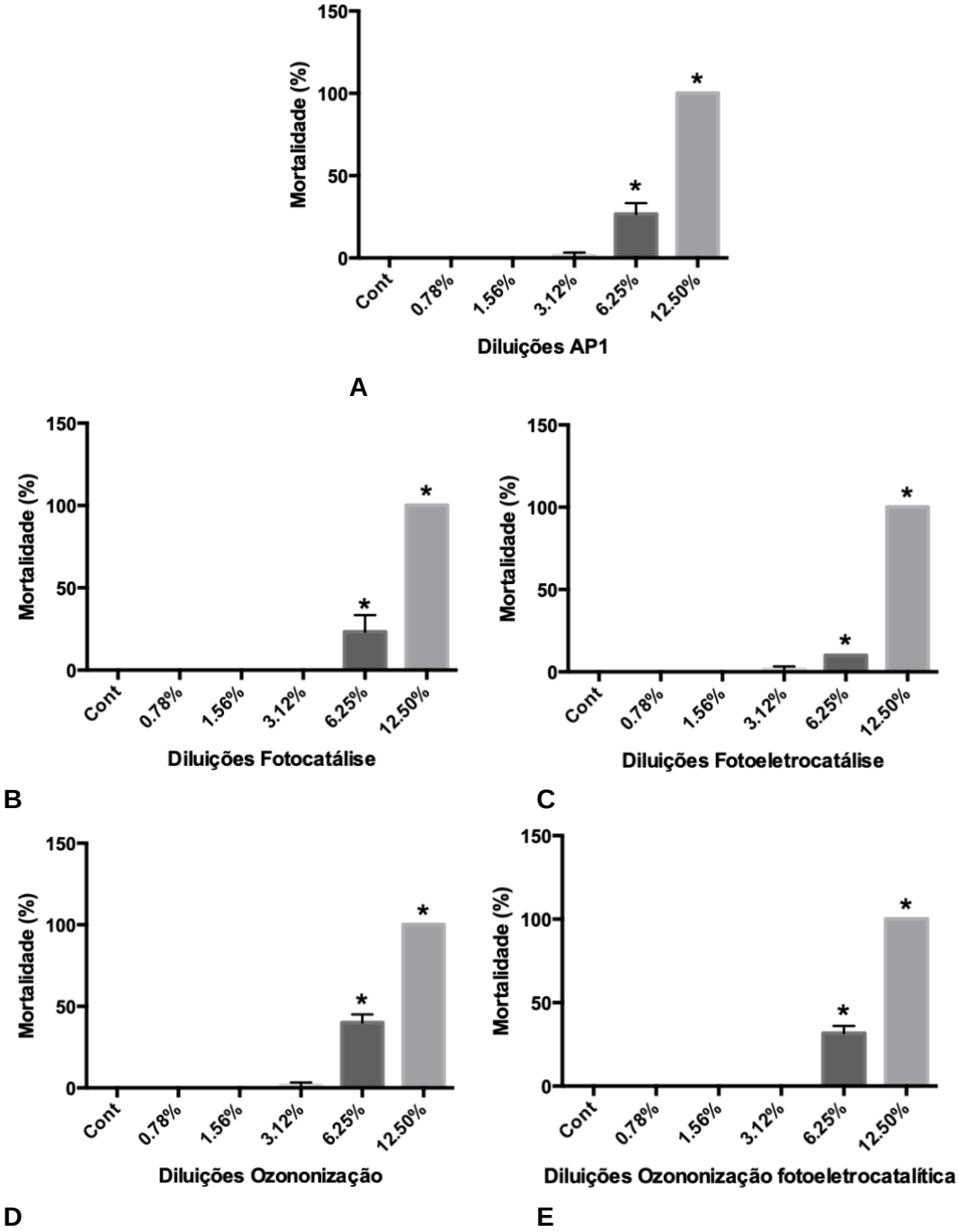
O teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foi realizado com a amostra AP1 bruta e após todos os tratamentos (fotocatálise, fotoeletrocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítica), além do controle negativo nas diluições de 0,781%, 1,562%, 3,125%, 6,25% e 12,5%. A Tabela 10 mostra a mortalidade dos organismos após exposição a diferentes diluições testadas. Apenas as duas menores diluições (6,25% e 12,5%) apresentaram toxicidade relevante em comparação ao controle negativo nos tratamentos de fotocatálise, ozonização e ozonização fotoeletrocatalítca, como pode ser observado na Figura 44B, D e E, enquanto o tratamento de fotoeletrocatálise (Figura 44C) ainda apresentou toxicidade, mas apenas na diluição de 12,5%. Esses resultados revelam redução da toxicidade da amostra de AP1 (que foi tóxica nas diluições de 6,25% e 12,5%, Figura 44A) após o tratamento de fotoeletrocatálise.

Tabela 10 – Número total de neonatos (*Daphnia similis*) imóveis após exposição a diferentes diluições da amostra de água produzida de petróleo com e sem tratramentos

Diluição	**Número total de organismos imóveis**				
	AP1	Fotocat	Fotoeletro	O_3	O_3 + Fotoel
Controle	0	0	0	0	0
0,78%	0	0	0	1	0
1,562%	0	0	0	1	0
3,125%	1	0	1	1	0
6,25%	16	14	16	24	19
12,5%	60	60	60	60	60

Fonte: Autora.

Figura 44 – Gráfico de comparação da porcentagem de mortalidade da *Daphnia similis* em relação ao controle negativo. (A) Água produzida AP1 sem tratamento. (B) AP1 tratada por fotocatálise. (C) AP1 tratada por fotoeletrocatálise. (D) AP1 tratada por ozonização. (E) AP1 tratada por ozonização fotoeletrocatalítica



(*) = diferença significativa entre o controle negativo ($p \leq 0,05$); Cont = controle negativo; AP1 = água produzida 1.
Fonte: Autora.

Como pode ser observado na Tabela 11 o tratamento de fotoeletrocatálise possui maior valor de CL_{50} quando comparado aos outros tratamentos, o que mostra uma clara redução da toxicidade da AP1 após essa forma de tratamento.

Tabela 11 – Valores correspondentes a CL_{50} induzidos em *Daphnia similis* no teste de toxicidade aguda.

	AP1	**Fotocatálise**	**Fotoeletrocatálise**	**O_3**	**O_3+ Fotoeletrocatalise**
CL_{50}	7,286	7,558	8,34	6,625	7,105
intervalo de confiança	(8,45 - 6,35)	(8,47 - 6,74)	(9,08 – 7,66)	(8,75 - 6,33)	(8,19 - 6,16)

CL_{50} = Concentração letal média; O_3 = ozonizção; AP1 = água de petróleo 1
Fonte: Autora.

Os estágios iniciais da vida de organismos aquáticos tem mecanismos reduzidos para a proteção a substâncias tóxicas, neonatos de daphanias como usados em nesse estudo, possuem níveis mais baixos de transcrição de genes de reparos de DNA, portanto são mais suscetíveis que os adultos a substâncias, como por exemplo aquelas que são genotóxicas (DAVID et al., 2011; BLEWETT et al., 2017a). A mortalidade aguda de organismos expostos a amostras de água produzida de petróleo é geralmente atribuída à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (NEFF et al., 2000; DÓREA et al., 2007; FAKHRU'L-RAZI et al., 2009; ALSALKA KARABET; HASHEM, 2011; NEFF et al., 2011; BUTKOVSKYI et al., 2017; SCHMEICHEL, 2017; HE et al., 2017; JIMÉNEZ et al., 2018). Um dos mecanismos que levam a morte em decorrência da exposição aos sais e HAP é a geração de estresse oxidativo, em decorrência da geração de espécies reativas de oxigênio, que interferem nos sistemas de defesa antioxidante em organismos aquáticos (FELDMANNOVA et al., 2006, BLEWETT; WOOD, 2015). O aumento de radicais livres somados a um sistema de defesa sensibilizado exacerba o estresse oxidativo (BLEWETT et al., 2017a). Além disso os HAPs diminuem níveis de glutationa, biomolécula essencial na redução de estresse oxidativo em daphnias (FELDMANNOVA et al., 2006).

Blewett et al., 2018 observou imobilidade de *Daphnia magna* expostas a concentrações inferiores a concentração letal mediana em testes com água produzida por fraturamento hidráulico (APFH). A imobilidade dos organismos expostos é um indicador ecológico sensível de efeitos ambientais adversos associados a exposição a misturas complexas como APFH ou AP, decorrente principalmente de surfactantes à base de água, que diminuem a tensão superficial da água, e de hidrocarbonetos flutuantes que aderem aos organismos e rompem a superfície da água e impedem sua re-submersão. Este efeito de

imobilidade, assim como o observado em nosso estudo, impacta diretamente na sobrevivência dos organismos, pois os organismos ficam impossibilitados de retornar a coluna de água, o que prejudica sua alimentação e a capacidade de troca de carapaça, o que impede a sua reprodução. Segundo Delompré et al. (2019) a exposição a APFH interfere também no comportamento fotocatalítico de *D. magna*, levando a um aumento dose dependente na velocidade de aparecimento de dafídeos na zona iluminada, ou seja, uma resposta rápida à fototaxia positiva. Efeito esse que pode influenciar nos processos de predação e alimentação da espécie.

4.3 Amostra de água produzida de petróleo n. 2 (AP2)

4.3.1 Tratamento com Vermiculita magnetizada

A salinidade da AP2 foi de 5 g/l enquanto após o tratamento com VMT-mag o valor foi de 6 g/l. Como já citado anteriormente, a saliniade após a diluição das amostras não é suficiente para promover toxicidade adicional aos organismos.

Conforme já citado, o tratamento com vermiculita, bem como as análises químicas referente à composição da amostra de AP2 foram realizadas pelo Instituto de Química de Araraquara, em parceria com o grupo da profa. Maria Valnice Boldrin Zanoni. Os dados relativos à composição da amostra antes e após o tratametno, bem como os dados de toxicidade com *Daphnia similis* que serão apresentados a seguir, foram publicados no artigo:

BARTILOTTI, M.; **VIANA, T.S.;** OLIVEIRA, D.P.; SANTOS, E.V.; ROJAS-MANTILLA, H.D.; SANTOS, M.C.; ZANONI, M.V.B. Assessment of the improved performance of magnetite-modified vermiculite in the reduction of BTEX and metals, as well as toxicity in petroleum-produced water. *Journal of Water Process EngineeringI,* v. 39, 2021.

A amostra AP2 foi analisada por Cromatografia à gás, acoplada à espectrometria de massas (BARTILOTTI et al., 2021) e, os compostos identificados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Lista das substâncias encontradas na água produzida 2 (AP2) por Cromatografia à gás, acoplada à espectrometria de massas.

Tempo de retenção (min)	Massa Molecular (Da)	Nome IUPAC e estrutura Química
2,75	78	Benzeno
3,73	118	1,1-Dietóxietano
4,15	92	Metilbenzeno (Tolueno)
5,13	102	2-Metil-tiolano
5,25	106	Etilbenzeno
5,30	106	1,3-Dimetilbenzeno (m-Xileno) 1,4-Dimetilbenzeno (p-Xileno)
5,47 e 5,50	116	(2R,5R)-2,5-Dimetil-tiolano (2R,5S)-2,5-Dimetil-tiolano
5,56	106	1,2-Dimetilbenzeno (o-Xileno)

Fonte: Adaptado de Bartilotti et al. (2021).

Após o tratamento, foi observada diminuição da área dos picos referente ao Benzeno (60%), Tolueno (10%), Etilbenzeno (85%) e Xilenos, indicando que o tratamento com VMT-mag apresenta bom desempenho para remoção de compostos do grupo BTEX presentes em AP (BARTILOTTI et al., 2021).

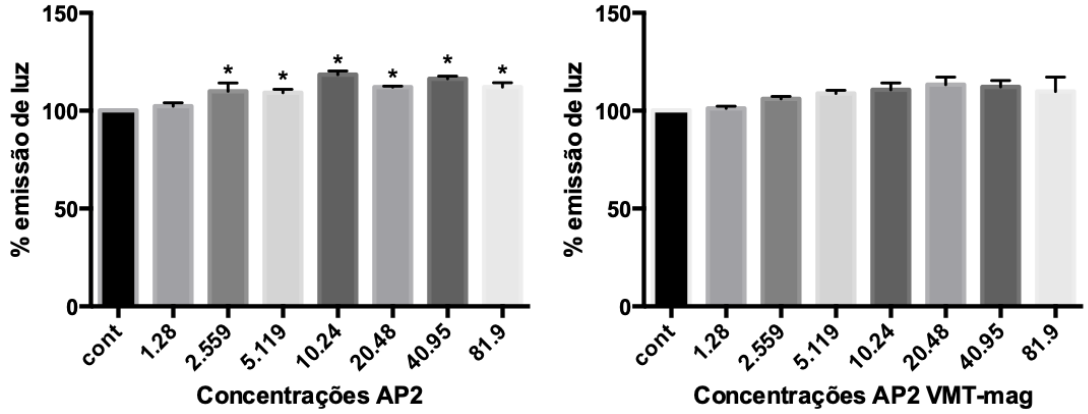
A presença de metais também foi detectada como Ba, Al, Ag, Hg, Pb e Cu AP (BARTILOTTI et al., 2021). Esses metais foram parcialmente removidos da AP2, exceto cobre que apresentou concentração levemente aumentada no sobrenadante após o tratamento da concentração inicial.

Nanopartículas de magnetita não forneceram muita influência na capacidade de remoção da vermiculita, mas a vermiculita magnetizada contribuiu para remover principalmente matéria orgânica genérica e metais em geral da água produzida pelo petróleo. O tratamento proposto também oferece uma fácil recuperação do mineral, promovendo-o como uma alternativa e aplicável sorvente de aromáticos e metais para tratamento de efluentes em plataformas offshore (BARTILOTTI et al., 2021).

4.3.2 *Vibrio fischeri* (Microtox)

A amostra AP2 e após tratamento com VMT-mag foi avaliada pelo método de Microtox e não apresentou toxidade à bactéria *Vibrio fischeri* (Figura 45). A amostra bruta apresentou discreto aumento na emissão de luminescência, da mesma forma como observado com a amostra AP1 bruta. Já a amostra tratada por vermiculita não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle negativo.

Figura 45 – Inibição de luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* exposta a diferentes concentrações. A) água produzida 2 (AP2) sem tratamento. B) AP2 tratada com a vermiculita magnetizada (VMT-mag).



A **B**

Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética; (*) = estatisticamente difrente do controle negativo ($p \leq 0,05$).
Fonte: Autora

Além dos nossos dados referente à toxicidade da AP1 para *Vibrio fisheri* apresentados anteriormente neste documento e publicado em Brito et al., (2019), diversos autores já relataram a toxicidade da AP para este mesmo modelo. Ajuzieogu et al. (2018) avaliaram amostras de AP tratadas (submetidas a filtração, centrifugação, decloração ou ajuste de pH) e não tratadas coletadas de

uma instalação *offshore* de produção operacional situada na cidade de Warri, Estado Delta, Nigéria em *Vibrio fischeri*. A AP não tratada apresentou um valor de CE_{50} de 15 min de 1,0%, sugerindo enquadramento na categoria de "extremamente tóxica", enquanto que para a AP tratada o valor de CE_{50} de 15 min de 23,27% sendo sugerida classificação como "muito tóxica". Alzahrani et al. (2013) estudaram AP coletada de uma refinaria de propriedade da Malásia Oil and Gas Company, demonstrando que a amostra bruta apresentou toxicidade para a bactéria, com CE_{50} de 15 min de 14,27%. Já a amostra submetida a filtração em membrana NF 13,65% (CE_{50}), em membrana mostrou-se livre de toxicidade, em que a concentração efetiva de 100% (CE_{50}) não causou efeitos quando exposto a *V. fischeri*. Corrêa et al., (2010) estudaram outra amostra de AP bruta, que apresentou toxicidade elevada para a bactéria *Vibrio fischeri* (tempo de exposição de 30min) e para o peixe *Poecilia vivípara* com CE_{50} < 1,55% para ambas as espécies, enquanto que após tratamento da amostra por 60 minutos por oxidação fotocatalítica por ozônio, foi observada menor toxicidade aguda para a bactéria (CE_{50} 30,3%), mas para o peixe a toxicidade permaneceu alta (CL_{50} 1,9%). Ainda, a AP tratada foi submetida ao biotratamento com a microalga *Uva spp.* Tendo sido observada redução significativa de toxicidade, com CE_{50} de 89,2% e 85,7% para a espécie de bactéria e peixe, respectivamente. Manfra et al., (2007) avaliaram AP de formação e sedimento superficial coletado em torno de uma plataforma de gás (Fratello Cluster), localizada no Mar Adriático (Pescara, Itália). Os autores detectaram baixo nível de toxicidade no sedimento e alta toxicidade para a água de petróleo mesmo após o tratamento (filtração por membrana). A alta toxicidade aguda (CE_{50} 5,54 – 8,91%) foi detectada em todos os tempos de exposição (5, 15, 30 min) da bactéria à AP filtrada e não filtrada não existindo diferenças significativas entre elas. Em 2010, Manfra e colaboradores estudaram outra amostra de AP de formação coletada de 3 diferentes plataformas (offshore) há aproximadamente 20 km da costa Adriática (Pescara e Rimini, Itália). As amostras de água de petróleo foram filtradas em membrana para serem utilizadas nos bioensaios. Os autores relataram diferença de sensibilidade entre as espécies, sendo que *Tigriopus fulvus* (crustáceo) e *Dicentrarchus labrax* (peixe) apresentaram a maior toxicidade (CE_{50} <50%), seguida por *Vibrio fischeri* (CE_{20} < 30%), enquanto que *Artemia franciscana* (crustáceo) e as duas algas

(*Phaeodactylum tricornutum* e *Dunaliella tertiolecta*) não apresentaram efeito tóxico significativo (CE_{20} > 50%).

Porém, não foi observada toxicidade para nossa amostra AP2, provavelmente devido a diferenças entre os constituintes das amostras.

