



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
CENTRO INTERDISCIPLINAR DE ENERGIA E AMBIENTE (CIENAM)
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ENERGIA E AMBIENTE

MILENA MARIA SAMPAIO DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E IDENTIFICAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM BASTÕES DE LUZ QUÍMICA
UTILIZADOS EM PESCA COMERCIAL NA COSTA DA BAHIA**

Salvador
2011

MILENA MARIA SAMPAIO DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E IDENTIFICAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM BASTÕES DE LUZ QUÍMICA
UTILIZADOS EM PESCA COMERCIAL NA COSTA DA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Energia e Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira
Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento

Salvador
2011

-
- A658a Araujo, Milena Maria Sampaio de.
Avaliação dos efeitos tóxicos e identificação de substâncias presentes em bastões de luz química utilizados em pesca comercial na costa da Bahia [manuscrito] / Milena Maria Sampaio de Araujo. – 2011.
150 f.; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente (CIENAM), Programa de Doutorado em Energia e Ambiente, 2011.
- “Orientadores: Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira, Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento.”
1. Toxicologia. 2. Toxicologia ambiental. 3. Pesca. 4. *Crassostrea rhizophorae*. 5. Bastões de luz química. I. Pereira, Pedro Afonso de Paula. II. Nascimento, Iracema Andrade. III. Universidade Federal da Bahia. Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente (CIENAM). Programa de Doutorado em Energia e Ambiente. IV. Título.

CDD 616.855

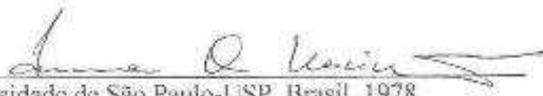
TERMO DE APROVAÇÃO

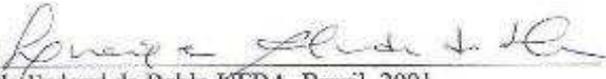
MILENA MARIA SAMPAIO DE ARAUJO

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
PRESENTES EM BASTÕES DE LUZ QUÍMICA UTILIZADOS EM PESCA
COMERCIAL NA COSTA DA BAHIA”**

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Energia e Ambiente,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

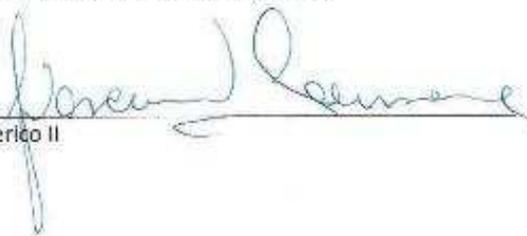
Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira 
Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia-
UFBA, Brasil, 1997.

Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento 
Doutora em Biologia (Marinha) pela Universidade de São Paulo-USP, Brasil, 1978.

Profa. Dra. Luciana Almeida da Silva 
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia-UFBA, Brasil, 2001.

Profa. Dra. Maria Valéria Almeida Santana de Andrade 
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia-UFBA, Brasil, 2001.

Dr. Prof. Gilberto Fillmann 
Doutor em Ciências do Mar pela University of Plymouth, Inglaterra (2001).

Dr. Prof. Giovanni Sansone 
Doutor pela Università degli studi di Napoli Federico II

Salvador, 15 de abril de 2011.

Dedico este trabalho a meus pais Guido e Bohumila Araujo e meu filho Marco Antonio Stanislav. Vocês fazem parte desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira que deu todo o apoio para a realização das análises cromatográficas realizadas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química (LPQ) do Instituto de Química da UFBA; e Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento, pelo acompanhamento e apoio na realização dos testes de toxicidade, desenvolvidos no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento Ambiental (LABIOMAR) do Instituto de Biologia da UFBA.

Ao Prof. Dr. Adalberto Menezes Filho pela ajuda decisiva para a realização das análises cromatográficas.

À Profa. Dra. Solange Andrade Pereira pela parceria na aquisição das ostras, coleta de água do mar, ajuda em diversos momentos e pelo esclarecimento das questões relacionadas a análise estatística.

Ao pesquisador Fabiano Barreto, ativista da ONG Global Garbage, pela ajuda na aquisição dos dados e contatos no que se refere aos bastões de luz química.