4.3.3 *Daphnia similis*

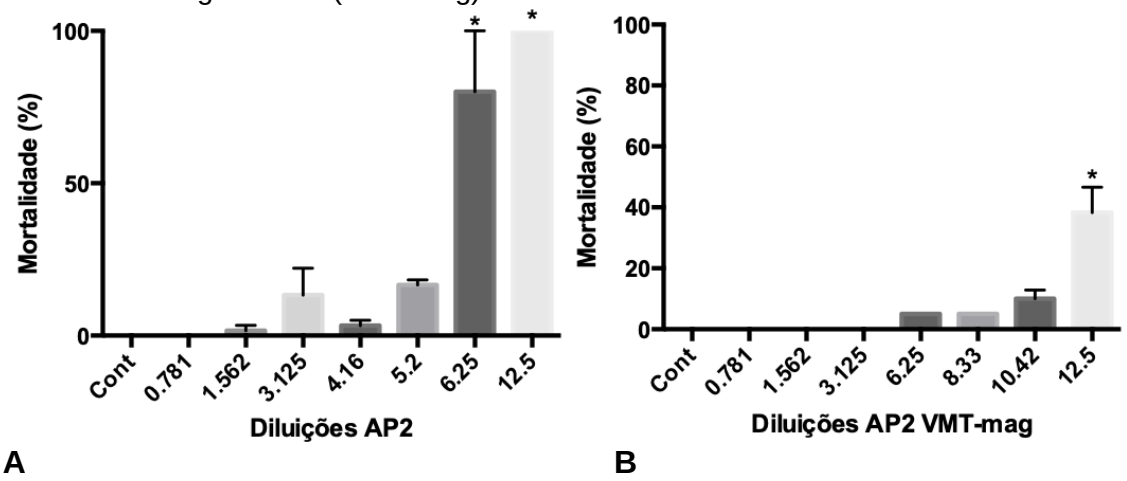
Nossos resultados mostram que a AP2 induziu a imobilidade em 16 dos 20 organismos expostos (média de três experimentos independentes) em diluições tão baixas quanto 6,25% (Tabela 13). Na menor diluição testada, 12,5%, observamos o mesmo efeito em todos os organismos expostos. No entanto, após o tratamento (AP2 VMT-mag), foi observada imobilidade significativa em relação ao controle negativo apenas na maior concentração testada de 12,5% (v / v) (Figura 46). Considerando que a CL_{50} calculada antes do tratamento foi de 5,78 (± 0,52%), podemos afirmar que o tratamento com VMT-mag reduziu drasticamente a toxicidade para *Daphnia similis*, tendo apresentado um CL_{50} 2,3 vezes (13,3 ± 0,70%) maior.

Tabela 13 – Número total de neonataos (*Daphnia similis*) imóveis por réplica (triplicata) após exposição a amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

Número total de neonatos (*Daphnia similis*) imóveis								
Réplica	**Cont**	**Diluições AP2**						
		0,78%	1,56%	3,12%	4,16%	5,2%	6,25%	12,5%
1	0	0	0	0	1	3	20	20
2	0	0	0	2	0	4	8	20
3	0	0	1	6	1	3	20	20
Réplica	**Cont**	**Diluições AP2 VMT-mag**						
		0,78%	1,56%	3,25%	6,25%	8,33%	10,42%	12,5%
1	0	0	0	0	1	1	1	6
2	0	0	0	0	1	1	2	6
3	0	0	0	0	1	1	3	11

Fonte: Autora.

Figura 46 – Porcentagem de imobilidade em *Daphnia similis* em relação ao controle negativo. A) Água produzida de petóleo (AP2) sem tratamento. B) AP2 tratada com Vermiculita magnetizada (VMT-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

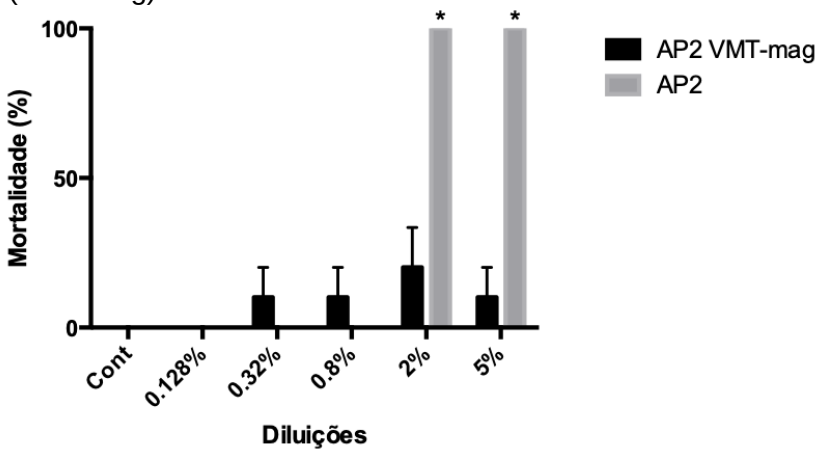
Os microcrustáceos do zooplâncton estão entre os grupos mais sensíveis aos estressores ambientais (GUTIERREZ; PAGGI; GAGNETEN, 2012). O genero Daphnia é constituido de organismos filtradores encontrados em ambientes aquáticos e ocupam uma posição importante na cadeia alimentar, pois são uma das principais fontes de alimento para peixes e invertebrados predadores. Além disso, tem um papel importante no controle populacional de algas, o que pode interferir na qualidade dos corpos d'água (TATARAZAKO; ODA, 2007). Portanto, desempenham papel importante no ecossistema e sua redução em um ambiente impactado por AP afetaria não somente a população do organismo, mas também a de outros níveis organizacionais.

4.3.4 *Daphnia magna* (clone BEAK)

Nossos dados demonstram que a AP2 com e sem tratamento apresentam efeitos nocivos em relação à sobreviviencia (Figura 47), à reprodução de *Daphnia magna* reduzindo o número de neonatos (Figura 48) e, consequentemente, a taxa intrínseca de crescimento populacional (r) (Figura 49), em comparação com o controle negativo (p≤0,05) (Tabela 14), de forma dose dependente. Efeitos sobre a reprodução em *daphnias* já foram relatados em outros estudos, com redução no número de neonatos assim como na taxa

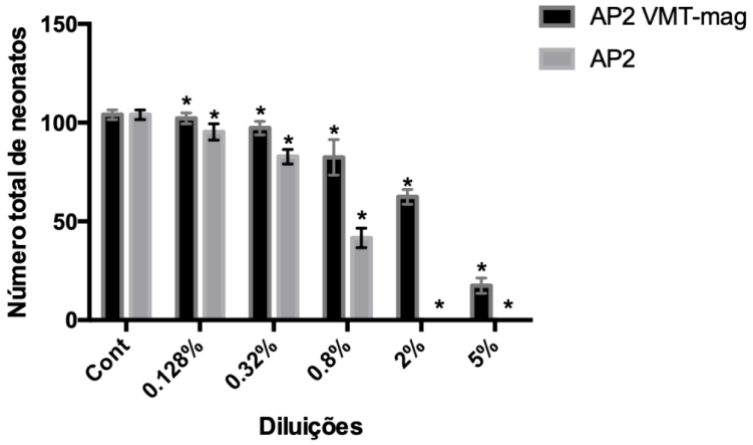
intrínseca de crescimento populacional após a exposição a corantes (ABE, 2019) e praguicidas (PESTANA, 2010).

Figura 47 – Mortalidade (%) de *Daphnia magna* ao final de 21 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



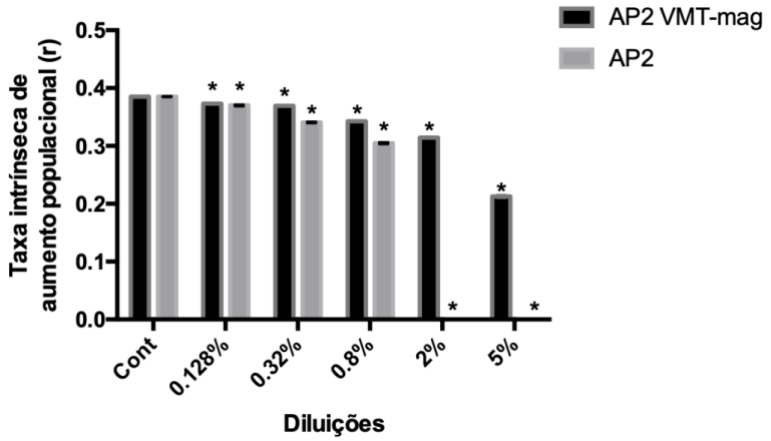
(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Figura 48 – Número total de neonatos reproduzidos ao final de 21 dias de exposição da *Daphnia magna* às amostras de AP com e sem tratamento.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Figura 49 – Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) do número de neonatos reproduzidos ao final de 21 dias de exposição da *Daphnia magna* às amostras de AP2 com e sem tratamento.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Após a exposição por 21 dias, houve também redução da capacidade reprodutiva das fêmeas (Tabela 14), pois o número total de neonatos nascidos foi reduzindo também de forma dose-dependente (Figura 48). A amostra sem tratamento apresentou maior toxicidade quando comparada à tratada, pois a redução no número de neonatos iniciou na diluição de 0,32% e 0,8% e não ocorreu nascimentos nas diluições de 2 e 5%, pois as fêmeas morreram antes do prazo final de 21 dias para encerramento do teste. Mesmo após o tratamento da AP2 com VMT-mag houve reduções significativas deste dado também nas menores diluições de 0,8%, 2% e 5%, o que caracteriza ainda toxicidade da amostra, mesmo que de forma reduzida quando comparada ao controle negativo.

Tabela 14 – Número total de nenotos (*Daphnia magna*) por réplica das diferentes diluições testadas para água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) ao longo de 21 dias.

Número total de neonatos (*Daphnia magna*) em 21 dias						
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2**				
		0,125%	0,32%	0,8%	2%	5%
0	105	83	84	53	0	0
1	108	119	93	44	0	0
2	97	89	100	27	0	0
3	106	96	69	58	0	0
4	114	94	72	35	0	0
5	95	97	90	55	0	0
6	99	99	65	59	0	0
7	111	93	76	31	0	0
8	112	111	87	43	0	0
9	93	72	92	11	0	0
10	105	83	84	53	0	0
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2 VMT-mag**				
		0,125%	0,32%	0,8%	2%	5%
0	105	91	97	102	67	31
1	108	95	86	94	65	21
2	97	115	82	92	48	21
3	106	104	106	93	42	22
4	114	108	107	82	61	11
5	95	97	111	6	85	29
6	99	105	110	85	63	32
7	111	112	86	107	56	7
8	112	89	98	74	69	0
9	93	106	90	89	68	0
10	105	91	97	102	67	31

Fonte: Autora

A redução da capacidade reprodutiva das daphnias já foi relatada por outros autores (YUAN et al., 2018; LIU et al., 2019; JAIKUMAR et al., 2019), estando este parâmetro diretamente ligado ao nível populacional desses microcrustáceos e no controle populacional de algas, como dito anteriormente. Portanto, representa um impacto direto a nível populacional e ecossitêmico. Feldmannova et al. (2006) avaliaram a toxicidade dos hidrocarbonetos N-heterocíclicos policíclicos aromáticos (N-PAHs) em invertebrados aquáticos (*Daphnia magna*) e relataram todos os N-PAHs testados suprimiram a reprodução dos organismos, sugerindo que os N-PAHs podem induzir estresse oxidativo em *D. magna*.

A toxicidade de compostos químicos orgânicos, incluindo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) tem preocupado devido à capacidade de indução de efeitos adversos em organismos, dentre eles a ocorrência de

anormalidades reprodutivas. Como no estudo realizado por Khaled, Ferjani e Sirotkin (2017), que investigaram a exposição crônica a BTEX a 25 µg L^{-1} nos ovários da sanguessuga de água doce *Erpobdella johanssoni* em nível citológico e molecular. Segundo os autores com base na microscopia de luz e eletrônica de transmissão, as células somáticas e oócitos vitelogênicos dos animais tratados sofreram alterações degenerativas, como vacuolização citoplasmática, alterações mitocondriais e condensação nuclear de DNA, em comparação com organismos controle. Além disso, o teste do cometa apoiou os resultados histológicos e ultraestruturais, mostrando que a exposição ao BTEX induziu significativamente mais fragmentação de DNA nas células do ovário de sanguessugas tratadas do que nos controles ($p < 0,0001$). A deterioração induzida por BTEX em células ovarianas sugere a genotoxicidade de BTEX na oogênese em sanguessugas, o que pode prejudicar sua reprodução. Os BTEX são agentes tóxicos ambientais que exercem sua toxicidade por meio da interrupção celular através da indução de apoptose e genotoxicidade (FAN et al. 2009; ZHANG et al. 2010; AYAN et al. 2013; LI et al. 2013; NEUPARTH et al. 2014). Diversos estudos já foram realizados e apontaram os BTEX como um um composto tóxico à reprodução (HANNIGAN; BOWEN 2010; SIROTKIN et al. 2012; WEBB et al. 2014; DJEMIL et al. 2015).

Blewett et al., 2017a avaliaram a expressão dos genes cyp4 e *cut* e observaram que foram significativamente alteradas após exposição por 24 h de daphnias a água produzida a partir do retorno de fraturamento hidráulico (APFH). O gene cyp4 codifica o membro da família do citocromo P450, essencial na destoxificação e no metabolismo de fase 1 (SNYDER, 2000). Além disso, os autores observaram uma regulação positiva do gene *cut* após 24 horas de exposição à APFH (0,004%, 0,008% e 0,04%). Esse gene está diretamente ligado ao processo de muda em crustáceos (KUBALLA et al., 2011), pelo qual a proteína da cutícula é produzida pela epiderme durante a embriogênese e renovada durante a muda (BLEWETT et al., 2017a). A proteína da cutícula é essencial para o exoesqueleto da daphnia, pois age como barreira a contaminantes ambientais (JEONG et al., 2013). BLEWETT et al., 2017a após análise dos efeitos subletais, concluiram que a APFH induz efeitos na captação de oxigênio, e tem impactos no metabolismo e na muda dos organismos em níveis moleculares. A medida que os daphinideos fazem a muda (troca de

exoesqueleto), os neonatos em desenvolvimento são liberados, ou seja, o efeito na expressão do gene *cut* pode estar relacionado a mortalidade do organismo. O aumento na expressão do gene *cut* pode esta relacionado a “desova e morte” que é um mecanismo muitas vezes empregados por invertebrados em resposta a exposição a substâncias tóxicas (SCHMITT et al., 2008). Efeito esse que pode ter ocorrido com nossa amostra de AP2 em todas as concentrações.

A toxicidade de substâncias tipo BTEX ou apenas benzeno, tolueno e xilenos (BTX) como as presentes na nossa amostra já foram relatados por outros autores. Nascimento et al. (2020) avaliaram a toxicidade de BTX, isolados e em misturas binárias, para o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*. Considerando a CL50 dos compostos isolados, o xileno (16,1 ± 2,4 mg L^{-1}) foi considerado o mais tóxico, seguido pelo tolueno (38,0 ± 5,3 mg L^{-1}) e, por último, benzeno (78,0 ± 2,9 mg L^{-1}). Peng et al. (2015) avaliaram os efeitos tóxcicos de BTEX indiviais e mistos em *Euglena gracilis*, analisando a taxa de crescimento, alterações morfológicas e conteúdo de clorofila em E. gracilis Z e suas células SMZ mutantes tratadas com uma única e mistura de BTEX. O BTEX induziu mudanças morfológicas, formação de lipofuscina e diminuição do conteúdo de clorofila de E. gracilis Z de maneira dose dependente. A toxicidade de cada BTEX relacionada ao crescimento celular e à inibição da clorofila segue a seguinte ordem: xilenos> etilbenzeno> tolueno> benzeno.

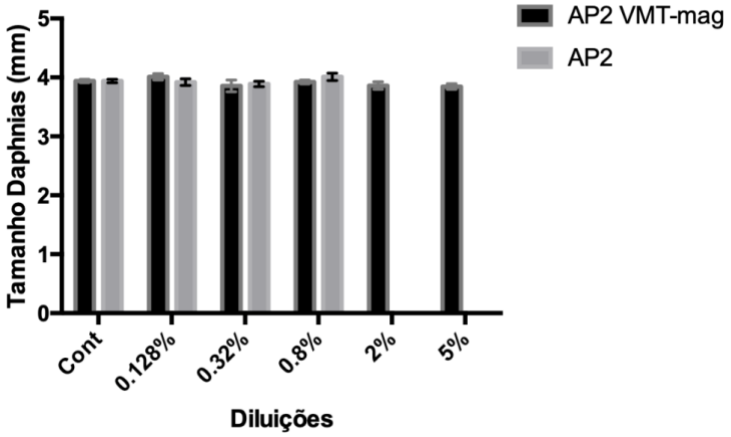
Em nosso estudo, o tamanho final das *D. magna* (Tabela 15) foi medido quando o teste completou 21 dias de exposição (Figura 50) e não houve diferenças significativas em nenhuma das diluições testadas, tanto com como sem tratamento, quando comparadas ao controle negativo. O que indica que esse parâmetro não é afetado pela toxicidade das amostras.

Tabela 15 – Tamanho (mm) final das *Daphnia magna* ao final de 21 dias de exposição a diferentes diluições da amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag.

Tamanho (mm) final das *Daphnia magna*						
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2**				
		0,125%	0,32%	0,8%	2%	5%
1	4	4	4	4,1	-	-
2	4	4	3,8	4	-	-
3	3,9	4,3	3,6	4	-	-
4	3,9	3,9	3,9	3,9	-	-
5	3,7	3,8	3,8	4	-	-
6	4	3,9	3,8	4,4	-	-
7	4	3,9	3,9	4,2	-	-
8	4	4	4	3,7	-	-
9	3,9	3,6	4	4	-	-
10	4	3,8	4,1	3,8	-	-
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2 VMT-mag**				
		0,125%	0,32%	0,8%	2%	5%
1	4	4,1	4	4	3,8	3,9
2	4	3,8	3,7	3,8	3,7	3,8
3	3,9	4,3	3,8	4	4	3,7
4	3,9	3,8	3,7	3,9	-	4
5	3,7	4	4,2	4	4	4
6	4	4,1	4	-	3,9	3,8
7	4	4	4,1	3,8	4	4
8	4	4	-	3,8	-	3,6
9	3,9	4,2	4	4	3,5	3,8
10	4	3,8	3,2	4	4	-

Fonte: Autora

Figura 50 – Tamanho (mm) final das *Daphnias magna* (mães) ao final de 21 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

O tamanho do corpo é universalmente reconhecido como um atributo de importânica crítica na biologia e ecologia funcional dos animais (HAVENS et al.,

2015). Os cladóceros possuem plasticidade de características em termos de tamanho corporal em decorrência de respostas a fotores bióticos e abióticos (LYNCH, 1977; KOROSI et al., 2008; HAVENS; BEAVER, 2011). Daphnias de corpo maior são melhores concorrentes de alimentos em comparação aos que possuem corpos menores. Além disso, em ambientes com peixes ocorre a predação seletiva de tamanho em espécies de corpos grandes o que pode mudar o equilíbrio e favorecer espécies de corpos menores (KARPOWICZ et al., 2020). Karpowicz et al (2020) avaliaram o tamanho do corpo de *Daphnia cucullata*, e demonstraram que o tamanho do corpo (comprimento e largura do corpo) dos microcrustáceos planctônicos pode ser um bom indicador do status ecológicos de recursos hídricos.

4.3.5 *Chironomus riparius*

Foi realizado o teste de toxicidade aguda em *Chironomus riparius* utilizando as diluições de 1,5625%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%, da amostra AP2 e foi obtido o valor de CL_{50} de 46,42 (intervalo de confiança de 42,25 – 51,01) para a amostra sem tratamento e CL_{50} de 91,65 (intervalo de confiança de 81,99 – 102,5) para a amostra de tratada com vermiculita. Confome pode ser observado na Tabela 16, houve diferenças significativas na mortalidade dos organismos nas diferentes diluições. Esses dados de toxicidade aguda revelam uma redução de quase 50% na toxicidade da amostra tratada em comparação com a amostra bruta, demonstrando a importância do tratamento para esse tipo de resíduo. A toxicidade aguda interfere na população de chironomus disponíveis no ambiente e a sua redução pode ocasionar desiquilibrio ecológico, uma vez que esses organismos são um dos principais constituintes de diversos meios e são predadores e presas de outros organismos superiores (TAENZLER et al. 2007; SERRA et al., 2016).

Tabela 16 – Número total de organismo mortos no teste de toxicidade aguda com neonatos de *Chironomus riparius* expostos a diferentes concentrações da amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

Número total de *Chironomus riparius* mortos								
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2**						
		1,562%	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
1	0	0	0	0	0	0	3	5
2	0	0	0	0	0	0	3	4
3	0	0	0	0	0	0	3	3
4	0	0	0	0	0	1	3	5
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2 VMT-mag**						
		1,562%	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
1	0	1	0	1	0	1	1	4
2	0	0	0	0	0	0	0	3
3	0	0	0	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	0	0	0	3

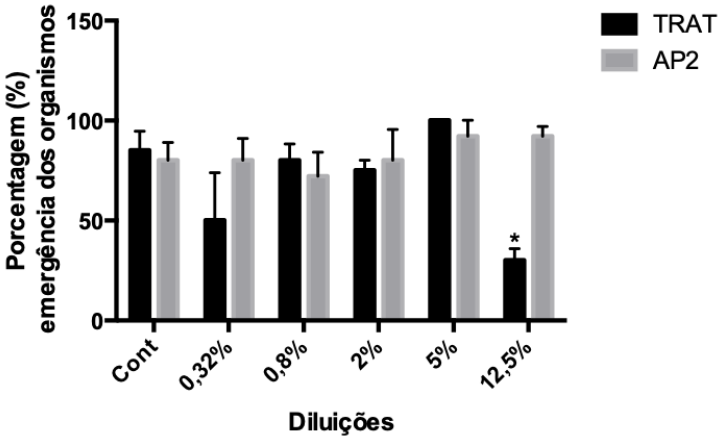
Fonte: Autora

Em relação aos testes crônicos, todos os critérios de validade foram atendidos :, a temperatura medida mudou entre 19,7 e 20,1, o pH variou entre 8,12 e 8,57, o oxigênio dissolvido estava acima de 8 mg L^{-1} em e a condutividade 551 e 1366. Além da emergência total em o tratamento controle atingiu 80%.

Parâmetros da história de vida constituem os principais recursos utilizados na avaliação de efeitos decorrentes da contaminação de insetos. A taxa de crescimento de *C. riparius* e o atraso da emergência são indicativos de efeitos no nível populacional (CAMPOS et al., 2016).

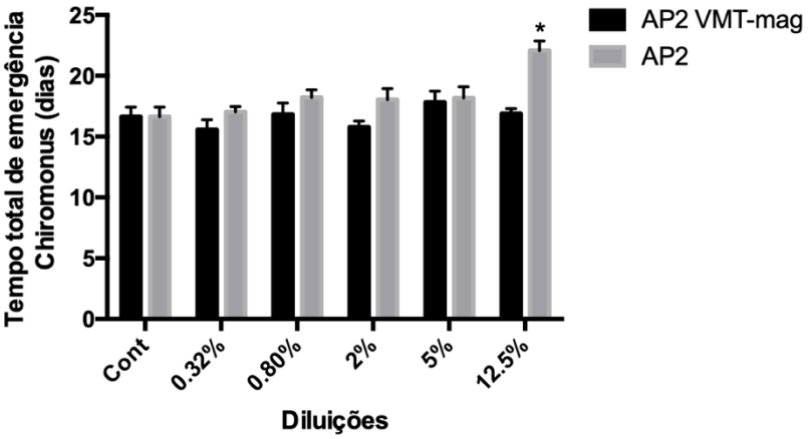
Como pode-se observar na Figura 51, foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) da porcentagem de emergência nos organismos expostos à diluição de 12,5% da amostra tratada por VMT-mag em comparação ao controle negativo, porém, em relação ao tempo de emergência total dos organismos (Figura 53) ocorreu um atraso na diluição de 12,5% da amostra AP2 sem tratamento.

Figura 51– Porcentagem de emergência dos mosquitos (*Chironomus riparius*) expostos a diferentes diluições da água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Figura 52 – Tempo total (dias) de emergência dos mosquitos (*Chironomus riparius*) expostos à diferentes diluições das amostras de água diluida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

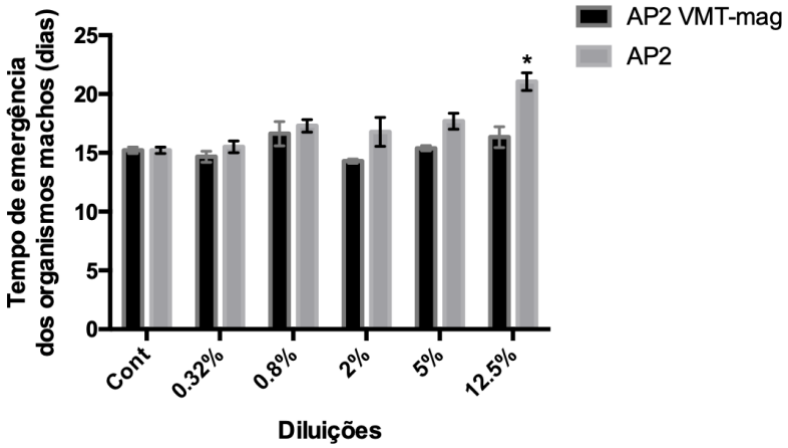


(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativ o; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

O tempo de emergência (dias) dos organismos machos (Figura 53) foi afetado na menor diluição (12,5%) da amostra sem tratamento, além disso, o tempo de emergência (dias) das fêmeas também foi afetado nas diluições de 0,8%, 5% e 12,5% também na amostra sem tratamento (Figura 54). Entretanto, esses efeitos não são observados na amostra de AP2 tratada por VMT-mag, indicando uma redução na sua toxicidade e a relevância do tratamento. O monitoramento da emergência dos mosquitos é um dado extremamente significante, pois está diretamente relacionada a reprodução, permitindo

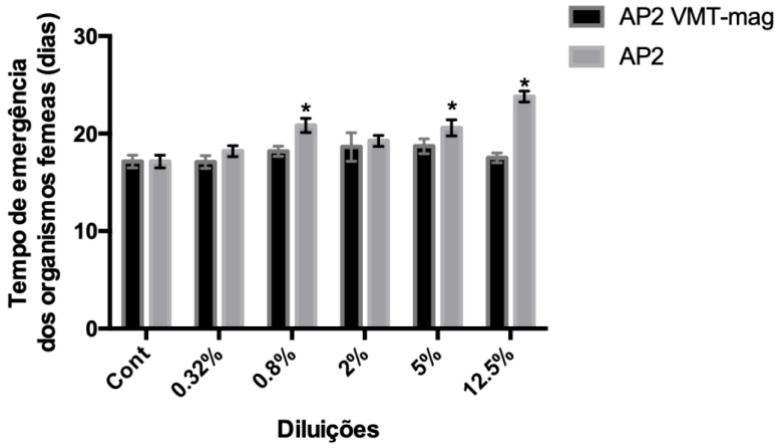
considerar parte do ciclo de vida do quironomídeo, pois integra efeitos nos estágios larvais e pupal.

Figura 53 – Tempo (dias) de emergência dos organismos macho (*Chironomus riparius*) expostos à diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativ o; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Figura 54 – Tempo (dias) de emergência dos organismos fêmeas (*Chironomus riparius*) expostos à diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = control e negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Conforme ilustrado nas Figuras 53 e 54 acima, as fêmeas foram mais afetadas nas diluições de 0,8; 5 e 12,5% enquanto os machos apenas na diluição de 12,5% das amostras sem tratamento (AP2), indicando maior sensibilidade do sexo feminino em relação ao masculino. Rodrigues et. al (2015a) avaliando a

toxicidade de piretróides para *C. riparius* também observaram maior resistência do sexo masculino. Uma hipótese que pode esclarecer o motivo das fêmeas terem sido mais afetadas que os machos quando expostos à amostra AP2, é a diferença de metabolismos entre os organismos, pois as fêmeas demandam mais reservas energéticas para produção de massa de ovos, o que pode acarretar a maior acúmulo de substâncias tóxicas (GOEDKOOP et al., 2010). No caso dos organismos femininos, foi demonstrado que eles acumulam mais xilenos (substância presente em nossa amostra de água produzida) do que os machos, e os ovários são o órgão alvo para o acúmulo desse hidrocarboneto (SUTER-EICHENBERGER et al. 1998; WAN et al. 2007; LIN et al. 2013). Além disso, segundo Campos et al. (2019) alterações na sincronia da emergência de mosquitos machos e fêmeas pode afetar o enxame de *C. riparius,* de forma que ocorram alterações na reprodução dos organismos e até mesmo na dinâmica populacional.

A emergência tardia de Chironomus já foi relatada anteriormente por Arambourou et al. (2019) que coletaram três sedimentos em campo contaminados com praguicidas, metais, ftalatos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e avaliaram sua toxicidade a *Chironomus riparius* ao longo do seu ciclo de vida, e os efeitos tóxicos foram medidos em diferentes níveis de organização biológica: desde o molecular (análise lipidômica e variações transcricionais) até o organismo como um todo (taxa de respiração, marcadores de forma e taxa de emergência). No sedimento caracterizado por um nível intermediário de contaminação com HAPs e ftalatos ocorreu aumento da resposta ao estresse celular e emergência tardia dos machos, já no sedimento mais contaminado com HAPs, ftalatos e praguicidas, genes relacionados às vias endócrinas foram superexpressos e foi observado auemnto da resposta ao estresse celular e processos de biotransformação, enquanto o formato da asa feminina foi afetado. O sucesso reprodutivo dos insetos depende da biossíntese de vitelogenina e da sua absorção nos oócitos em desenvolvimento, uma vez que o vitelo é a principal fonte de energia que alimenta o desenvolvimento do embrião, a interrupção da embriogénese pode afetar a geração seguinte. O atraso da emergência em *Chironomus riparius* é devido ao aumento de consumo de energia à custa do crescimento para neutralizar efeitos tóxicos nos organismos (ARAMBOUROU et al., 2019). Em outro estudo Verrhiest et al.

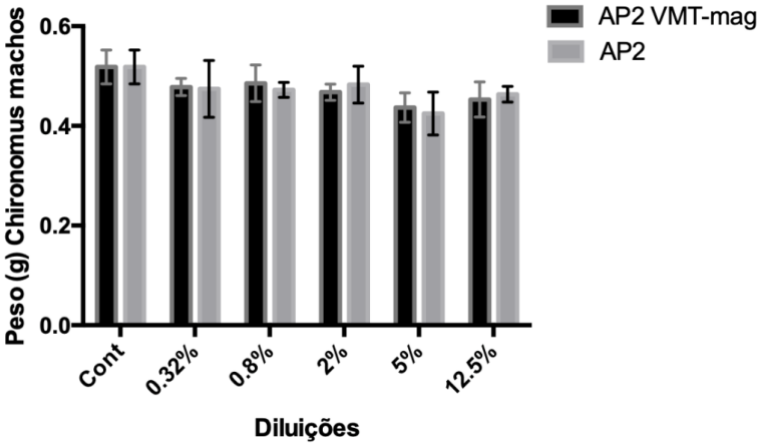
(2001) avaliaram a exposição dos macroinvertebrados *Daphnia magna*, *Hyalella azteca* e *Chironomus riparius* aos HAPs fenantreno (P), fluoranteno (FLA) e benzo (k) - fluoranteno (B), isoladamente ou em combinação, tendo sido avaliada por meio de testes de sedimento monoespecífico de toxicidade aguda (entre 24h e 14 dias). Para o fenantreno, as CL_{50} encontradas foram de 50, 15 e 20 mg/kg de peso seco, respectivamente para *Daphnia magna*, *Hyalella azteca* e *Chironomus riparius*, enquanto o fluoranteno teve uma CL_{50} de 10, 5 e 15 mg/kg respectivamente para *Daphnia magna*, *Hyalella azteca* e *Chironomus riparius*.

Park et al. (2009) avaliaram a exposição de *C. riparius* a fenbentazol e observaram efeitos significativos na sobrevida, crescimento, equilíbrio sexual de adultos emergentes e desenvolvimento de deformidade no aparato bucal. Os autores relataram que a proporção de adultos emergidos do sexo masculino aumentou nos grupos tratados com fenbendazol. A avaliação dos efeitos em nível molecular induzidos por fenbendazol revelou que a expressão dos quatro genes da família HSP além do CYP450 eram potenciais indicadores da exposição ao fenbendazol em *C. riparius*. O citocromo P450 é um dos sistemas enzimáticos mais importantes envolvidos na destoxificação de xenobióticos e na regulação hormonal dos insetos, nesse estudo o gene CYP450 foi modulado em resposta a exposição dos organismos ao fenbendazol, indicando que a exposição possa estar associada a distúrbios no sistema hormonal dos mosquitos, afetando de forma significativa os processos de crescimento e emergência (PARK et al., 2009). Alterações na relação sexual, efeitos na diferenciação sexual ou fenótipos específicos do sexo, sugerem uma potencial desregulação nos processos hormonais dos organismos expostos a estressores ambientais (HAHN LIESS; SCHULZ 2001). Em insetos, a ecidisona e o 20-hidroxiecdone são extremamente importantes, pois respectivamente, agem como precursor direto do hormônio ativo de muda e como esteroides sexuais masculinos (DE LOOF; HUYBRECHTS 1998), uma vez que os processos de diferenciação sexual em animais são baseados na proporção entre homens e mulheres. Portanto a proporção reduzida de fêmeas pode ser entendida como consequência da desregulação hormonal (PARK et al., 2009).

Quanto ao parâmetro de peso de machos e fêmeas, não foi observada diferença significativa quanto ao ganho ou perda de peso, quando comparados ao controle negativo ($p \leq 0,05$) (Figura 55 e 56). O processo reprodutivo é

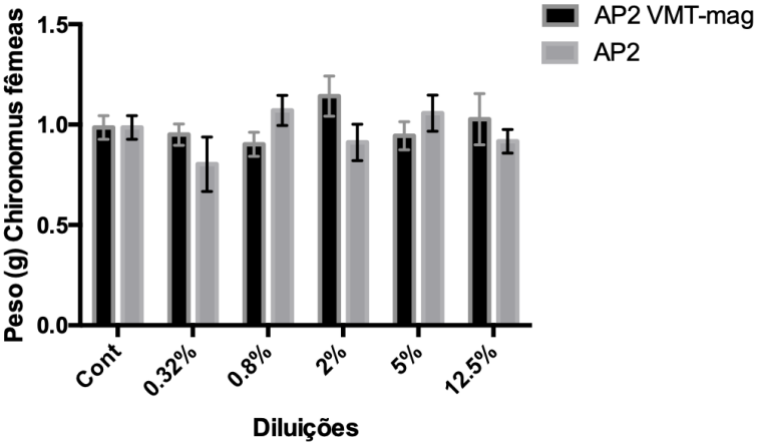
dependente do tamanho do corpo dos mosquitos aquáticos; fêmeas maiores são mais fecundadas, assim como os machos de maior porte obtem mais sucesso, correlacionando-se ao número total de gametas, assim como o sucesso reprodutivo (PONLAWAT; HARRINGTON, 2007; LILLEY et al., 2012). A redução no tamanho corporal de machos e fêmeas de *C. riparius* é uma indicação de efeitos reprodutivos fortes, sendo esse um parâmetro sensível e relevante para uma melhor avaliação dos efeitos no nível populacional de contaminantes (RODRIGUES et al. al., 2015b). Esses efeitos podem levar a efeitos importantes na população (mortalidade e crescimento reduzido) e nos níveis de comunidades (CAMPOS et al., 2016).

Figura 55 – Peso (mg) dos *Chironmus riparius* machos expostos a diferentes diluições da água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) ao final de 10 dias.



Fonte: Autora.

Figura 56 – Peso (mg) dos *Chironmus riparius* fêmeas expostos a diferentes diluições de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) ao final de 10 dias.



Fonte: Autora.

Além do número total de gametas, o peso corporal de chironomus machos também está relacionado ao desempenho de vôo (LILLEY et al., 2012; PONLAWAT; HARRINGTON, 2007), já nas fêmeas, o peso está relacionado à fecundidade e fertilidade através de efeitos na viabilidade e no tamanho da massa dos ovos (PONLAWAT; HARRINGTON, 2007). Alterações nos níveis do hormônio ecdisteróide mediados pelo receptor de ecdisona podem estar relacionados ao desenvolvimento dos chrironomus, uma vez que esse hormônio está diretamente envolvido na regulação do crescimento, desenvolvimento e reprodução de artrópodes (RIDDIFORD et al., 2000). Desta forma, a redução de peso tem sido considerada uma indicação de potenciais efeitos reprodutivos e podem ser utlizados para entender efeitos no nível populacional de contaminantes (CAMPOS et al., 2016; RODRIGUES; et al., 2015a).

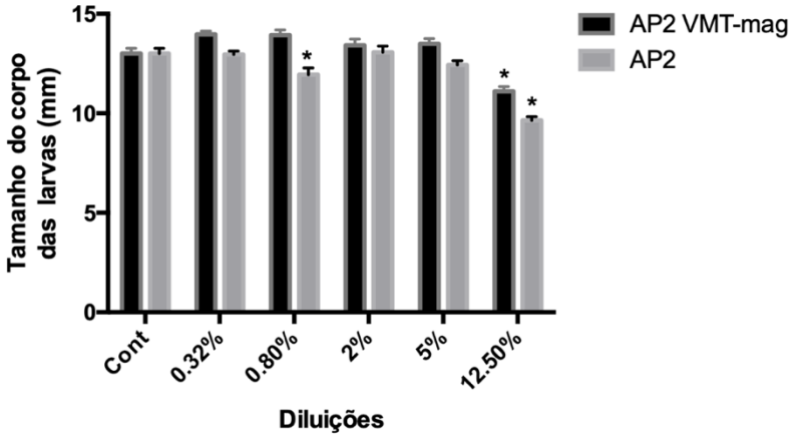
Ao final do período de 10 dias de exposição, foi medido o tamanho do corpo das larvas (Tabela 17), (Figura 57). Com reduções significativas nas diluições de 0,8 e 12,5% para a AP2 e de 12,5% na AP2 VMT-mag.