Aos integrantes da ONG Capitães da Areia que forneceram os bastões de luz química coletados nas praias da Costa dos Coqueiros do Estado da Bahia.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química e do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento Ambiental, em especial a Profa. Maria Bernadete Neiva Lemos, pela troca de informações, companheirismo e amizade que ajudaram a tornar esta caminhada menos árdua.

Aos membros da Banca Examinadora pelas correções e sugestões que enriqueceram o trabalho.

A coordenação do CIEnAm - UFBA pelo apoio em todas as fases do projeto.

À Universidade do Estado da Bahia, pelo apoio dado à realização desta tese.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os bastões de luz química são dispositivos usados na pesca comercial para atrair peixes, por meio da técnica conhecida como espinhel de superfície. Nesses dispositivos, a luz é produzida por uma reação de quimiluminescência, que ocorre quando os conteúdos dos compartimentos se misturam, por quebra da ampola de vidro interna. Apesar do uso excessivo e indevido destes dispositivos, os riscos de contaminação ao ambiente costeiro ainda não foram devidamente pesquisados e avaliados. Por exemplo, existem registros de mais de 5.500 bastões terem sido recolhidos em 2004 nos 172 km de praias da Costa dos Coqueiros na Bahia. Este trabalho teve por objetivo identificar, por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), as principais substâncias presentes na fração solúvel em água do mar (FSA) do conteúdo de bastões de luz comercializados e descartados na costa da Bahia, assim como avaliar os efeitos do tempo, temperatura e exposição à luz solar na estabilidade das suas FSA e os seus possíveis efeitos ambientais adversos por meio de testes de toxicidade de curta duração com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*. Bastões novos foram adquiridos em lojas de artigos de pesca de Salvador, BA. Além destes, dispositivos descartados foram coletados em praias da Costa dos Coqueiros, na Bahia. O conteúdo dos bastões foi diluído na proporção 1/9 em água esterilizada com salinidade 28 e mantido durante 20 horas sob agitação, obtendo-se assim a FSA. Dentre os métodos de extração testados e otimizados o de *Headspace*, acoplado com a análise por GC-MS foi o mais eficiente permitindo a identificação de dezenove substâncias. A identificação dos compostos foi realizada através da comparação de seus espectros de massas aos existentes na biblioteca eletrônica NIST 147. Quanto ao dimetil ftalato (DMP) e dibutil ftalato (DBP), compostos predominantes no conteúdo dos bastões e nas FSA, foram identificados por comparação a padrões. Os valores de concentração efetiva das FSA que causam alterações em 50% dos organismos (CE_{50}) foram obtidos pelo método *Trimmed Spearman-Kärber*. No conteúdo da ampola interna, além do DBP predominante na composição, foram identificados outros ésteres de ácido ftálico, registrando-se também o ácido 3,5,6-triclorosalicílico, 1[3H]Isobenzofuranona e 2,4,6-triclorofenol. Na solução que circunda a ampola, além do DMP, foi possível identificar o 2-etil nitrofenilacetato. As FSA testadas demonstraram alta toxicidade. Para os bastões novos, a CE_{50} média foi de $0,35 \pm 0,06\%$ e mesmo para FSA preparadas a partir de bastões após um ano de sua ativação, a toxicidade se manteve alta, com CE_{50} igual a $0,65\%$. As FSA, tanto do conteúdo que circunda a ampola, como o de dentro da ampola, demonstraram persistência na toxicidade após seis meses, apresentando $CE_{50} = 0,54\%$ e $CE_{50} = 1,45\%$, respectivamente. Apesar dos testes isolados com o DBP e o DMP, compostos predominantes no conteúdo dos bastões, terem também demonstrado efeito tóxico, as demais substâncias presentes nos bastões potencializaram a sua toxicidade e persistência no ambiente. Estudos adicionais demonstraram que alterações de temperatura e exposição ao sol num período de seis meses não causaram mudanças significativas na toxicidade das FSA. Os resultados deste trabalho apontam para a importância de se estudar com maior detalhe a composição dos bastões de luz e os seus efeitos tóxicos sobre organismos, já que demonstraram efeitos tóxicos nos testes realizados no laboratório, tendo as substâncias contidas nos bastões apresentado elevada persistência no ambiente.

Palavras-chave: Bastões de luz química. Composição. Toxicidade. *Crassostrea rhizophorae*.