Tabela 17 – Tamanho (mm) médio do corpo das larvas dos *Chironomus riparius* expostos a diferentes diluições de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

Tamanho (mm) médio dos *Chironomus riparius* expostos						
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2**				
		0,32%	0,8%	2%	5%	12,5%
1	12,88	13,57	11,86	12,11	11,75	9,26
2	12,96	12,96	13,03	12,53	13,07	9,90
3	13,07	12,84	11,32	13,48	12,46	9,42
4	12,27	12,49	12,33	13,72	12,46	9,38
5	13,87	12,95	11,15	13,48	12,42	10,27
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2 VMT-mag**				
		0,32%	0,8%	2%	5%	12,5%
1	12,88	14,46	14,46	13,10	12,98	11,26
2	12,96	13,75	14,10	13,33	13,44	10,64
3	13,07	13,53	14,49	13,73	14,38	11,07
4	12,27	13,88	13,41	12,55	13,69	11,89
5	13,87	14,20	13,20	14,41	13,00	10,70

Fonte: Autora.

Figura 57 –Tamanho do corpo (mm) das larvas de *Chironomus riparius* ao final de 10 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag) em diferentes diluições.



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água pr oduzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Deficiências de crescimento nos estágios lavais de *C. riparius* podem ser traduzidas em termos de atraso de emergência, com consequências no maior atraso de emergência das fêmeas, assim como observado neste trabalho. O atraso pode sugerir que o comprimento do crescimento pode ser mais grave em fêmeas do que machos (SILVA et al., 2019). O crescimento larval de *Chironomus riparius* esta correlacionado com emergência tardia dos mosquitos, principalmente fêmeas, bem como ao tamanho do adulto. O aumento do metabolismo sugere uma alta demanda de energia em *C. riparius* o que reduz a energia disponível para crescimento e reprodução (RODRIGUES et al., 2015b).

Azevedo-Pereira e Soares (2010) investigaram os efeitos do cloreto de mercúrio em *Chironomus riparius*, simulando uma descarga de mercúrio em um ecossistema de água doce. Foram avaliados os seguintes endpoints: crescimento, emergência, tempo de desenvolvimento e comportamento. A exposição ao mercúrio reduziu o crescimento e emergência, atraso no desenvolvimento e uma diminuição na atividade locomotora das larvas (AZEVEDO-PEREIRA; SOARES, 2010). Em ecossistemas aquáticos, a maioria dos agentes tóxicos se acumula em sedimentos aquáticos (INGERSOLL 1995; BURTON; LANDRUM, 2003), portanto, organismos que vivem em contato próximo ao sedimento são expostos aos produtos químicos diretamente ou através da ingestão de alimento (AZEVEDO-PEREIRA; SOARES, 2010). O mercúrio é um contaminante difuso que provoca deficiências de elementos

essenciais nos organismos por meio da competição em moléculas alvo (WALKER et al. 2006) que afetam o sistema nervoso central da biota (WOLFE 1998). O crescimento é um parâmetro sensível em relação a mosquitos, sendo utilizado para estudar a toxicidade crônica de diversos contaminantes (SIBLEY et al. 2001), tendo a emergência adulta de quironomídeos como um ponto final utilizado em testes de toxicidade (PÉRY et al. 2002). O crescimento é um endpoint ecológico muito importante, componente de aptidão e determinante da saúde da população, ou seja, qualquer efeito individual que possa acarretar o declínio ou viabilidade populacional pode afetar um ecossistema de água doce (AZEVEDO-PEREIRA; SOARES, 2010). Além disso, Chibunda et al., (2009) avaliaram os efeitos do mercúrio inorgânico em sedimentos enriquecidos na sobrevivência, crescimento e emergência do mosquito Chironomus riparius e comparou os resultados com as concentrações de mercúrio relatadas em riachos e rios na África. Segundo os autores, com 3,84 mg Hg/kg de sedimento seco, o mercúrio reduziu significativamente a sobrevivência larval e o sucesso da emergência de mosquitos em comparação com o sedimento controle ($P < 0,05$). O crescimento larval foi significativamente inibido ($P < 0,05$) com 2,42 mg Hg/kg de peso seco, enquanto a emergência de *C.riparius* foi significativamente atrasada com 0,93 mg/kg de peso seco.

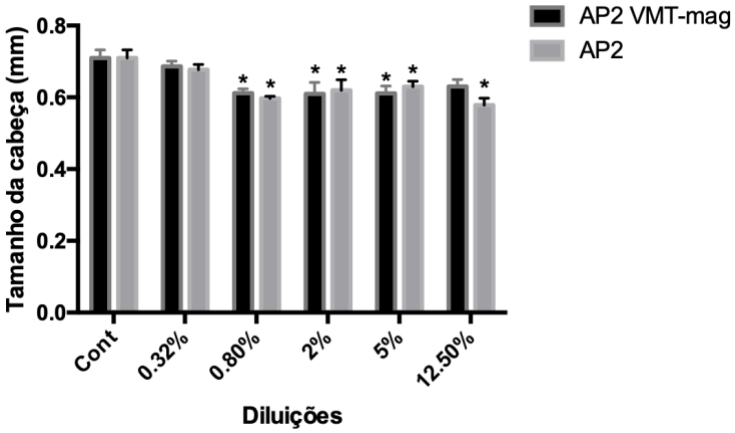
Em nosso estudo, o tamanho da cabeça das larvas de *Chironomus riparius* expostas a diferentes diluições da AP2 e AP2 VMT-mag foi significativamente diferente do controle negativo ($p \leq 0,05$). A AP2 foi tóxica para os organismos nas diluições de 0,8%, 2% e 12,5% enquanto a amostra tratada reduziu significativamente o tamanho da cabeça larval nas diluições intermediárias de 2% e 5% (Tabela 18 e Figura 58).

Tabela 18 – Tamanho (mm) médio da cabeça das larvas dos *Chironomus riparius* expostos a diferentes diluições da água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

Tamanho (mm) médio dos *Chironomus riparius* expostos						
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2**				
		0,32%	0,8%	2%	5%	12,5%
1	0,705	0,64	0,58	0,685	0,588	0,58
2	0,78	0,672	0,59	0,54	0,66	0,62
3	0,728	0,73	0,612	0,56	0,6	0,6
4	0,64	0,672	0,608	0,648	0,635	0,506
5	0,696	0,67	0,595	0,666	0,665	0,584
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2 VMT-mag**				
		0,32%	0,8%	2%	5%	12,5%
1	0,705	0,692	0,605	0,592	0,624	0,66
2	0,78	0,628	0,645	0,533	0,64	0,635
3	0,728	0,695	0,624	0,56	0,528	0,625
4	0,64	0,71	0,572	0,656	0,628	0,56
5	0,696	0,706	0,612	0,706	0,635	0,672

Fonte: Autora.

Figura 58 –Tamanho (mm) do cabeça das larvas de *Chironomus riparius* ao final de 10 dias de exposição às amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Faria, Nogueira e Soares (2007) também observaram menores larguras de cápsulas da cabeça de quironomídeos de um campo de arroz altamente contaminado propanil e este efeito aparentemente também estava relacionado à alta temperatura naquele local (40 e 47ºC).

4.3.6 *Dugesia tigrina*

No teste de toxidade aguda com a planária *Dugesia tigrina* não foi observada mortalidade dos organismos (Tabela 19) em nenhuma das diluições testadas (3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%), indicando que tanto a amostra bruta quanto a tratada não apresentam toxicidade aguda relevante para esse organismo, e, portanto não foi possível calcular os valores de CL_{50}. Em planárias, o desfecho de mortalidade pode não ser o mais adequado para avaliar os efeitos de alguns compostos, pois elas podem sobreviver e suportar longos períodos de inanição, o que enfatiza a importância da avaliação de desfechos comportamentais aos organismos (SIMÃO et al. 2020). Em nosso estudo, houve alterações na avaliação dos parâmetros comportamentais analisados.

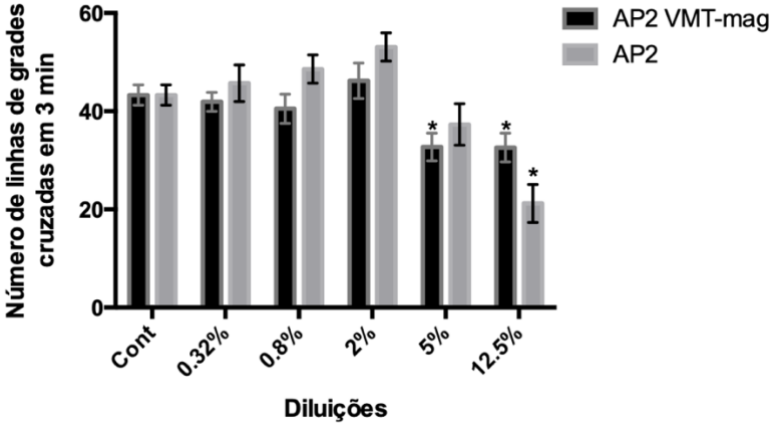
Tabela 19 – Número total de organismo mortos no teste de toxicidade aguda com *Dugesia tigrina* expostas a diferentes concentrações da amostra de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

Número total de *Dugesia tigrina* mortas								
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2**						
		1,562%	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
Réplica	**Controle**	**Diluições AP2 VMT-mag**						
		1,562%	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Autora

Observamos uma redução na movimentação (locomoção) das planárias nas menores diluições das amostras, 12,5%, da AP2 sem tratamento e após o tratamento, este efeito foi detectado nas diluições de 5% e 12,5% (Figura 59). O que indica um aumento da toxicidade da amostra após o tratamento para esse parâmetro comportamental com *D. tigrina*.

Figura 59 – Número de linhas de grades cruzadas durante 3 minutos pelas planárias (*Dugesia tigrina*) após exposição de 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).

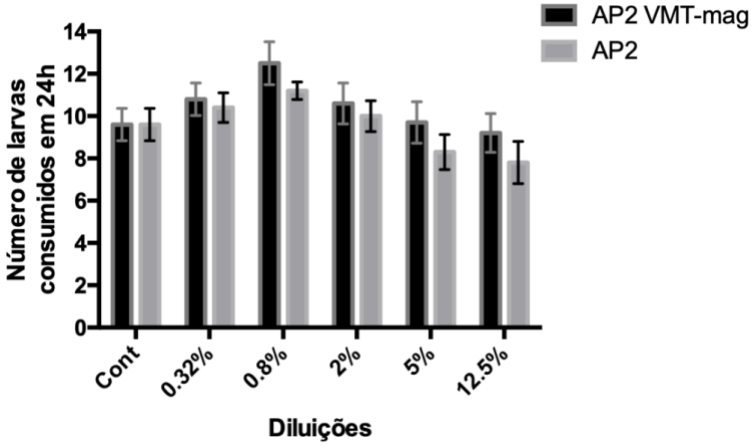


(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Parâmetros comportamentais são relatados como indicador na avaliação de efeitos tóxicos de substâncias em organismos aquáticos e do solo, podendo ser considerado bastante sensível ao estresse químico. O comportamento consiste da interação dos processos de mecanismos fisiológicos com os estímulos ambientais (DELL'OMO, 2000). Os impactos dos HPAs na alimentação e no comportamento locomotor organismos aquáticos já foi observado em outros estudos, como por exemplo em poliquetas (ROSEN; MILLER, 2011) e camarões (SILVA et al., 2013). É sabido que o comportamento alimentar requer coordenação de vários aspectos do sistema nervoso para que seja eficaz (INOUE et al., 2015).

Em nosso trabalho, os organismos não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle negativo em nenhuma diluição das amostras com e sem tratamento quanto ao parâmetro de inibição alimentar (Figura 60).

Figura 60 – Número de larvas de *Chironomus riparius* (7 dpe) consumidos pelas planárias (*Dugesia tigrina*) após exposição de 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) com e sem tratamento com vermiculita magnetizada (VMT-mag).



Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

A redução na atividade locomotora observada em planárias é um parâmetro comportamental extremamente relevante, uma vez que também está associada a respostas diminuídas à captura de presas (OFOEGBU et al., 2016). A locomoção das planárias ocorre basicamente por movimentos planatórios e de rastejo, por meio da atividade ciliar ventral e muscular, respectivamente (STRINGER, 1917; TALBOT; SCHOTZ, 2011). Considerando a redução da movimentação das planárias expostas à AP2 antes e após tratamento, podemos supor que a amostra possua algum composto com potencial neurotóxico (KNAKIEVICZ; FERREIRA, 2008), uma vez que a capacidade de locomoção de invertebrados é mediada por acetilcolina ou glutamato (BUTTARELLI et al., 2008; VYAS et al., 2011). Efeitos no sistema nervoso, tem com consequências para a atividade de *D. tigrina* interferências na capacidade de detectar, localizar e capturar presas (INOUE et al., 2004; INOUE et al., 2015). O alumínio e o mercúrio são contaminantes neurotóxicos comuns no ambiente e estão presentes em nossas amostras, como já citado neste documento. Alexandrov e colaboradores (2018) reportaram efeitos de compostos de alumínio [sulfato; Al2 (SO4) 3] e / ou mercúrio [sulfato; HgSO4] para células neuronal-gliais humanas (HNG) em co-cultura primária usando a evolução do fator de transcrição do complexo pró-inflamatório NF-kB (p50 / p65) como um indicador crítico para o início de neurodegeneração e sinalização inflamatória patogênica. Segundo os

autores, houve indução significativa do complexo NF-kB (p50 / p65), ocorrendo aumento na sinalização pró-inflamatória decorrentes da exposição células HNG a essas neurotoxinas ambientais na faixa ambientalmente relevante de 20-200 nM, além de sinergismo significativo na neurotoxicidade quando alumínio (sulfato) e mercúrio (sulfato) foram adicionados juntos (ALEXANDROV et al., 2018). Os metais são poluentes de grande preocupação em limnologia, sua relevância esta especialmente relacionada a sua persistência no ambiente (BEGHELLI et al., 2018). Além disso, os metais podem se acumular e atingir altas concentrações nos sedimentos de corpos d'água com histórico de poluição (STANAWAY et al. 2012), o que pode ocasionar danos a vida aquática (LI et al. 2015) e até mesmo problemas de saúde pública (SINGH et al. 2014).

Com relação aos HPAs presentes na amostra de AP2, Simão et al. (2020) avaliaram o efeito da exposição a fenantreno, pireno e benzo [a] pireno (B [a] P) em planárias *Girardia tigrina*, e relataram indução de mortalidade, alterações na regeneração cefálica (durante e pós-exposição), desfechos comportamentais, além de detectarem a presença de HAPs nos tecidos. A locomoção e alimentação pós-exposição foram significativamente prejudicadas em concentrações subletais após a exposição a todos os compostos, e a regeneração dos fotorreceptores foi atrasada nos organismos expostos ao pireno. Além disso, a concentração dos HPAs nos tecidos das planárias seguiram um aumento dependente da dose, o que demonstrou absorção destes compostos em soluções experimentais. No ambiente aquático, os HPAs tendem a se adsorver à matéria orgânica nos sedimentos ou são absorvidos por organismos (ALEGBELEYE et al., 2017), assim, organismos que vivem em contato próximo com sedimentos ou que interagem com partículas contaminadas são mais vulneráveis a contaminação por HPAs (ALEGBELEYE et al., 2017; MEADOR, 2008). Ou seja, animais bentônicos ou epibentônicos são expostos a grandes quantidades de HPAs por meio da água e do sedimento (SIMÂO et al. 2020). A avaliação dos efeitos de HPAs em ambientes naturais é bastante desafiadora, em decorrência das diferenças de metabolização entre espécies e da variedade de efeitos que esses compostos podem acarretar, principalmentequando encontrados em misturas complexas (MEADOR, 2008). Devido a natureza epibentônica e predatória das planárias (VILA-FARRE; RINK, 2018), esses organismos estão expostos a uma variedade de produtos químicos

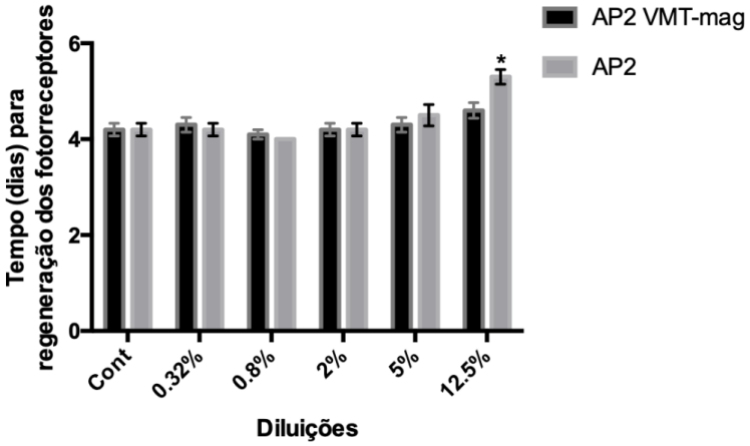
que são lançados em ecossistemas de água doce, tanto aqueles presentes na coluna d'água, quanto os adsorvidos ao sedimento e em suas presas (ALEGBELEYE et al., 2017).

Os HPAs são classificados como perigosos para a saúde humana em decorrência da sua carcinogenicidade e/ou mutagenicidade, sendo que a preocupação com a toxicidade do desenvolvimento tem aumentado nos últimos anos (GEIER et al., 2018). HPAs são compostos hidrofóbicos que podem se acumular e romper membranas celulares, ocasionando narcose (BALL; TRUSKEWYCZ, 2013), que pode estar relacionado a resposta de imobilidade locomoção retardada e pode explicar a diminuição nas distâncias percorridas e, consequentemente, na taxa de alimentação (SIMÃO et al. 2020). Comportamentos estereotipados têm sido relacionados à interrupção do funcionamento normal das vias neurais de planárias (BUTTARELLi et al., 2008) uma vez que os HPAs podem ser neurotóxicos para poliquetas e anfípodes (HAN; WANG, 2009; GAUTHIER et al., 2016). A combinação de narcose e interrupção das vias neurais explicam as respostas comportamentais. Com relação a população das planárias, deficiências no comportamento podem ter graves impactos ambientais. Os efeitos subletais podem levar a mortalidade e a longo prazo agravar a aptidão. A redução da alimentação tem impactos no crescimento e reprodução, e a redução da atividade locomotora pode deixar o organismo vulnerável a predadores além de reduzir a captura de presas, o que demonstra a importância da avaliação de endpoints comportamentais em planárias (SIMÃO et al. 2020).

Outros trabalhos também já avaliaram o parâmetro de locomoção em diferentes planárias a diversas substancias, tais como: cocaína (RAFFA; VALDEZ, 2001); tributilestanho (TBT) (OFOEGBU et al., 2016); fungicida ciproconazol (SARAIVA et al, 2018); fármacos (carbamazepina e fluoxetina) (OFOEGBU et al., 2019); solventes (DMSO, etanol, metanol, acetato de etila) (IRELAND et al., 2020).

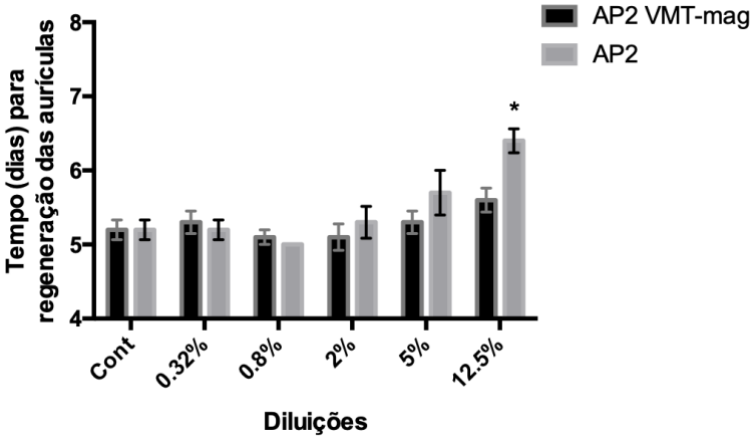
Neste trabalho, também avaliamos a capacidade de regeneração da cabeça da planária. Para tanto, foi avaliado o tempo em dias necessários para o aparecimento das aurículas e dos fotorreceptores após a decapitação individual das planárias expostas as duas amostras em diferentes diluições da AP2 com e sem tratamento, como mostrado nas Figuras 61 e 62.

Figura 61 – Tempo (dias) de regeneração dos fotorreceptores das planárias (*Dugesia tigrina*) expostas por 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) antes e após o tratamento com vermiculita magnetizada (VTM-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Figura 62 – Tempo (dias) de regeneração das aurículas das planárias (*Dugesia tigrina*) expostas por 9 dias a diferentes diluições das amostras de água produzida de petróleo (AP2) antes e após o tratamento com vermiculita magnetizada (VTM-mag).



(*) = diferença significativa entre o controle negativo (p≤0,05); Cont = controle negativo; AP2 = água produzida 2; AP2 VMT-mag = água produzida 2 tratada com vermiculita magnética.
Fonte: Autora

Como pode ser observado na Figura 61, a diluição de 12,5% da amostra AP2 afetou de forma significativa a formação dos fotorreceptores, com consequente atraso no tempo de aparecimento das aurículas também na mesma diluição (12,5%) da amostra sem tratamento (Figura 62) nos organismos expostos. A exposição à amostra tratada não induziu a efeitos significativos (p≤0,05) em nenhum dos dois parâmetros analisados.

A regeneração planariana envolve a geração de um novo tecido no local da ferida por meio da proliferação celular (formação de blastema) e remodelação

de tecidos pré-existentes a fim de restaurar a simetria e a proporção do tecido (morfalaxia). Portanto, como os blastemas não substituem todos os tecidos após a maioria das lesões, é necessário a combinação de blastemas e morfaxia para que a regeneração seja completa. Os neoblastos são também importantes para a capacidade regenerativa das planárias, pois são uma população de células-tronco totipotentes capazes de gerar essencialmente todo o tipo de tecido (REDDIEN; ALVARADO, 2004). Esses animais desenvolveram um interessante sistema de células-tronco adulta pluripotente, os neoblastos, que dão origem a toda gama de tipos de células e órgãos do corpo planariano, tais como sistemas cerebrais, digestivos, excretores, sensoriais e reprodutivos. Ou seja, os neoblastos estão presentes de forma abundante por todo mesenquima e se dividem continuamente. O fluxo resultante de progenitores e a rotação de células diferenciadas impulsionam a auto-renovação rápida de todo o animal em questão de semanas (RINK, 2013).

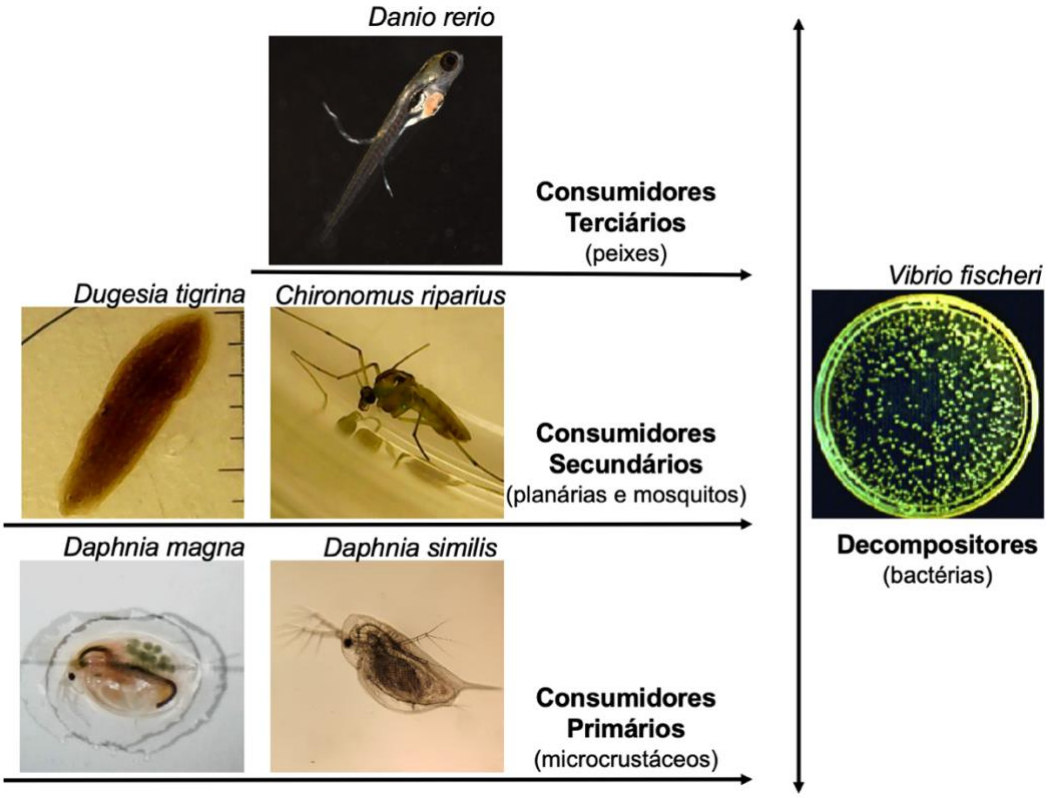
A capacidade regenerativa das planárias também esta associada à sua reprodução assexuada, portanto, o atraso na regeneração da cabeça das planárias pode impactar diretamente a dinâmica populacional dos organismos (SARAIVA et al., 2018), uma vez que envolve a formação e regeneração de tecidos antigos (REDDIEN; ALVARADO, 2004). O atraso para formação dos fotorreceptores pode esta associado à produção de espécies reativas de oxigênio, que são essenciais para neurorregeneração durante o processo de diferenciação e padronização (PIROTTE et al., 2015). Adicionalmente, o atraso na formação dos fotorreceptores assim como das aurículas prejudica a função básica de detecção da direção da luz, uma vez que as planárias são fototáticas, como consequência tornam-se suscetíveis a predadores (INOUE et al., 2004; SARAIVA et al., 2018). Knakievicz e Ferreira (2008) analisaram os efeitos tóxicos do cobre (Cu^{2+}) sobre planárias de água doce (*Girardia tigrina*), com base na mobilidade, desempenho de regeneração, frequência de micronúcleo (MN) em animais em regeneração e desempenho reprodutivo. Esses quatro biomarcadores forneceram informações complementares sobre toxicidade de Cu^{2+}, teratogenicidade, mutagenicidade e efeitos crônicos (> 96 h de exposição), respectivamente. A mobilidade, para adultos intactos, e o tempo de regeneração e a frequência MN, para animais em regeneração, foram significativamente afetados e os efeitos da exposição crônica foram claramente evidenciados pela

avaliação do desempenho reprodutivo, com redução significativa nas taxas de fecundidade e fertilidade.

4.4 DISCUSSÃO GERAL

Os testes realizados neste trabalho são extremamente relevantes para avaliação do impacto ocasionado pelo AP a diferentes organismos aquáticos e seus compartimentos ecológicos, uma vez que foram realizados com organismos de diferentes níveis tróficos. Os peixes enquadram-se como consumidores terciários, os mosquitos e planárias como consumidores secundários, as microcrustáceos como consumidores primários e a bactéria como decompositores (Figura 63). Portanto, pode-se fazer uma relação entre eles e estimar os efeitos tóxicos aqui apresentados em diferentes níveis, pois existe uma interação entre esses organismos no ambiente aquático, ou seja, caso ocorra um efeito deletério a um deles, esse efeito pode se propagar aos demais, de forma a impactar a sobrevivência individual, populacional, de comunidade e ecossistemica. Uma vez que um desses organismos não cumpra seu papel na cadeia alimentar, pode impactar direta ou inderetamente na sobrevivência e níveis populacionais de outros organismos, mostrando a relevante ecológica deste trabalho e a importância de tratamentos eficientes de forma a reduzir ou eliminar os compostos tóxicos presentes na constituição da AP.

Figura 63 – Níveis tróficos dos organismos utilizados na avaliação da toxicidade das amsotras de água produzida de petróleo, utilizados no presente trabalho.

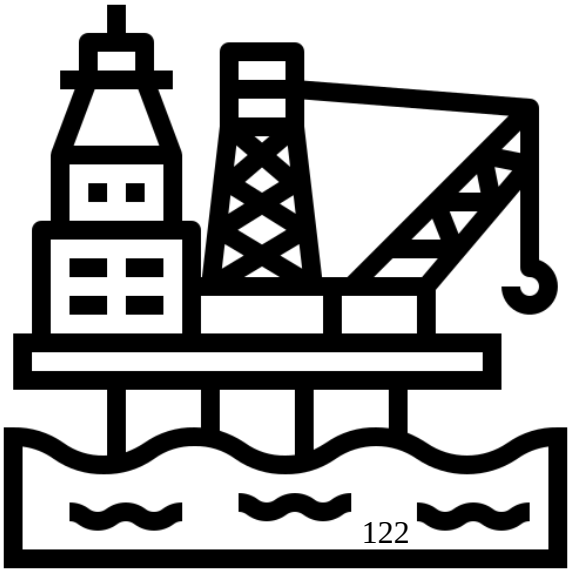


Fonte: Autora.

Dentre os tratamentos aqui avaliados, podemos destacar a fotoeletrocatálise, combinada ou não com ozonização, além da vermiculita magnetizada como promissores no tratamento de amostras complexas, como a água produzida de petróleo. Desa forma, esse trabalho contribui não só para a avaliação ampla da ecotoxicidade de amostras de AP, mas também na avaliação de tratamentos alternativos eficazes, podendo contribui com políticas públicas de controle da poluiçao.

Capítulo
05

CONCLUSÕES



5. CONCLUSÕES

Considerando todos os resultados aqui reportados, podemos concluir que a AP é uma mistura complexa de alto potencial tóxico em relação à biota aquática, pois apresenta efeitos deletérios a todos os organismos estudados (*Danio rerio*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* e *Dugesia tigrina*) em diferentes intensidades.

Este trabalho demonstra a importância da utilização de organismos dos diferentes níveis tróficos e de amostras de AP diferentes, pois como foi observado a AP pode induzir a diferentes efeitos tóxicos, dependendo de sua constituição, a um mesmo organismo, como o observado com a espécie *Vibrio fischeri*, que apresentou efeitos tóxicos após a exposição à amostra AP1 e não a AP2, o que caracteriza diferenças dos compostos tóxicos presentes em uma mesma jazida em extrações realizadas em períodos diferentes, como da Bacia Portiguar.

Quanto aos tratamentos aqui empregados para as amostras de AP, os que tiveram melhor eficácia na redução dos efeitos observados foram os processos que utilizam VMT-mag, fotocatálise, fotoeletrocatálise e ozonização fotoeletrocatalítica. Entretanto, nenhum dos tratamentos foi totalmente eficiente, pois não foram capazes de eliminar os efeitos nos organismos testados e, portanto, ainda precisam ser aprimorados a fim de eliminar totalmente a toxicidade da AP. Mas ainda assim, são tratamentos promissores e são de extrema importância para posterior descarte em recursos hídricos a fim de minimizar os efeitos ecotoxicológicos nos organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, M.; ADIL, M.; EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; MUNIR, B.; YAMEEN, M.; GHAFFAR, A.; SHAR, G. A.; M. TAHIR, A.; IQBAL, M. Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 1295-1309, 2018.

ABE, F. R.; MACHADO, A. L.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, D. P.; PESTANA, J. L. Life history and behavior effects of synthetic and natural dyes on Daphnia magna. **Chemosphere**, v. 236, p. 124390, 2019.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 12713. **Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda – Método de ensaio com Daphnia ssp (Crustacea, Cladocera)**. Quarta Edição, 27 p. 2016.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*).** Terceira Edição, 25 p. 2016.

ABNT, NBR. 15411-3: Aquatic Ecotoxicology-Determination of Inhibitory Effect of Aqueous Samples on the Bioluminescence of Vibrio fischeri (Luminescent Bacteria Essay). Part 3: Method Using Freeze-Dried Bacteria. 2012.

ADAMS, M.; CAMPBELL, I.; ROBERTSON, P. K.J. Novel photocatalytic reactor development for removal of hydrocarbons from water. **International Journal of Photoenergy**, v. 2008, 2008.

AGUSTINA, T. E.; ANG, H.M; VAREEK, V.K. A review of synergistic effect of photocatalysis and ozonation on wastewater treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 6, p.264–273, 2005.

AJUZIEOGU, C. A.; ODOKUMA, L. O. Comparison of the sensitivity of Crassostrea gigas and Vibrio fischeri (Microtox) for toxicity assessment of produced water. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, p. 1-10, 2018.

AJUZIEOGU, C. A.; ODOKUMA, L. O.; CHIKERE, C. B.. Toxicity assessment of produced water using Microtox Rapid Bioassay. **South Asian Journal of Research in Microbiology**, p. 1-9, 2018.

AL-GHOUTI, Mohammad A. et al. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 222-239, 2019.

ALEGBELEYE, O. O.; OPEOLU, B. O.; JACKSON, Vanessa Angela. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. **Environmental management**, v. 60, n. 4, p. 758-783, 2017.

ALEXANDROV, P. N.; POGUE, A. I.; LUKIW, Walter J. Synergism in aluminum and mercury neurotoxicity. **Integrative food, nutrition and metabolism**, v. 5, n. 3, 2018.

ALLEY, B.; BEEBE, A.; RODGERS JR, J.; CASTLE, J. W. Chemical and physical characterization of produced waters from conventional and unconventional fossil fuel resources. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 74-82, 2011.

ALMEIDA, J. **Introdução à Indústria do Petróleo**. FURG/CTI/PETROBRAS, Rio Grande, 76p, 2006

ALSALKA, Y.; KARABET, F.; HASHEM, S. Evaluation of electrochemical processes for the removal of several target aromatic hydrocarbons from petroleum contaminated water. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 3, p. 605-613, 2011.

ALZAHRANI, S.; MOHAMMAD, A.W.; HILAL, N.; ABDULLAH, P.; JAAFAR, O. Comparative study of NF and RO membranes in the treatment of produced water-Part I: assessing water quality, **Desalination**, v. 315, p. 18–26, 2013.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v.53, p. 51–59, 1999.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. **Métodos de ensaio e toxicidade com organismos aquáticos.** Em: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**, São Carlos: RiMa, 2006, p.117–152.

ARAMBOUROU, H. et al. Chironomus riparius exposure to field-collected contaminated sediments: from subcellular effect to whole-organism response. **Science of The Total Environment**, v. 671, p. 874-882, 2019.

ARMITAGE, P. D.; PINDER, L. C.; CRANSTON, P. S. (Ed.). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. Springer Science & Business Media, 2012.

AYAN, M. et al. The apoptotic effect of a high dose of toluene on liver tissue during the acute phase: an experimental study. **Toxicology and industrial health**, v. 29, n. 8, p. 728-736, 2013.

AYERS, R. C.; PARKER, M. Produced water waste management: technical report. 2001.

AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; SOARES, A. M. V. M. Effects of mercury on growth, emergence, and behavior of Chironomus riparius Meigen (Diptera: Chironomidae). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 59, n. 2, p. 216-224, 2010.

BAKKE, T.; KLUNGSØYR, J., SANNI, S., Environmental impacts of produced water and drilling waste discharges from the Norwegian offshore petroleum industry. **Marine Environmental Research**, v. 92, p. 154–169, 2013.

BALEK, V.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L.; PÉREZ-MAQUEDA, L. A.; ŠUBRT, J.; POYATO, J. Thermal behaviour of ground vermiculite. J. Therm. Anal. Calorim., v. 88, n. 3, p. 819 - 823, 2007.

BALL, A.; TRUSKEWYCZ, A. Polyaromatic hydrocarbon exposure: an ecological impact ambiguity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 7, p. 4311-4326, 2013.

BARTILOTTI, M. VIANA, T.S.; OLIVEIRA, D.P.; SANTOS, E.V.; ROJAS-MANTILLA, H.D.; SANTOS, M.C.; ZANONI, M.V.B Assessment of the improved performance of magnetite-modified vermiculite in the reduction of BTEX and metals, as well as toxicity in petroleum-produced water. **Journal of Water Process Engineering**, p. 101749, 2021.

BEATRICI, A.C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de Daphnia similis (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas.** UFRS, 2001. 18 páginas. Dissertação (bacharelado) Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BEGHELLI, Frederico Guilherme et al. Lethal and sublethal effects of metal-polluted sediments on Chironomus sancticaroli Strixino and Strixino, 1981. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 286-299, 2018.

BELEZA, S.; CAMPOS, D.; NUNES, B.; PESTANA, J. L. Ecotoxicological responses of Chironomus riparius to Eucalyptus and Alnus leaf leachates: from biochemical to life-history effects. **Ecological Indicators**, v. 106, p. 105473, 2019.

BENNETT, J.; CUBBAGE, J.; PHILLIPS, K. **Review and evaluation of Microtox test for freshwater sediments**. Washington State Department of Ecology, Environmental Investigations and Laboratory Services Program, Toxics, Compliance, and Ground Water Investigations Section, 1992.

BESSEGATO, G. G.; CARDOSO, J. C.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Combination of photoelectrocatalysis and ozonation: A novel and powerful approach applied in Acid Yellow 1 mineralization. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 180, p. 161–168, 2016

BHADJA, P.; KUNDU, R. Status of the seawater quality at few industrially important coasts of Gujarat (India) off Arabian Sea. 2012.

BLEWETT, T. A.; DELOMPRÉ, P. L.; GLOVER, C. N.; GOSS, G. G. Physical immobility as a sensitive indicator of hydraulic fracturing fluid toxicity towards Daphnia magna. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 639-643, 2018.

BLEWETT, T. A.; DELOMPRÉ, P. L.; HE, Y., FOLKERTS; E. J., FLYNN, S. L.; ALESSI, D. S.; GOSS, G. G. Sublethal and reproductive effects of acute and chronic exposure to flowback and produced water from hydraulic fracturing on the water flea Daphnia magna. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 5, p. 3032-3039, 2017a.