ABSTRACT

Lightsticks are artifacts used in commercial fishing in order to attract fishes by means of the technique known as surface longline gear. In these devices, light is produced by means of a chemiluminiscent reaction, which occurs when the contents of the compartments are mixed, as a result of the breaking of the internal glass ampoule. In spite of the excessive and improper use of these devices, the contamination risks of the coastal environment have not been yet properly investigated and evaluated. For example, there are records of more than 5,500 lightsticks collected in 2004 over 172 km of beaches in Costa dos Coqueiros in the State of Bahia, Brazil. Thus this study is aimed at identifying, by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), the principal substances present in the content of lightsticks commercialized and discarded over the coast of the State of Bahia, as well as evaluating the effects of time, temperature and sunlight exposition on the stability of the water-soluble-fractions (WSF) and its possible environmental adverse effects by means of a set of short term toxicity tests using *Crassostrea rhizophorae* oyster embryos. New lightsticks were acquired at shops commercializing fishing articles in the city of Salvador, State of Bahia, Brazil. Besides these new ones, discarded artifacts have also been collected on the Costa dos Coqueiros beaches. The lightsticks content was diluted in the proportion of 1/9 in sterilized water with salinity of 28 and was maintained under agitation during 20 hours, thus obtaining the WSF. Among the extraction methods tested and optimized, the most efficient was the Headspace together with the analysis by GC-MS, making possible the identification of nineteen substances. The identification of the compounds was carried out by means of comparison of their mass specters with those of the electronic library NIST 147, as for dimetil phthalate (DMP) and dibutil phthalate (DBP), predominant compounds in the lightsticks content and in the WSF, these have been identified by pattern comparison. The values of the WSF effective concentration that cause alterations in 50% of organisms (EC_{50}), were obtained by the *Trimmed Spearman-Kärber* method. In the content of internal ampoule, besides the DBP predominant in its composition, other phthalic acid esters were identified, registering also 3,5,6 trichlorosalicylic acid, 1[3H]-isobenzofuranone and phenol, 2,4,6 - trichloro. In the solution that surrounds the ampoule, besides the DMP was possible to identify the ethyl 2-nitrophenylacetate. The WSF tested have demonstrated a high toxicity. As for the new lightsticks, the EC_{50} mean (average) was 0.35% and the same thing in the case of WSF prepared out of the lightsticks after one year of its activation, showing that the toxicity was maintained high, with EC_{50} equal to 0.65%. The WSF, with reference to the content that surrounds the ampoule as well as the content inside the ampoule, have demonstrated toxicity persistence after six months, showing EC_{50} of 0.54% and EC_{50} of 1.45%, respectively. In spite of the fact that isolated tests with the DBP and the DMP – which are predominant compounds in the lightsticks content- have shown toxic effect, the other substances present in the lightsticks increased its toxicity and persistence in the environment. Moreover, additional studies have demonstrated that alterations in temperature and exposition to the sun during the period of six months have not caused significant changes in the WSF toxicity. The results of this study indicate the importance of further and more detailed investigation of the composition of lightsticks and their toxic effects on aquatic organisms, considering the toxic effects in the tests carried out in the laboratory and the high persistence of lightstick substances in the environment.

Keywords: Lightsticks. Composition. Toxicity. *Crassostrea rhizophorae*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	ativador
ANT	antraceno
BaA	benzo[a]antraceno
BPEA	9,10-bis (feniletinil)antraceno
CE₅₀	concentração efetiva que causa alteração a 50% dos organismos-teste
CEO (ou LOEC)	menor concentração de efeito observado
CENO (ou NOEC)	maior concentração de efeito não observado
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CI₅₀	concentração que causa efeito inibitório a 50% dos organismos-teste
CIEEL	luminescência quimicamente iniciada por intercambio de elétron
CLA	9-cloroantraceno
CL₅₀	concentração que causa letalidade a 50% dos organismos-teste
CNA	9-cianoantraceno
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPs	compostos orgânicos persistentes
COS	compostos orgânicos semi-voláteis
COV	compostos orgânicos voláteis
CCPO	oxalato de bis(2-carbopentiloxi – 3,5,6-triclorofenila)
C.V.	coeficiente de variação
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DBP	dibutil ftalato
DCLA	9,10-dicloroantraceno