BLEWETT, T. A.; WEINRAUCH, A. M.; DELOMPRÉ, P. L.; GOSS, G. G. The effect of hydraulic flowback and produced water on gill morphology, oxidative stress and antioxidant response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). **Scientific reports**, v. 7, p. 46582, 2017b.

BLEWETT, T. A.; WOOD, C. M. Low salinity enhances Ni-mediated oxidative stress and sub-lethal toxicity to the green shore crab (Carcinus maenas). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 159-170, 2015.

BRAUNBECK, T.; BÖTTCHER, M.; HOLLERT, H.; KOSMEHL, T.; LAMMER, E.; LEIST, E.; RUDOLF, M.; SEITZ, N. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. **Altex**, v. 22, p.87-100, 2005.

BRAZ, F. S.; SILVA, M. R.; SILVA, F. S.; ANDRADE, S. J.; FONSECA, A. L.; KONDO, M. M. Photocatalytic degradation of ibuprofen using TiO2 and ecotoxicological assessment of degradation intermediates against Daphnia similis. **J Environ Protect**, v. 5, p. 620-626, 2014.

BREIT, G. N.; OTTON, J. K. Produced waters database. **US Geological Survey**, 2002.

BRENDEHAUG, J.; JOHNSEN, S.; BRYNE, K. H.; GJØSE, A. L.; EIDE, T. H.; AAMOT, E. Toxicity testing and chemical characterization of produced water—a preliminary study. In: **Produced water**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 245-256.

BRETAS, E. Avaliação toxicológica da água produzida de uma plataforma offshore de gás natural. **Revista Ceciliana**, v. 3, p. 50–53, 2011.

BRITO, J. F.; BESSEGATO, G. G.; VIANA, T. S.; DE OLIVEIRA, D. P.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; ZANONI, M. V. B. Combination of photoelectrocatalysis and ozonation as a good strategy for organics oxidation and decreased toxicity in oil-produced water. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 5, p. H3231-H3238, 2019

BROOKS, S. et al. Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel Mytilus edulis. **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 2, p. 327-339, 2011.

BRUSTEIN, E. et al. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. **Journal of Physiology-Paris**, v. 97, n. 1, p. 77-86, 2003.

BUENO-SILVA, M.; FISCHER, M. L. Estudo da biologia de Girardia tigrina (Girard, 1850) (Platyhelminthes: Tricladida: Paludicola): Análise do crescimento, reprodução e mortalidade em laboratório. Acta Biológica Leopoldensia, v. 27 (1), p. 11-18, 2005.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Evaluation of Daphnia similis as a test species in ecotoxicological assays. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, p.878 – 882, 2004.

BURTON, G. A.; LANDRUM, P. F. Toxicity of sediments. **Encyclopedia of sediments and sedimentary rocks**, p. 748-751, 2003.

BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T.; CARR, G. J.; CENIJN, P.; FOCHTMAN, P.; GOURMELON, A.; HUBLER, N.; KLEENSANG, A.; KNOBEL, M.; KUSSATZ, C.; LEGLER, J.; LILLICRAP, A.; MARTINEZ-JERONIMO, F.; POLLEICHTNER, C.; RZODECZKO, H.; SALINASM, E.; SCHNEIDERM, K. E.; SCHOLZ, S.; VAN DEN BRANDHOF, E-J.; VAN DER VEM, L. T. M.; WALTER-ROHDE, S.; WEIGT, S.; WITTERS, H.; HALDER, M. Validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 496-511, 2014,

BUTKOVSKYI, A.; BRUNING, H.; KOOLS, S. A.; RIJNAARTS, H. H.; VAN WEZEL, A. P. Organic pollutants in shale gas flowback and produced waters: identification, potential ecological impact, and implications for treatment strategies. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 9, p. 4740-4754, 2017.

BUTTARELLI, F. R.; PELLICANO, C.; PONTIERI, F. E. Neuropharmacology and behavior in planarians: translations to mammals. **Comparative Biochemistry**

and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 147, n. 4, p. 399-408, 2008.

CAMPOS, D.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; GOLOVKO, O.; ŽLÁBEK, V.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Toxicity of organic UV-filters to the aquatic midge Chironomus riparius. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 143, p. 210-216, 2017.

CAMPOS, D.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Responses of the aquatic midge Chironomus riparius to DEET exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 80-85, 2016.

CAMPOS, D.; SILVA, A. R. R.; LOUREIRO, S.; GRABICOVÁ, K.; STAŇOVÁ, A. V.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Two-generational effects of Benzophenone-3 on the aquatic midge Chironomus riparius. **Science of The Total Environment**, v. 669, p. 983-990, 2019.

CARDOSO, J.C.; BESSEGATO, G.G.; et al. Efficiency comparison of ozonation, photolysis, photocatalysis and photoelectrocatalysis methods in real textile wastewater decolorization. **Water Research**, v. 98, p. 39–46, 2016.

CARLS, M. G.; THEDINGA, J. F. Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. **Marine Environmental Research**, v. 69, n. 5, p. 318-325, 2010.

CARLSSON, G; NORRGREN, L.; HYLLAND, K.; TOLLEFSEN, K. E. Toxicity screening of produced water extracts in a zebrafish embryo assay. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 9-11, p. 600-615, 2014.

CHEN, J. et al. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 34, n. 6, p. 581-586, 2012.

CHIBUNDA, R. T. Chronic toxicity of mercury (HgCl2) to the benthic midge Chironomus riparius. 2009.

CLINE, J. T. Treatment and discharge of produced water for deep offshore disposal. In: **API Produced Water Management Technical Forum and Exhibition, Lafayette, LA**. p. 17-18, 1998.

CLUFF, M. A.; HARTSOCK, A.; MACRAE, J. D.; CARTER, K.,; MOUSER, P. J. Temporal changes in microbial ecology and geochemistry in produced water from hydraulically fractured Marcellus shale gas wells. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 11, p. 6508-6517, 2014.

CODAY, B. D.; XU, P.; BEAUDRY, E. G.; HERRON, J.; LAMPI, K.; HANCOCK, N.T.; CATH, T.Y. The sweet spot of forward osmosis: treatment of produced water, drilling wastewater, and other complex and difficult liquid streams. **Desalination**, v.333, p. 23–35, 2014.

CORRÊA, A. X.; TIEPO, E. N.; SOMENSI, C. A.; SPERB, R. M.; RADETSKI, C. M. Use of ozone-photocatalytic oxidation (O 3/UV/TiO 2) and biological remediation for treatment of produced water from petroleum refineries. **Journal of Environmental Engineering**, v. 136, n. 1, p. 40-45, 2010.

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, p. 1820–1830, 2008.

COUNCIL DIRECTIVE 86/609/EEC (1986) on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Commission of the European Communities. **Official Journal**, v.358, p. 1–28, 1986.

DAVID, R. M.; DAKIC, V.; WILLIAMS, T. D.; WINTER, M. J.; CHIPMAN, J. K. Transcriptional responses in neonate and adult Daphnia magna in relation to relative susceptibility to genotoxicants. **Aquatic toxicology**, v. 104, n. 3-4, p. 192-204, 2011.

DAVIS, J. G.; WASKOM R.M.; BAUDER T.A. Managing sodic soils. **Service in action; no. 0.504**, 2007.

DE GARCIA, S. O.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; IRUSTA-MATA, R. Dose–response behavior of the bacterium Vibrio fischeri exposed to pharmaceuticals and personal care products. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 1, p. 141-162, 2016.

DE LOOF, A.; HUYBRECHTS, R. “Insects do not have sex hormones”: a myth?. **General and comparative endocrinology**, v. 111, n. 3, p. 245-260, 1998.

DE-CARVALHO, P. S. M.; ZANARDI, E.; BURATINI, S. V.; LAMPARELLI, M. C.; MARTINS, M. C. Oxidizing effect on metal remobilization and Daphnia similis toxicity from a Brazilian reservoir sediment suspension. **Water Research**, v. 32, n. 1, p. 193-199, 1998.

DELL'OMO, Giacomo (Ed.). **Behavioural ecotoxicology**. John Wiley & Sons, 2002.

DELOMPRÉ, P. L. M.; BLEWETT, T. A.; GOSS, G. G.; GLOVER, C. N. Shedding light on the effects of hydraulic fracturing flowback and produced water on phototactic behavior in Daphnia magna. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 174, p. 315-323, 2019.

DENG, S.; YU, G.; JIANG, Z.; ZHANG, R.; TING, Y. P. Destabilization of oil droplets in produced water from ASP flooding. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 252, n. 2-3, p. 113-119, 2005.

DJEMIL, R. et al. Evaluation of toluene and xylene toxicity on reproductive function in male rabbits. **Advances in Environmental Biology**, v. 9, p. 104-111, 2015.

DOLAN, F. C.; CATH, T. Y.; HOGUE, T. S. Assessing the feasibility of using produced water for irrigation in Colorado. **Science Of The Total Environment**, v. 640, p. 619-628, 2018.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E.. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática-princípios e aplicações. 1ª ed. São Carlos: Editora Rima**, p. 153-184, 2006.

DÓREA, H. S. et al. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. **Microchemical journal**, v. 85, n. 2, p. 234-238, 2007.

DUMAN, O.; TUNÇ, S. Electrokinetic properties of vermiculite and expanded vermic- ulite: effects of ph, clay concentration and mono- and multivalent electrolytes. **Sep. Sci.** Technol., v. 43, p. 3755 - 3776, 2008.

DUMAN, O.; TUNÇ, S.; POLAT, T. G. Determination of adsorptive properties of ex- panded vermiculite for the removal of C. I. Basic Red 9 from aqueous solution: Kinetic, isotherm and thermodynamic studies. **Appl. Clay Sci**., v. 109 - 110, p. 22 - 32, 2015.

EHLERS, U. Phylogenetisches system der Plathelminthes. **Ver Natwiss Ver Hambg**, v. 27, p. 291-294, 1984.

EKINS, P.; VANNER, R.; FIREBRACE, J. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications. **Journal of Cleaner Production**, v. 15, n. 13-14, p. 1302-1315, 2007.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010.

ESTEVES, F. de A.; CALIMAN, A. Águas continentais: características do meio, compartimentos e suas comunidades. **Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciência**, p. 113-118, 2011.

FAKHRU'L-RAZI, A.; ALIREZA, P.; LUQMAN, C.A.; DAYANG, R.A.B; SAYED, S.M.; ZURINA, Z.A. Review of Technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v.170, p. 530–551, 2009.

FAN, Y. et al. Toxic effects of BTEX in water on Daphnia magna and Limnodrilus hoffmeisteri and safety assessment of the aquatic environment. **Acta Scientiae Circumstantiae**, v. 29, n. 7, p. 1485-1490, 2009.

FARAG, A. M.; HARPER, D. D. A review of environmental impacts of salts from produced water on aquatic resources. **International Journal of Coal Geology**, v.126, p. 157–161, 2014.

FARIA, M. S.; NOGUEIRA, A. JA; SOARES, A. M. V. M. The use of Chironomus riparius larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 2, p. 218-226, 2007.

FARMEN, E., HARMAN, C., HYLLAND, K., TOLLEFSE, K.-E. Produced water extracts from North Sea oil production platforms result in cellular oxidative stress in a rainbow trout in vitro bioassay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1092–1098, 2010.

FARRÉ, M.; FERRER, I.; GINEBREDA, A.; FIGUERAS, M.; OLIVELLA, L.; TIRAPU, L.; VILANOVA, M.; BARCELÓ, D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with Vibrio fischeri. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 187-197, 2001.

FELDMANNOVA, M. et al. Effects of N-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons on survival, reproduction, and biochemical parameters in Daphnia magna. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 21, n. 4, p. 425-431, 2006.

FERRAZ, E. R. A; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in Daphnia similis and Vibrio fischeri. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 2, p. 628-633, 2011.

FILLO, J. P.; KORAIDO, S. M.; EVANS, J. M. Sources, characteristics, and management of produced waters from natural gas production and storage operations. In: **Produced water**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 151-161.

FLYNN, S. A.; BUTLER, E. J.; VANCE, I. Produced water composition, toxicity, and fate. In: **Produced Water 2**. Springer, Boston, MA, 1996. p. 69-80.

FOLKERTS, E. J. et al. Toxicity in aquatic model species exposed to a temporal series of three different flowback and produced water samples collected from a horizontal hydraulically fractured well. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 180, p. 600-609, 2019.

FOLKERTS, E. J.; BLEWETT, T. A.; HE, Y.; GOSS, G. G. Alterations to Juvenile Zebrafish (Danio rerio) swim performance after acute embryonic exposure to sub-lethal exposures of hydraulic fracturing flowback and produced water. **Aquatic Toxicology**, v. 193, p. 50-59, 2017a.

FOLKERTS, E. J.; BLEWETT, T. A.; HE, Y.; GOSS, G. G. Cardio-respirometry disruption in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to hydraulic fracturing flowback and produced water. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1477-1487, 2017b.

FRASER, G.S.; ELLIS, J. The Canada-Newfoundland Atlantic Accord Implementation Act: Transparency of the environmental management of the offshore oil and gas industry. **Marine Policy**, v. 33, p. 312–316, 2009.

FUKUNAGA, M. T., **Estudo da Degradação de Efluentes Aquosos Derivados da Indústria Produtora de Fenol Através de Eletrólise Foto-Assistida**, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 104p. Tese (Doutorado).

GABARDO, I.T. **Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar**. Natal, Programa de Pós-Graduação em Química – CCET/UFRN, 2007, 250p. Tese (Doutorado)

GARCIA, M. B. **Extração de poluentes orgânicos e inorgânicos pela vermiculita magnética & desenvolvimento de sensor eletroquímico mip para 1-naftol presentes na água produzida de petróleo.** UNESP 2019. 76 páginas. Dissertação (bacharelado) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2019.

GATIDOU, G.; STASINAKIS, A. S.; IATROU, E. I. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using Lemna minor and Vibrio fischeri bioassays. **Chemosphere**, v. 119, p. S69-S74, 2015.

GAUTHIER, P. T. et al. Behavioural alterations from exposure to Cu, phenanthrene, and Cu-phenanthrene mixtures: linking behaviour to acute toxic mechanisms in the aquatic amphipod, Hyalella azteca. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 377-383, 2016.

GEIER, M. C. et al. Systematic developmental neurotoxicity assessment of a representative PAH Superfund mixture using zebrafish. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 354, p. 115-125, 2018.

GHIRARDINI, A. V.; GIRARDINI, M.; MARCHETTO, D.; PANTANI, C. Microtox® solid phase test: effect of diluent used in toxicity test. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 3, p. 851-861, 2009.

GIRLING, A. E. Acute and chronic toxicity of produced water from a North Sea oil production platform to the calanoid copepod Acartia tonsa. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology;(USA)**, v. 43, n. 2, 1989.

GLÖCKNER, F. O., GASOL, J. M., MCDONOUGH, N., & CALEWAERT, J. B. Marine microbial diversity and its role in ecosystem functioning and environmental change. 2012.

GOEDKOOP, W.; SPANN, N.; ÅKERBLOM, N.. Sublethal and sex-specific cypermethrin effects in toxicity tests with the midge Chironomus riparius Meigen. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 7, p. 1201-1208, 2010.

GOMES, A. P. P. **Gestão Ambiental da água produzida na Indústria de Petróleo: melhores práticas e experiências internacionais**, Rio de Janeiro, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014. 120p. Dissertação (Mestrado).

GORMLEY, K. L.; TEATHER, K. L. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (Oryzias latipes) in response to short-term exposure to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 3, p. 330-338, 2003.

GRANADEIRO, L. et al. Warfarin-exposed zebrafish embryos resembles human warfarin embryopathy in a dose and developmental-time dependent manner–From molecular mechanisms to environmental concerns. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 181, p. 559-571, 2019.

GREGORY, K. B.; VIDIC, R. D.; DZOMBAK, D. A. Water management challenges associated with the production of shale gas by hydraulic fracturing. **Elements**, v. 7, n. 3, p. 181-186, 2011.

GUERRA, K.; DAHM, K.; DUNDORF, S. **Oil and gas produced water management and beneficial use in the Western United States**. US Department of the Interior, Bureau of Reclamation, 2011.

GUTIERREZ, M. F.; PAGGI, J. C.; GAGNETEN, A. M. Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 428–438, 2012.

GWI - Global Water Intelligence, **Produced Water Market: Opportunities in the Oil, Shale and Gas Sectors in North America**, Media Analytics Ltd, 2011.

HAHN, T.; LIESS, M.; SCHULZ, R. Effects of the hormone mimetic insecticide tebufenozide on Chironomus riparius larvae in two different exposure setups. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, n. 2, p. 171-178, 2001.

HALE, S. E.; ŠKULCOVÁ, L.; PÍPAL, M.; CORNELISSEN, G.; OEN, A. M.; EEK, E.; BIELSKÁ, L. Monitoring wastewater discharge from the oil and gas industry using passive sampling and Danio rerio bioassay as complimentary tools. **Chemosphere**, v. 216, p. 404-412, 2019.

HALLARE, A. V.; KOSMEHL, T.; SCHULZE, T.; HOLLERT, H.; KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (Danio rerio) embryos. **Science of the Total Environment**, v. 347, n. 1-3, p. 254-271, 2005.

HALPERN, M.; SENDEROVICH, Y. Chironomid microbiome. **Microbial ecology**, v. 70, n. 1, p. 1-8, 2015.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 7, p. 714–719, 1977.

HAN, Zhao-Xiang; WANG, Jia-Hong. Interactive effects of heavy metals and BaP on AChE activity of polychaete Perinereis aibuhitensis. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 183-188, 2009.

HANNIGAN, John H.; BOWEN, Scott E. Reproductive toxicology and teratology of abused toluene. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 56, n. 2, p. 184-200, 2010.

HANSEN, B. H. et al. Embryonic exposure to produced water can cause cardiac toxicity and deformations in Atlantic cod (Gadus morhua) and haddock (Melanogrammus aeglefinus) larvae. **Marine environmental research**, v. 148, p. 81-86, 2019.

HARMEL, V.C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais.** Universidade Regional de Blumenau**,** 2004. 100 páginas. Tese (mestrado). Programa de pós graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

HAVENS, K. E.; BEAVER, J. R. Body size versus taxonomy in relating zooplankton to water quality in lakes. **Inland Waters**, v. 1, n. 2, p. 107-112, 2011.

HAVENS, Karl E. et al. Temperature effects on body size of freshwater crustacean zooplankton from Greenland to the tropics. **Hydrobiologia**, v. 743, n. 1, p. 27-35, 2015.

HE, Y. et al. Chemical and toxicological characterizations of hydraulic fracturing flowback and produced water. **Water research**, v. 114, p. 78-87, 2017.