DCM	diclorometano
DCNA	9,10-dicianoantraceno
DEHP	di (2-etilhexil)ftalato
DiBP	diisobutil ftalato
DI-SPME	microextração em fase sólida por imersão direta
DMP	dimetil ftalato
DNA	ácido desoxiribonucléico
DPA	9,10-difenilantraceno
DSS	dodecil sulfato de sódio
LLE	extração liquido-liquido
FSA	fração solúvel em água
GC	cromatografia gasosa
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HS	headspace
HS-SPME	microextração em fase sólida por headspace
IAE	intermediário de alta energia
ICp	programa estatístico para determinações da concentração de inibição
IMI-H	imidazol
ISO	Organização Internacional para Padronização
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LABIOMAR	Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento Ambiental
LPQ	Laboratório de Pesquisa e desenvolvimento em Química

MARPOL	protocolo da convenção internacional para a prevenção da poluição por embarcações
MEHP	mono(2-etilhexil)ftalato
MOF	oxidase de função mista
NAF	naftaleno
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
ONG	organização não governamental
PCB	pentaclorofenol
PDMS/DVB/CAR	polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxem
PER	perileno
PIB	produto interno bruto
PVC	policloreto de vinila
REACH	Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de substâncias Químicas
RUB	rubreno
SCAN	varredura
SIM	monitoramento de íon seletivo
SPE	extração em fase sólida
SPME	micro extração em fase sólida
TCPO	oxalato de bis (2,4,6- triclorofenila)
TIE	identificação e avaliação da toxicidade
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Esquema de espinhel pelágico (Ivar do Sul, 2005)	25
Figura 2- Representação de um bastão de luz química com seus componentes	27
Figura 3- Quimiluminescência do bastão de luz química após ser ativado pela mistura de seus componentes internos	28
Figura 4- Seqüência proposta para a reação do peróxi-oxalato (Mohan e Rauhut, 1984 apud Thompson e Mcbee, 1988).....	30
Figura 5 – Tipos de bastões de luz química com embalagem encontrados a venda em lojas de pesca de Salvador-BA	35
Figura 6 – Tipos de dispositivos de luz química vendidos em Salvador-BA.....	36
Figura 7– Proposta do mecanismo de degradação inicial do DMP pelo processo de microondas e fotodegradação (Liao & Wang, 2009).....	40
Figura 8- Posições mais reativas do antraceno (Lopes & Andrade, 1996).....	43
Figura 9- Esquema da reação de fotooxidação do 9-10-dimetilantraceno em solução (Lopes & Andrade, 1996).....	44
Figura 10 – Esquema da reação do antraceno com HNO ₃ e com NO _x (Lopes & Andrade, 1996).	45
Figura 11- Mapa da Costa dos Coqueiros.....	60
Figura 12-Bastão novo antes de ser ativado (a) e um ano após ser ativado (b).....	61
Figura 13- Limpeza das ostras.....	61
Figura 14- Aclimação das ostras.....	61
Figura 15- Fluxograma dos experimentos.....	63
Figura 16- Frasco Mariotte usado no preparo da FSA.	64
Figura 17- Detalhe da ampola de vidro contida dentro dos bastões antes de ser quebrada	65
Figura 18- Cromatógrafo Varian GC/MS 3900	69
Figura 19- Cromatógrafo Shimadzu GC-QP 2010.....	69

Figura 20- Anormalidades no desenvolvimento embrionário da ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> usadas na avaliação do efeito adverso em relação a larva D normal obtida com 24 horas após fecundação.	73
Figura 21- Cromatograma típico (<i>full scan</i>) para o branco do sistema de extração usado para verificar limpeza do mesmo.....	76
Figura 22- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por SPE, nas condições descritas no anexo 1.....	77
Figura 23- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por LLE, nas condições descritas no anexo 3A.....	77
Figura 24- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por HS nas condições descritas no anexo 2	78
Figura 25- Estruturas de: (a) 2,4,6 triclorofenol; (b) ácido 3,5,6 triclorosalicílico; (c) 1[3H] isobenzofuranona e (d) anidrido ftálico.....	79
Figura 26- Representação gráfica da área das substâncias identificadas pela análise de abundâncias relativas dos compostos contidos na ampola dos bastões de luz química (novos), em intervalos de 30min, 1h, 2h e 13h nas condições descritas no Anexo 2.....	83
Figura 27 - Concentração média (\pm desvio padrão) do DBP ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas FSA em função do tempo, temperatura e ação da luz solar (N= 3).....	86
Figura 28 - Concentração média (\pm desvio padrão) do DMP ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas FSA em função do tempo, temperatura e ação da luz solar (N= 3).....	87
Figura 29- Controle da sensibilidade de embriões da ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> à substância de referência DSS.....	89
Figura 30- Comparação de médias múltiplas e valores médios de CE_{50} resultantes da ação das FSA testadas sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> , num período de 24 horas de exposição.....	93
Figura 31- Valores de CE_{50} obtidos com FSA de 6 meses, exposta a diferentes condições de temperatura e exposição solar.....	96