HE, Y.; FOLKERTS, E. J.; ZHANG, Y.; MARTIN, J. W.; ALESSI, D. S.; GOSS, G. G. Effects on biotransformation, oxidative stress, and endocrine disruption in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to hydraulic fracturing flowback and produced water. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 2, p. 940-947, 2017.

HE, Y.; SUN, C.; ZHANG, Y.; FOLKERTS, E. J.; MARTIN, J. W.; GOSS, G. G.Developmental toxicity of the organic fraction from hydraulic fracturing flowback and produced waters to early life stages of zebrafish (Danio rerio). **Environmental science & technology**, v. 52, n. 6, p. 3820-3830, 2018.

HEINLAAN, M.; IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIER, H. C., & KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308-1316, 2008.

HENDERSON, S. B.; GRIGSON, S. J. W.; JOHNSON, P.; RODDIE, B. D. Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 1141-1151, 1999.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, p. 6–19, 2005.

HOLDWAY, D. A. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperate and tropical marine ecological processes. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p. 185–203, 2002.

HOLKER, F.; STIEF, P. Adaptive behaviour of chironomid larvae (Chironomus riparius) in response to chemical stimuli from predators and resource density. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 58, n. 3, p. 256-263, 2005.

HORNG, C. Y.; LIN, H. C.; LEE, Wenjau. A reproductive toxicology study of phenanthrene in medaka (Oryzias latipes). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 1, p. 131-139, 2010.

HOWE, K. et al.The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.

IGUNNU, E. T.; CHEN, G. Z. Produced water treatment technologies. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 9, n. 3, p. 157-177, 2014.

INGERSOLL, Christopher G. Sediment tests. **Fundamentals of aquatic toxicology**, v. 2, p. 231-255, 1995.

INOUE, T; KUMAMOTO, H.; OKAMOTO, K.; UMESONO, Y.; SAKAI, M.; ALVARADO, A. S.; AGATA, K. Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration. **Zoological science**, v. 21, n. 3, p. 275-284, 2004

INOUE, T.; HOSHINO, H.; YAMASHITA, T.; SHIMOYAMA, S.; AGATA, K. Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function. **Zoological letters**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2015.

IRONS, T. D.; KELLY, P. E.; HUNTER, D. L.; MACPHAIL, R. C.; PADILLA, S. Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 792-813, 2013

JAIKUMAR, G.; BRUN, N. R.; VIJVER, M. G.; BOSKER, T. Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 638-646, 2019.

JARAMILLO-GUTIÉRREZ, M. I.; RIVERO, E. P., CRUZ-DÍAZ, M. R., NIÑO-GÓMEZ, M. E., & PEDRAZA-AVELLA, J. A. Photoelectrocatalytic hydrogen production from oilfield-produced wastewater in a filter-press reactor using TiO2-based photoanodes. **Catalysis Today**, v. 266, p. 17-26, 2016.

JEONG, S. W.; LEE, S. M.; YUM, S. S.; IGUCHI, T.; SEO, Y. R. Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in Daphnia magna in terms of reproductive activity. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 149-158, 2013.

JIMÉNEZ, S.; MICÓ, M. M.; ARNALDOS, M.; MEDINA, F.; CONTRERAS, S. State of the art of produced water treatment. **Chemosphere**, v. 192, p. 186-208, 2018.

JOHNSEN, S.; RØE UTVIK, T. I., GARLAND, E., DE VALS, B., & CAMPBELL, J. Environmental fate and effect of contaminants in produced water. In: **SPE International Conference on Health, Safety, and Environment in Oil and Gas Exploration and Production**. Society of Petroleum Engineers, 2004.

JOHNSON, B. M.; KANAGY, L. E.; RODGERS JR, J. H.; CASTLE, J. W. Feasibility of a pilot-scale hybrid constructed wetland treatment system for simulated natural gas storage produced waters. **Environmental Geosciences**, v. 15, n. 3, p. 91-104, 2008.

KAPU, M. M.; SCHAEFFER, D. J. Planarians in toxicology. Responses of asexualDugesia dorotocephala to selected metals. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 47, n. 2, p. 302-307, 1991.

KARPOWICZ, M.; SŁUGOCKI, Ł.; KOZŁOWSKA, J.; OCHOCKA, A.; LÓPEZ, C. Body size of Daphnia cucullata as an indicator of the ecological status of temperate lakes. **Ecological Indicators**, v. 117, p. 106585, 2020.

KAWAKATSU, M.; HAUSER, J.; FRIEDRICH, S. M. G. The freshwater planaria from South Brazil. **Bull. Natnl. Sci. Mus. Ser. A (Zoology)**, v. 2, p. 205-223, 1976.

KHALED, I. et al. Impact of oil-related environmental pollutants on the ovary structure in the freshwater leech Erpobdella johanssoni (Johansson, 1927)(Clitellata: Hirudinea). **The European Zoological Journal**, v. 84, n. 1, p. 286-293, 2017.

KHAN, N. A.; ENGLE, M.; DUNGAN, B.; HOLGUIN, F. O.; XU, P.; CARROLL, K. C. Volatile-organic molecular characterization of shale-oil produced water from the Permian Basin. **Chemosphere**, v. 148, p. 126-136, 2016.

KIM, J. Y.; KIM, S. J.; BAE, M. A.; KIM, J. R.; CHO, K. H. Cadmium exposure exacerbates severe hyperlipidemia and fatty liver changes in zebrafish via impairment of high-density lipoproteins functionality. **Toxicology in Vitro**, v. 47, p. 249-258, 2018.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253–310, 1995.

KNAKIEVICZ, T.; FERREIRA, H. B. Evaluation of copper effects upon Girardia tigrina freshwater planarians based on a set of biomarkers. **Chemosphere**, v. 71, n. 3, p. 419-428, 2008.

KOROSI, J. B.; PATERSON, A. M.; DESELLAS, A. M.; SMOL, J. P. Linking mean body size of pelagic Cladocera to environmental variables in Precambrian Shield lakes: a paleolimnological approach. **Journal of Limnology**, v. 67, n. 1, p. 22-34, 2008.

KRAEPIEL, A. M. L.; KELLER, K.; MOREL, F. M. M. A model for metal adsorption on montmorillonite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 210, n. 1, p. 43-54, 1999.

KUBALLA, A. V.; HOLTON, T. A.; PATERSON, B.; ELIZUR, A. Moult cycle specific differential gene expression profiling of the crab Portunus pelagicus. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 147, 2011.

KUHLMANN, M. L.; JOHNSCHER-FORNASARO, G.; OGURA, L. L.; IMBIMBO, H. Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo. **São Paulo: CETESB**, 2012.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.,; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LANA, C. C.; CARVALHO, I. S. Cretaceous conchostracans from Potiguar Basin (northeast Brazil): relationships with West African conchostracan faunas and palaeoecological inferences. **Cretaceous Research**, v. 23, n. 3, p. 351-362, 2002.

LEE, H.Y.; INSELMAN, A.L.; KANUNGO, J.; HANSEN. D.K. Alternative models in developmental toxicology. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v 58, p. 10–22, 2012.

LEPREVOST, A.; SIRE, J.-Y. Architecture, mineralization and development of the axial skeleton in Acipenseriformes, and occurrences of axial anomalies in rearing conditions; can current knowledge in teleost fish help?. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, n. 4, p. 767-776, 2014.

LI, G., AN, T.; CHEN, J.; SHENG, G.; FU, J.; CHEN, F.; Zhang S.; Zhao, H. Photoelectrocatalytic decontamination of oilfield produced wastewater containing refractory organic pollutants in the presence of high concentration of chloride ions. **Journal of hazardous materials**, v. 138, n. 2, p. 392-400, 2006.

LI, J. et al. Mercury bioaccumulation in the food web of Three Gorges Reservoir (China): Tempo-spatial patterns and effect of reservoir management. **Science of the Total Environment**, v. 527, p. 203-210, 2015.

LI, J.; LIANG, Y.; VZHANG, X.; LU, J.; ZHANG, J.; RUAN, T.; ZHOU, Q.; JIANG, G. Impaired gas bladder inflation in zebrafish exposed to a novel heterocyclic brominated flame retardant tris (2, 3-dibromopropyl) isocyanurate. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 22, p. 9750-9757, 2011.

LI, X. et al. Joint action and lethal levels of toluene, ethylbenzene, and xylene on midge (Chironomus plumosus) larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 957-966, 2014.

LILLEY, T. M.; RUOKOLAINEN, L.; PIKKARAINEN, A.; LAINE, V. N.; KILPIMAA, J.; RANTALA, M. J.; NIKINMAA, M. Impact of tributyltin on immune response and life history traits of Chironomus riparius: single and multigeneration effects and recovery from pollution. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 13, p. 7382-7389, 2012.

LIN, C-C. et al. Exposure to multiple low-level chemicals in relation to reproductive hormones in premenopausal women involved in liquid crystal display manufacture. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 4, p. 1406-1417, 2013.

LIU, M. C., CHEN, C. M., CHENG, H. Y., CHEN, H. Y., SU, Y. C., & HUNG, T. Y. Toxicity of different industrial effluents in Taiwan: a comparison of the sensitivity of Daphnia similis and Microtox®. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 17, n. 2, p. 93-97, 2002.

LIU, Y. et al. Food up-take and reproduction performance of Daphnia magna under the exposure of Bisphenols. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 47-54, 2019.

LÓPEZ, A. M. C.; SARMENTO, R. A.; DE SOUZA SARAIVA, A.; PEREIRA, R. R.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Exposure to Roundup® affects behaviour, head regeneration and reproduction of the freshwater planarian Girardia tigrina. **Science of The Total Environment**, v. 675, p. 453-461, 2019.

LU, Zhao-Guang et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (Danio rerio) embryos/larvae. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 33-41, 2014.

LYNCH, M. Fitness and optimal body size in zooplankton population. **Ecology**, p. 763-774, 1977.

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

MALANDRINO, M.; ABOLLINO, O.; GIACOMINO, A.; ACETO, M.; MENTASTI, E. Adsorption of heavy metals on vermiculite: influence of pH and organic ligands. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, n. 2, p. 537-546, 2006.

MANFRA, L. et al. Metal content and toxicity of produced formation water (PFW): study of the possible effects of the discharge on marine environment. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 53, n. 2, p. 183-190, 2007.

MANFRA, L. et al. Toxicity evaluation of produced formation waters after filtration treatment. **Natural Science**, v. 2, n. 01, p. 33, 2010.

MANTELL, M. E. Produced water reuse and recycling challenges and opportunities across major shale plays. In: **EPA hydraulic fracturing study technical workshop**. 2011.

MASCOLO, M., PEI, Y.; RING, T. Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. **Materials**, v. 6, p. 5549 - 5567, 2013.

MCCOLLUM, C. W.; DUCHARME, N. A.; BONDESSON, M.; GUSTAFSSON, J. A.; Developmental toxicity screening in zebrafish. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, p. 67–114, 2011.

MCGRATH, P.; LI, C.-Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug discovery today**, v. 13, p. 394–401, 2008.

MCINTOSH, J. C.; WALTER, L. M. Volumetrically significant recharge of Pleistocene glacial meltwaters into epicratonic basins: Constraints imposed by solute mass balances. **Chemical Geology**, v. 222, n. 3-4, p. 292-309, 2005.

MCINTOSH, J. C.; WALTER, L. M.; MARTINI, A. M. Pleistocene recharge to midcontinent basins: effects on salinity structure and microbial gas generation. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 66, n. 10, p. 1681-1700, 2002.

MCLAUGHLIN, M. C. et al. Mutagenicity assessment downstream of oil and gas produced water discharges intended for agricultural beneficial reuse. **Science of The Total Environment**, v. 715, p. 136944, 2020.

MEADOR, J. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Encyclopedia of Ecology. **Encyclopedia of Ecology, 4, 2881-2891. Oxford: Elsevier**, 2008.

MEIER, S. et al. Effects of alkylphenols on the reproductive system of Atlantic cod (Gadus morhua). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 2, p. 207-218, 2007.

MERCIER, L.; DETELLIER, Christian. Preparation, characterization, and applications as heavy metals sorbents of covalently grafted thiol functionalities on the interlamellar surface of montmorillonite. **Environmental science & technology**, v. 29, n. 5, p. 1318-1323, 1995.

MONDAL, S.; WICKRAMASINGHE, S.R. Produced water treatment by nanofiltration and reverse osmosis membranes. **J. Membrane Science,** v.322, p. 162–170, 2008.

MONTEIRO, C. A. S.; JERÔNIMO, C. E. M. Correlação dos aspectos e impactos ambientais à legislação para as atividades de exploração de petróleo on shore no RN. **Scientia Plena**, v. 8, p. 1–13, 2012.

MOUZDAHIR, Y., ELMCHAOURI, A., MAHBOUB, R., GIL, A.; KORILI, S. A. Synthesis of nano-layered vermiculite of low density by thermal treatment. **Powder Technol.**, v. 189, n. 1, p. 2 – 5, 2009.

MURRAY-GULDE, C., HEATLEY, J.E., KARANFIL, T., RODGERS, J.H., MYERS, J.E. Performance of a hybrid reverse-osmosis constructed wet-land treatment system for brackish oil field produced water. **Water Research**, v. 37, p. 705–711, 2003.

MYSORE, D.; VIRARAGHAVAN, T.; JIN, Y. Treatment of oily waters using vermiculite. **Water Res.**, v. 39, p. 2643 - 2653, 2005.

NAGEL, R. DarT: the embryo test with the zebrafish Danio rerio — a general model in ecotoxicology and toxicology. **ALTEX**, v.19, p. 38–48, 2002.

NAKAYAMA, K.; OSHIMA, Y.; NAGAFUCHI, K.; HANO, T.; SHIMASAKI, Y.; HONJO, T. Early–life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, Oryzias latipes, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 24, n. 3, p. 591-596, 2005.

NASCIMENTO, M. K. S. et al. Toxicity of a mixture of monoaromatic hydrocarbons (BTX) to a tropical marine microcrustacean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 156, p. 111272, 2020.

NASIRI, M.; JAFARI, I. Produced water from oil-gas plants: A short review on challenges and opportunities. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 61, n. 2, p. 73-81, 2017.

NASIRI, M.; JAFARI, I.; PARNIANKHOY, B.. Oil and gas produced water management: a review of treatment technologies, challenges, and opportunities. **Chemical engineering communications**, v. 204, n. 8, p. 990-1005, 2017.

NAWROCKI, J.; KASPRZYK-HORDERN, B. The efficiency and mechanisms of catalytic ozonation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 99, p. 27–42, 2010.

NEFF, J. M.; SAUER, T. C.; HART, A. D. Monitoring Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Bioavailability Near Offshore Produced Water Discharges. In: **Environmental Toxicology and Risk Assessment: Science, Policy, and Standardization—Implications for Environmental Decisions: Tenth Volume**. ASTM International, 2000.

NEFF, J.; LEE, K.; DEBLOIS, E. M. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects. **Produced Water: Environmental Risks and Advances in Mitigation Technologies**, p. 3–54, 2011.

NEFF, J.; SAUER, T. C.; HART, A. D. Bioaccumulation of hydrocarbons from produced water discharged to offshore waters of the US Gulf of Mexico. In: **Produced Water**. Springer, New York, NY, 2011. p. 441-477.

NEUPARTH, T. et al. Toxicity effects of hazardous and noxious substances (HNS) to marine organisms: acute and chronic toxicity of p-xylene to the amphipod Gammarus locusta. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 20, p. 1210-1221, 2014.

NOREÑA, C.; DAMBORENEA, C.; BRUSA, F. Phylum Platyhelminthes. In: **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**. Academic Press, 2015. p. 181-203.

OECD, 1997. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the final ring test of the Daphnia magna reproduction test organization. General Distribution OCDE**/**GD, v.19, p. 1-190, 1997.

OECD, 2012. OECD *Guideline for Testing Chemicals*. Test n.o 211: *Daphnia magna reproduction test. Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD Publishing.

OECD, 2013. *OECD Guideline for Testing Chemicals. Test n.º 236: fish embryo acute toxicity (FET) test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Publishing.

OECD. Test no. 218: Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. In: Publishing O, editor. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, 2004.

OFOEGBU, P. U.; LOURENÇO, J.; MENDO, S.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Effects of low concentrations of psychiatric drugs (carbamazepine and fluoxetine) on the freshwater planarian, Schmidtea mediterranea. **Chemosphere**, v. 217, p. 542-549, 2019.

OFOEGBU, P. U.; SIMÃO, F. C.; CRUZ, A.; MENDO, S.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Toxicity of tributyltin (TBT) to the freshwater planarian Schmidtea mediterranea. **Chemosphere**, v. 148, p. 61-67, 2016.

OGP (INTERNATIONAL ASSOCIATION OF OIL AND GAS PRODUCERS). Aromatics in produced water: Occurrence, fate and effects and treatment. **Report No.**, v. 1, n. 20/324, 2002.

OGP. Offshore environmental monitoring for the oil and gas industry. **International Association of Oil and Gas Producers**, Report n. 457, 32p, 2012

OREM, William et al. Organic substances in produced and formation water from unconventional natural gas extraction in coal and shale. **International Journal of Coal Geology**, v. 126, p. 20-31, 2014.

OSUGI, M. E.; UMBUZEIRO, G. A.; ANDERSON, M. A.; ZANONI, M. V. B. Degradation of matallophtalocyanine dye by combined processes of electrochemistry and photoelectrochemistry. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 5261–5269, 2005.

OTTON, J. K. **Environmental aspects of produced-water salt releases in onshore and coastal petroleum-producing areas of the conterminous US-a bibliography**. US Geological Survey, 2006.

OVIEDO, N. J.; NICOLAS, C. L.; ADAMS, D. S.; LEVIN, M. Establishing and maintaining a colony of planarians. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2008, n. 10, p. pdb. prot5053, 2008.

OZGUN, H. et al. Effects of the pre-treatment alternatives on the treatment of oil-gas field produced water by nanofiltration and reverse osmosis membranes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 8, p. 1576-1583, 2013.

PAGÁN, O. R.; COUDRON, T.; KANERIA, T. The flatworm planaria as a toxicology and behavioral pharmacology animal model in undergraduate research experiences. **Journal of Undergraduate Neuroscience Education**, v. 7, n. 2, p. A48, 2009.

PANTER, G. H; HUTCHINSON, T. H.; HURD, K. S.; BAMFORTH, J.; STANLEY, R. D.; DUFFELL, S.; HARGREAVES, A.; GIMENO, S.; TYLER, C. R. Development of chronic tests for endocrine active chemicals: Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas). **Aquatic toxicology**, v. 77, n. 3, p. 279-290, 2006.

PARK, K.; BANG, H. W.; PARK, J.; KWAK, I. S. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to Chironomus riparius larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 359-367, 2009.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C,; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (Vibrio fischeri) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment international**, v. 32, n. 2, p. 265-268, 2006.

PENG, C. et al. Toxic effects of individual and combined effects of BTEX on Euglena gracilis. **Journal of hazardous materials**, v. 284, p. 10-18, 2015.