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Compostos relatados como constituintes dos bastões de luz química.....	29
Tabela 2- Relação dos componentes comumente encontrados nos bastões de luz química e sua função na reação do peróxi-oxalato de acordo com fichas de dados de segurança, patentes e pesquisas	33
Tabela 3- Identificação química, propriedades físico-química e toxicidade calculada. CAS significa número do <i>Chemical Abstract Service</i> , MW é a massa molecular, WSol é a solubilidade em água, K_{ow} é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.....	39
Tabela 4 - Substâncias encontradas nos bastões de luz química (novos e usados) usando diferentes métodos de extração otimizados	80
Tabela 5- Relação de compostos identificados por tentativa durante preparo da FSA do conteúdo da ampola dos bastões de luz química, em intervalos de 30min, 1h, 2h e 13h, com a área dos picos e área normalizada obtida de cada componente nas condições descritas no anexo 2.....	82
Tabela 6- Dados das curvas analíticas de dibutil ftalato e dimetil ftalato e limites de quantificação (LOQ) obtidos com método desenvolvido para DI-SPME.....	84
Tabela 7- Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio padrão (N=3) do DBP e DMP nas FSA das amostras analisadas de bastões de luz química novos..	84
Tabela 8- Concentração média e desvio padrão (N=3) do DBP e DMP nas FSA preparadas a partir das substâncias puras e da mistura de ambos: no momento de preparo (0); mantidas durante 6 meses no escuro (6E) e mantida durante 6 meses sob radiação solar (6S).....	85
Tabela 9- Dados de CE_{50} obtido a partir dos testes de toxicidade com a ostra <i>C. rhizophorae</i> , usando FSA das amostras analisadas pronta para ser usada (N=4).....	91
Tabela 10- Análise estatística dos dados de CE_{50} com média e desvio padrão (N=4).....	92
Tabela 11- Dados de CE_{50} obtido a partir dos testes de toxicidade com a ostra <i>C. rhizophorae</i> , usando FSA após 6 meses do seu preparo (6E- FSA mantida durante 6 meses no escuro e 6S- FSA mantida durante 6 meses sob radiação solar).....	95
Tabela 12- Classificação das substâncias encontradas nos bastões de luz química de acordo com o nível de toxicidade.....	99

ANEXOS

	Página
Anexo 1 - Características da programação otimizada para o protocolo usando extração em fase sólida (SPE)	129
Anexo 2- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por <i>Headspace</i>	130
Anexo 3A – Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por LLE do conteúdo de bastões de luz química coletados.....	131
Anexo 3B- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por LLE do conteúdo dos bastões novos de luz química.....	132
Anexo 4- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por SPME-ID	133
Anexo 5 – Cromatograma e espectros de massa dos compostos encontrados nos sinalizadores (A) e os extraídos da biblioteca eletrônica NIST 147 (B), de acordo com a melhor nota de comparação de similaridades.....	134
Anexo 6 – Cromatograma obtido na identificação e quantificação do DBP e DMP após extração por DI-SPME em sistema GC com rampa de temperatura nas condições descritas no anexo 4..	144
Anexo 7- Cromatogramas e relação de substâncias identificadas por tentativa na FSA do conteúdo da ampola dos bastões de luz química.	146
Anexo 8- Lista de substâncias encontradas nos bastões de luz química de acordo com a biblioteca NIST 147:substância / sinônimo / inglês – português (fórmula).....	148

SUMÁRIO

	Página
Resumo	7
Abstract	8
Lista de abreviaturas e siglas.....	9
Lista de figuras.....	12
Lista de tabelas.....	14
Lista de anexos.....	15
1 INTRODUÇÃO	
1.1- Cenário da pesquisa.....	19
1.2- Características físico-químicas dos contaminantes: influência do ambiente	21
1.3. Bastões de luz química	24
1.3.1 Características, ocorrência e uso dos bastões.....	24
1.3.2- Considerações sobre a ocorrência, composição e toxicidade dos bastões de luz química	31
1.4 Características e efeitos registrados dos principais contaminantes encontrados nos bastões de luz química	36
1.4 .1 Ftalatos	36
1.4.2 Compostos aromáticos	41
1.4.3 Compostos clorados	45
1.5- Métodos para análise de compostos químicos.....	46
1.5.1- Extração em fase sólida (SPE)	46
1.5.2- Extração líquido-líquido (LLE)	47
1.5.3- <i>Headspace</i> (HS)	48
1.5.4- Microextração em fase sólida (SPME)	49
1.5.5- Separação e identificação dos compostos	50
1.6- Testes de toxicidade para avaliação de ecossistemas em risco	51
2 OBJETIVOS	
2.1- Geral	59
2.2- Específicos	59

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostragem.....	59
3.1.1- Coleta do material a ser analisado (bastões de luz química)	59
3.1.2 -Coleta e manutenção de organismos testes em laboratório	61
3.2- Metodologia analítica....	62
3.2.1 -Limpeza da vidraria	62
3.2.2 -Reagentes e solventes	62
3.3- Procedimento analítico	62
3.3.1-Preparo da água de diluição	63
3.3.2-Preparo das Frações Solúveis em água (FSA) do conteúdo dos bastões e do DBP e DMP.....	64
3.3.3- Preparo das amostras	65
3.4- Caracterização química das amostras	66
3.4.1- Extração em fase sólida	66
3.4.2- Extração por <i>headspace</i>	67
3.4.3- Extração líquido-líquido	67
3.4.4- Microextração em fase sólida do <i>headspace</i> (HS-SPME) e por imersão direta (DI-SPME)	68
3.5- Análise das amostras por GC-MS.....	69
3.5.1- Preparo da solução de 10 µg L ⁻¹ do dibutil ftalato e dimetil ftalato e das curvas padrão.....	69
3.6- Estudo da influência da exposição ao sol e temperatura na composição e toxicidade da FSA do conteúdo dos sinalizadores e das substâncias puras de DBP e DMP após seis meses.....	70
3.7- Ensaio Biológicos: testes de toxicidade.....	70
3.7.1- Parâmetros físico-químicos medidos	71
3.7.2- Montagem e realização dos testes de toxicidade com <i>Crassostrea rhizophorae</i>	72
3.7.3- Estatística aplicada aos resultados	73

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1-Extração e análise dos compostos presentes nos bastões	74
4.1.1- Seleção do método de extração e pré-concentração dos constituintes químicos presentes nos sinalizadores.....	75
4.1.2- Avaliação de alterações sofridas nos componentes da ampola dos bastões de luz química durante preparo da FSA	81
4.2- Quantificação do DBP e DMP	83
4.3- Avaliação do efeito do tempo, temperatura e exposição à luz no comportamento das FSA do DBP e DMP.....	84
4.4-Testes de toxicidade embriolarvais com a <i>Crassostrea rhizophorae</i>	89
4.4.1- Substância de referência e carta-controle.....	89
4.4.2- Testes de toxicidade com FSA dos (DBP e DMP) e conteúdo de bastões de luz química	90
4.4.3- Avaliação do efeito tóxico das FSA recém preparadas.....	91
4.4.4- Avaliação do efeito tóxico da FSA submetida a diferentes tratamentos durante seis meses.....	94
4.4.5- Comparação da toxicidade dos bastões de luz química determinada no presente trabalho com dados de trabalhos prévios.....	96
4.5 Características das FSA utilizadas e risco do conteúdo dos bastões de luz química para o ambiente	101
5. CONCLUSÕES.....	103
6. RECOMENDAÇÕES.....	105
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS.....	128