PEREZ-RODRIGUEZ, V.; WU, N.; DE LA COVA, A.; SCHMIDT, J.; DENSLOW, N. D.; MARTYNIUK, C. J. The organochlorine pesticide toxaphene reduces non-

mitochondrial respiration and induces heat shock protein 70 expression in early-staged zebrafish (Danio rerio). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 228, p. 108669, 2020.

PÉRY, A. R.; MONS, R.; FLAMMARION, P.; LAGADIC, L.; GARRIC, J. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge Chironomus riparius. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 21, n. 11, p. 2507-2513, 2002.

PESTANA, J. L.; LOUREIRO, S.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, Daphnia magna Straus. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 241-248, 2010.

PIROTTE, N. et al. Reactive oxygen species in planarian regeneration: an upstream necessity for correct patterning and brain formation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 422-426, 2007.

PREZA, D. L.; SMITH, Donald H. Use of newborn Girardia tigrina (Girard, 1850) in acute toxicity tests. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 50, n. 1, p. 1-3, 2001.

PU, Shi-Ya et al. Effects of phthalate acid esters on zebrafish larvae: Development and skeletal morphogenesis. **Chemosphere**, v. 246, p. 125808, 2020.

RAFFA, R. B.; HOLLAND, L. J.; SCHULINGKAMP, R. J. Quantitative assessment of dopamine D2 antagonist activity using invertebrate (Planaria) locomotion as a functional endpoint. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 45, n. 3, p. 223-226, 2001.

RAFFA, R. B.; VALDEZ, J. M. Cocaine withdrawal in Planaria. **European journal of pharmacology**, v. 430, n. 1, p. 143-145, 2001.

RAMAKRISHNAN, L.; DESAER, C. Carbamazepine inhibits distinct chemoconvulsant-induced seizure-like activity in Dugesia tigrina. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 4, p. 665-670, 2011.

RAMALHO, A. M. Z.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; SILVA, D. R. Application of electrochemical technology for removing petroleum hydrocarbons from produced water using a DSA-type anode at different flow rates. **Fuel**, v. 89, n. 2, p. 531-534, 2010.

RANKE, J.; MOLTER, K.; STOCK, F; BOTTIN-WEBER, U; POCZOBUTT, J; HOFFMANN, J; ONDRUSCHKA, B; FILSER, J.; JASTORFF, B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute Vibrio fischeri and WST-1 cell viability assays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 58, n. 3, p. 396-404, 2004.

REDDIEN, P. W.; ALVARADO, A. S. Fundamentals of planarian regeneration. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 725-757, 2004.

RIBEIRO, A. R. Potencial do uso de planárias na avaliação de contaminantes ambientais. Campinas, Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, 2012. 88p. Dissertação (Mestrado)

RIDDIFORD, L. M.; CHERBAS, P.; TRUMAN, James W. Ecdysone receptors and their biological actions. 2000.

RINK, J. C. Stem cell systems and regeneration in planaria. **Development genes and evolution**, v. 223, n. 1-2, p. 67-84, 2013.

RISTOLA, T.; PARKER, D.; KUKKONEN, J. V. K. Life-cycle effects of sediment-associated 2, 4, 5-trichlorophenol on two groups of the midge Chironomus riparius with different exposure histories. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 8, p. 1772-1777, 2001.

ROCHA, J. H. B.; GOMES, M. M. S.; FERNANDES, N. S.; SILVA, D. R.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Application of electrochemical oxidation as alternative treatment of produced water generated by Brazilian petrochemical industry**. Fuel Processing Technology**, v. 96, p. 80–87, 2012

RODRIGUES, A. C. M. et al. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on Chironomus riparius. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 506-513, 2015b.

RODRIGUES, A. C.; GRAVATO, C.; QUINTANEIRO, C.; BARATA, C.; SOARES, A. M.; PESTANA, J. L. Sub-lethal toxicity of environmentally relevant concentrations of esfenvalerate to Chironomus riparius. **Environmental pollution**, v. 207, p. 273-279, 2015a.

ROSADO, D.; USERO, J.; MORILLO, J. Assessment of heavy metals bioavailability and toxicity toward Vibrio fischeri in sediment of the Huelva estuary. **Chemosphere**, v. 153, p. 10-17, 2016.

ROSEN, G.; MILLER, K. A postexposure feeding assay using the marine polychaete Neanthes arenaceodentata suitable for laboratory and in situ exposures. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 30, n. 3, p. 730-737, 2011.

RUBY, E. G.; MCFALL-NGAI, M. J. Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by Vibrio fischeri. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 10, p. 414-420, 1999.

RUBY, E. G.; NEALSON, K. H. Symbiotic association of Photobacterium fischeri with the marine luminous fish Monocentris japonica: a model of symbiosis based on bacterial studies. **The Biological bulletin**, v. 151, n. 3, p. 574-586, 1976.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. 238 pp. London: Methuen, 1959.

SAINT-AMANT, Louis; DRAPEAU, Pierre. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. **Journal of neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 622-632, 1998.

SANTOS, I. D.; DEZOTTI, M.; DUTRA, A. J. B. Electrochemical treatment of effluents from petroleum industry using a Ti/RuO2 anode. **Chemical engineering journal**, v. 226, p. 293-299, 2013.

SARAIVA, A. S.; SARMENTO, R. A.; GOLOVKO, O.; RANDAK, T.; PESTANA, J. L.; SOARES, A. M. Lethal and sub-lethal effects of cyproconazole on freshwater organisms: a case study with Chironomus riparius and Dugesia tigrina. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 12169-12176, 2018

SARMA, S. S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 41, p. 1417–1430, 2006.

SARTY, K. I.; COWIE, A.; MARTYNIUK, C. J. The legacy pesticide dieldrin acts as a teratogen and alters the expression of dopamine transporter and dopamine receptor 2a in zebrafish (Danio rerio) embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 194, p. 37-47, 2017.

SASAKI, Gen-yu. Planarians found in tanks for tropical fishes in Japan. < http://www2u.biglobe.ne.jp/~gen-yu/tankpla_e.pdf> Acesso em 08 abril de 2020.

SAUER, T. C.; COSTA, H. J.; BROWN, J. S.; WARD, T. J. Toxicity identification evaluations of produced-water effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 16, n. 10, p. 2020-2028, 1997.

SCHMEICHEL, J. **Effects of Produced Water and Production Chemical Additives on Marine Environments: A Toxicological Review**. 2017.

SCHMITT, C.; OETKEN, M.; DITTBERNER, O.; WAGNER, M.; OEHLMANN, J. Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates Potamopyrgus antipodarum and Lumbriculus variegatus. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 2, p. 322-329, 2008.

SCHOCKAERT, E. R.; HOOGE, M.; SLUYS, R.; SCHILLING, S.; TYLER, S.; ARTOIS, T. Global diversity of free living flatworms (Platyhelminthes,"Turbellaria") in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 41-48, 2008.

SCHOLZ, S. Zebrafish embryos as an alternative model for screening of drug-induced organ toxicity. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 5, p. 767-769, 2013.

SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

SERRA, S. R. Q. et al. Synthesising the trait information of European Chironomidae (Insecta: Diptera): Towards a new database. **Ecological indicators**, v. 61, p. 282-292, 2016.

SHEIMAN, I. M.; KRESHCHENKO, N. D. Regeneration of planarians: experimental object. **Russian journal of developmental biology**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2015.

SHEPHERD, M. C.; SHORE, F. L.; MERTENS, S. K.; GIBSON, J. S. Characterization of produced waters from natural gas production and storage operations: regulatory analysis of a complex matrix. In: **Produced Water**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 163-173.

SIBLEY, P. K.; ANKLEY, G. T.; BENOIT, D. A. Factors affecting reproduction and the importance of adult size on reproductive output of the midge Chironomus tentans. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 6, p. 1296-1303, 2001.

SILVA, C. et al. Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo (a) pyrene in the common prawn Palaemon serratus. **Marine environmental research**, v. 90, p. 39-46, 2013.

SILVA, C. J.; SILVA, A. L. P.; GRAVATO, C.; PESTANA, J. L. Ingestion of small-sized and irregularly shaped polyethylene microplastics affect Chironomus riparius life-history traits. **Science of The Total Environment**, v. 672, p. 862-868, 2019.

SIMÃO, F. C. P. et al. Toxicity of different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to the freshwater planarian Girardia tigrina. **Environmental Pollution**, p. 115185, 2020.

SINGH, A. K. et al. Hazard assessment of metals in invasive fish species of the Yamuna River, India in relation to bioaccumulation factor and exposure concentration for human health implications. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 6, p. 3823-3836, 2014.

SIPES, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B.; Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, p. 256–267, 2011.

SIROTKIN, Alexander V. et al. Influence of petrochemical industry environmental contaminants on animal ovarian cells. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 6, p. 517-525, 2012.

SISINNO, C. L. S.; MOREIRA, J. C. Dinâmica, Transformação e destino de contaminantes no ambiente. SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Princípios de toxicologia ambiental. In: **Princípios de toxicologia ambiental**. 2013. p. 198-198.

SNYDER, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 529-547, 2000.

SOTERO-SANTOS, R. B.; ROCHA, O.; POVINELLI, J. Evaluation of water treatment sludges toxicity using the Daphnia bioassay. **Water Research**, v. 39, n. 16, p. 3909-3917, 2005.

SOUZA, E. D. **Análise de Corrosão por meio de Perda de Massa e Espessura em Aços pela ação da Água Produzida de Poços Petrolíferos,** São Cristóvão, Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Sergipe, 2010. 143p. Dissertação (Mestrado).

STANAWAY, D. et al. Persistent metal contamination limits lotic ecosystem heterotrophic metabolism after more than 100 years of exposure: a novel application of the resazurin resorufin smart tracer. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 18, p. 9862-9871, 2012.

STRÄHLE, Uwe et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 128-132, 2012.

STRINGER, C. E. The means of locomotion in planarians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 3, n. 12, p. 691, 1917.

SUNDT, R. C.; BJÖRKBLOM, C.. Effects of produced water on reproductive parameters in prespawning Atlantic cod (Gadus morhua). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 74, n. 7-9, p. 543-554, 2011.

SUTER-EICHENBERGER, Regina et al. Bioaccumulation of musk xylene (MX) in developing and adult rats of both sexes. **Chemosphere**, v. 36, n. 13, p. 2747-2762, 1998.

TAENZLER, V.; BRUNS, E.; DORGERLOH, M.; PFEIFLE, V.; WELTJE, L. Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 221-230, 2007.

TALBOT, J.; SCHÖTZ, E. M. Quantitative characterization of planarian wild-type behavior as a platform for screening locomotion phenotypes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 7, p. 1063-1067, 2011.

TATARAZAKO, N.; ODA, S. The water flea Daphnia magna (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 197-203, 2007.

THOMAS, J. E.; TRIGGIA, A. A.; CORREIA, C. A.; FILHO-VEROTTI, C.; XAVIER, J. A. D.; MACHADO, J. C. V.; FILHO-SOUZA, J. E.; PAULA, J. L.; ROSSI, N. C. M.; PITOMBO, N. E. S.; GOUVEA, P. C. V. M.; CARVALHO, R. S.; BARRAGAN, R. V. **Fundamentos de engenharia de petróleo** – Rio de Janeiro, RJ: Interciência: Petrobras, 2001.

TIBBETTS, P. J. C.; BUCHANAN, I. T.; GAWEL, L. J.; LARGE, R. A comprehensive determination of produced water composition. In: **Produced water**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 97-112.

TODD, Nancy E.; VAN LEEUWEN, Maryke. Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (Danio rerio). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 2, p. 267-272, 2002.

UGARTE, José Fernandes de Oliveira; MONTE, Marisa Bezerra de Mello. Estudo da vermiculita como adsorvente de óleo e metal pesado. 2005.

United States Environmental Protection Agency (USEPA), EPA Office of Compliance Sector Notebook: Project Profile of the Oil and Gas Extraction Industry, Office of Enforcement and Compliance Assurance, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2000, pp. 1–147.

UTVIK, Toril I. Røe. Chemical characterisation of produced water from four offshore oil production platforms in the North Sea. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2593-2606, 1999.

VALKOV, M.; SIMHA, G. Vermiculite: structural properties and examples of the use. In: **Clay minerals in nature:** their characterization, modification and application. VALAS- KOVA, M. (ed.). London: Intech, 2012. Ch. 11, p.209 – 238.

VEIL, J. A.; PUDER, M. V.; ELCOCK, D.; REDWEIK Jr. R. J. **A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas and coal bed methane***.* Argonne National Laboratory/US Department of Energy, 2004, 87p.

VEIL, J. US produced water volumes and management practices in 2012. **Groundwater Protection Council**, 2015.

VENÂNCIO, C.; RIBEIRO, R.; LOPES, I. Active emigration from climate change-caused seawater intrusion into freshwater habitats. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113805, 2020.

VENTURA, S. P., E SILVA, F. A., GONÇALVES, A. M., PEREIRA, J. L., GONÇALVES, F., & COUTINHO, J. A. Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to Vibrio fischeri marine bacteria. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 102, p. 48-54, 2014.

VERRHIEST, G.; CLEMENT, B.; BLAKE, G. Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. **Ecotoxicology**, v. 10, n. 6, p. 363-372, 2001.

VILA-FARRÉ, M.; RINK, J. C. The ecology of freshwater planarians. In: **Planarian Regeneration**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 173-205.

VYAS, C. A.; RAWLS, S. M.; RAFFA, R. B.; SHACKMAN, J. G. Glutamate and aspartate measurements in individual planaria by rapid capillary electrophoresis. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 63, n. 1, p. 119-122, 2011.

WALKER, J. B. et al. Maternal and umbilical cord blood levels of mercury, lead, cadmium, and essential trace elements in Arctic Canada. **Environmental Research**, v. 100, n. 3, p. 295-318, 2006.

WAN, Yi et al. Levels, tissue distribution, and age-related accumulation of synthetic musk fragrances in Chinese sturgeon (Acipenser sinensis): Comparison to organochlorines. **Environmental science & technology**, v. 41, n. 2, p. 424-430, 2007.

WANDERA, D.; WICKRAMASINGHE, S.R; HUSSON, S.M. Modification and characterization of ultrafiltration membranes for treatment of produced water. **Journal of Membrane Science**, v.373, p. 178–188, 2011.

WANG, Xuechun et al. Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish. **Aquatic toxicology**, v. 142, p. 104-113, 2013.

WARNER, Nathaniel Richard et al. New tracers identify hydraulic fracturing fluids and accidental releases from oil and gas operations. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 21, p. 12552-12560, 2014.

WATTS, M. M.; PASCOE, D. Use of the freshwater macroinvertebrate Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae) in the assessment of sediment toxicity. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 7-8, p. 101, 1996.

WATTS, M. M.; PASCOE, D.; CARROLL, K. Chronic exposure to 17α-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae). **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 1-2, p. 113-124, 2001.

WEBB, Ellen et al. Developmental and reproductive effects of chemicals associated with unconventional oil and natural gas operations. **Reviews on Environmental Health**, v. 29, n. 4, p. 307-318, 2014.

WOLFE, Marti F.; SCHWARZBACH, Steven; SULAIMAN, Rini A. Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 17, n. 2, p. 146-160, 1998.

WU, H. P. P.; PERSINGER, M. A. Increased mobility and stem-cell proliferation rate in Dugesia tigrina induced by 880 nm light emitting diode. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 102, n. 2, p. 156-160, 2011.

WU, J. P.; LI, M. H. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: Advantages and potential. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 45-56, 2018.

XIA, L.; ZHENG, L.; ZHOU, J. L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (Danio rerio). **Chemosphere**, v. 182, p. 416-425, 2017.

XIE, Z.; TANG, J.; WU, X.; FAN, S.; CHENG, H., LI, X.; HUA, R. Bioconcentration and ecotoxicity of sulfadiazine in the aquatic midge Chironomus riparius. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 66, p. 69-74, 2019.

XYLEM. Water Use in Oil and Gas INTRODUCTION: TRENDS IN OIL AND GAS PRODUCTION GLOBALLY, 2015

YANG, L.; HO, N.Y.; ALSHUT, R.; LEGRADI, J.; WEISS, C.; REISCHL, M.; MIKUT, R.; LIEBEL, U.; MULLER, F.; STRAHLE, U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals**. Reproductive Toxicology**, v 28, p. 245–253, 2009.

YEUNG, C. W.; LAW, B. A.; MILLIGAN, T. G.; LEE, K.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and sediments from an offshore oil and gas production platform. **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 10, p. 2095-2105, 2011.

YUAN, S. et al. Effects of triphenyl phosphate on growth, reproduction and transcription of genes of Daphnia magna. **Aquatic Toxicology**, v. 195, p. 58-66, 2018.

ZANONI, M. V. B.; SENE, J. J.; ANDERSON, M. A. Photoelectrocatalytic degradation of Remazol Brilliant Orange 3R on titanium dioxide thin-film electrodes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.157, p.55–63, 2003.

ZHA, J.; WANG, Z. Acute and early life stage toxicity of industrial effluent on Japanese medaka (Oryzias latipes). **Science of the Total Environment**, v. 357, n. 1-3, p. 112-119, 2006.

ZHANG, M. et al. Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in ethylbenzene-induced renal toxicity in rat. **Toxicological sciences**, v. 115, n. 1, p. 295-303, 2010.

ZHANG, X.; ZHANG, P.; PEREZ-RODRIGUEZ, V.; SOUDERS II, C. L.; MARTYNIUK, C. J. Assessing the toxicity of the benzamide fungicide zoxamide in zebrafish (Danio rerio): Towards an adverse outcome pathway for beta-tubulin inhibitors. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 103405, 2020.

ZHENG, J. et al. Offshore produced water management: A review of current practice and challenges in harsh/Arctic environments. **Marine pollution bulletin**, v. 104, n. 1-2, p. 7-19, 2016.

ZHOU, S.; DONG, Q.; LI, S.; GUO, J.; WANG, X.; ZHU, G. Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos. **Aquatic toxicology**, v. 95, n. 4, p. 339-346, 2009.

ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W. F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO2. **Química Nova**. v.21, p. 319–325, 1998.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da eficiência do tratamento por processos oxidativos avançados (POAs) na remoção/redução da toxicidade induzida em organismos aquáticos por água residuária produzida por indústrias petrolíferas", registrada sob nº 19.1.98.60.4, sob a responsabilidade de Taís Suelen Viana e Danielle Palma de Oliveira, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

A proposta foi aprovada na reunião de 14/12/2017 e o relatório final aprovado *ad referendum* em 18/09/2020 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA – FCFRP/USP).

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	18/12/2017 a 30/08/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe Danio rerio
Nº de animais	2520
Sexo	Indiferente
Peso/Idade	Não se aplica/ Embriões
Origem	Biotério de Toxicologia Ambiental da FCFRP

Ribeirão Preto, 18 de setembro de 2020.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/N - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892