1. INTRODUÇÃO

1.1- Cenário da pesquisa

Já que os sistemas aquáticos naturais são abertos e dinâmicos ocorrem modificações contínuas na sua composição química. As águas marinhas são constituídas principalmente por íons cloreto, sódio, cálcio, potássio, magnésio e sulfato, os quais são denominados componentes conservativos. Eles constituem aproximadamente 99% da massa total de sólidos dissolvidos na água do mar, sendo que os íons cloreto e sódio respondem sozinhos por aproximadamente 86% (Lombardi e Fernandez, 2008). Além dos componentes conservativos (metais pesados e vários pesticidas), as águas também são constituídas por componentes não conservativos, como o oxigênio e dióxido de carbono, gases mais abundantes nas águas doces e marinhas; nutrientes como fosfato e nitrato; compostos orgânicos dissolvidos como aminoácidos e substâncias húmicas; elementos traços como cobre, zinco, ferro; materiais particulados como areia, argila, tecidos não vivos e excretas (Lombardi & Fernandez, 2008, Costa *et al.*, 2008; Rand *et al.*, 1995; Marques Júnior *et al.*, 2002).

Embora os habitats marinhos, costeiros e estuarinos sejam altamente produtivos e suportem ecossistemas complexos, em geral, também estão expostos ao perigo de deterioração e de contaminação, devido às atividades humanas e o resultante impacto de suas ações (Zann & Kailola, 1995). Estes ecossistemas aquáticos se constituem em receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de poluentes (Cetesb, 1990). Os corpos d'água são os recipientes naturais da maioria das substâncias tóxicas geradas pelas atividades humanas. Mesmo com todos os mecanismos físicos, químicos e biológicos que esses sistemas possuem para assimilá-las, quando essas substâncias atingem níveis acima da capacidade assimilativa do corpo receptor, podem acarretar alterações bioquímicas e moleculares, afetar as respostas fisiológicas e/ou o comportamento dos organismos presentes nestes ambientes.

A poluição ocorre como a entrada direta ou indireta de elementos ou energia dentro do ambiente marinho, resultando em efeitos negativos, como, comprometimento na qualidade da água e conseqüentemente diminuição das espécies marinhas ou da saúde humana (Kennish, 1997; Clark, 1992). A contaminação ambiental por agentes químicos tem ocorrido de forma intencional ou acidental, principalmente a partir de fontes não naturais. A contaminação refere-se a

concentração de algum elemento introduzido na água, podendo ser acumulado no sedimento ou em organismos, apresentando teores acima dos que normalmente são encontrados nestes compartimentos. Dependendo do tipo de contaminante, da sua propriedade físico-química e das condições do meio, o mesmo pode manter-se em solução na água, ser adsorvido no sedimento ou ser absorvido pelos organismos (Harding, 1992; Chapman et al., 1982). Os agentes contaminantes que alteram o equilíbrio natural do meio marinho são os metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos organoclorados, radiatividade, contaminação térmica, resíduos sólidos, etc. Da mesma maneira que variações nas condições ambientais afetam a disponibilidade de agentes químicos na água, o fazem também nos sedimentos. Assim, variações de temperatura, potencial de óxido-redução, matéria orgânica dissolvida, concentração de outros produtos químicos como nutrientes, entre outros podem atuar direta ou indiretamente sobre a toxicidade dos contaminantes presentes no ambiente.

Atualmente, o lixo deixou de ser apenas um problema sanitário em zonas urbanas e tornou-se uma das principais fontes de contaminantes em ecossistemas marinhos, inclusive em áreas não urbanizadas (Santos et al.; 2008; Kennish, 1997). Qualquer resíduo sólido de origem antropogênica que de alguma maneira tenha sido introduzido no ambiente marinho é definido como lixo marinho (Coe & Rogers, 1997). Estão inclusas variedades de rejeitos de atividades antrópicas, como plásticos (ex: náilon, garrafas pet, sacos plásticos, etc), resíduos de dragagens e partículas em geral. Elevadas densidades de plásticos flutuantes tem sido encontradas nos oceanos desde a década de 1970 (Carpenter & Smith, 1972). Desde então, o lixo tem sido reconhecido como uma das principais formas de poluição marinha, podendo afetar a respiração dos organismos marinhos pelo bloqueio das vias respiratórias e pela diminuição da atividade fotossintética do fitoplâncton, devido à redução da penetração da luz na coluna d'água; pode prejudicar o desenvolvimento dos organismos tornando-os mais vulneráveis ao estresse e às doenças, causando mudanças no comportamento, crescimento reduzido, redução no potencial reprodutivo, redução na tolerância a enfermidades, etc. Juntamente com outros poluentes, como petróleo, metais pesados e excesso de nutrientes, o lixo marinho tem ameaçado a saúde humana e o equilíbrio ambiental de diversas formas (Santos et al, 2005).

O efeito do lixo marinho atinge principalmente as áreas costeiras, que em escala mundial exibem densidade demográfica bem superior às terras interioranas. O estado da Bahia possui o mais extenso litoral do Brasil, com aproximadamente 1150 km (BRASIL, 2004). A Zona

Costeira Brasileira de 8.500 km inclui diferentes ecossistemas de alto interesse ecológico como recifes de corais e manguesais (BRASIL, 1996), daí a preocupação quanto a manutenção do equilíbrio nesta região. Atualmente, cerca de 50% da população mundial vive próxima à região litorânea, com conjecturas de que este número se eleve para 75% até o ano de 2020 (Charlier & Bologna, 2003). Por outro lado, 90% de toda a produção marinha (8 milhões e 5 milhões de toneladas métricas oriundas da pesca e maricultura, respectivamente) advém de áreas costeiras, sobretudo das zonas tropical e subtropical (Prósperi & Nascimento, 2008). No Brasil, as atividades econômicas costeiras são responsáveis por cerca de 70% do produto interno bruto (PIB) nacional, principalmente devido à existência de portos nos quais é realizada grande parte da atividade econômica exportadora brasileira (Freitas, 2004). As áreas costeiras são também essenciais à vida marinha e à manutenção da biodiversidade, proporcionando locais de reprodução, desenvolvimento e crescimento para muitas espécies (Prósperi & Nascimento, 2008). Em decorrência da poluição nos ambientes costeiros, surgem prejuízos sócio-econômicos, como aumento de doenças na população (Milaré & Magri, 1992), diminuição da balneabilidade das praias, desvalorização imobiliária, contaminação do pescado, entre outros (Lamparelli et al., 2001; Bonetti, 2000).

A degradação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos vem acontecendo de forma intensa e global, sobretudo em ambientes estuarinos e próximos ao litoral, onde estão sujeitos a eventos de contaminação severa devido às inúmeras atividades antrópicas que geram efluentes e resíduos com alto grau de toxicidade. Nos ambientes costeiros o decréscimo nas concentrações de contaminantes pela difusão e ação de correntes é mais difícil que em oceano aberto, especialmente em ambientes de baixa energia como os estuários e manguezais (Bícego et al., 2008). Uma vez lançado no ambiente aquático, um composto xenobiótico tem distribuição complexa, determinada pela dinâmica dos processos de partição entre a fase aquosa, o sedimento e biota (Buratini & Brandelli, 2008).

1.2- Características físico-químicas dos contaminantes e influência do ambiente

A vulnerabilidade do ambiente aquático às substâncias químicas depende: da localização do ecossistema em relação ao sítio de lançamento de contaminantes, das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação; da concentração

dos contaminantes no ecossistema; da duração e do tipo de descarga dos contaminantes (descarga intermitente ou contínua); da resiliência do ecossistema que lhe permite resistir às alterações resultantes da presença dos contaminantes, como a capacidade tamponante da água do mar e a concentração de matéria orgânica nela dissolvida (Rand et al, 1995). Cada um dos ecossistemas aquáticos se constituem em produto dinâmico de interações complexas entre componentes vivos e não-vivos com características que podem sofrer variações no tempo e no espaço (Lombardi e Fernandez, 2008).

O efeito tóxico no ambiente marinho depende das características físicas e químicas do produto (solubilidade em água, persistência, lipofilicidade, densidade, viscosidade, etc) e do ambiente (grau de exposição do ambiente às ondas, tipo de substrato, amplitude das marés), como também das características biológicas da própria comunidade atingida (Lopes et al, 1994; Milanelli, 1994). A estabilidade dos compostos presentes na água do mar pode ser influenciada por outras condições ambientais (e.g., pH, salinidade, temperatura, pressão). Tais compostos podem permanecer na superfície da água, na coluna d'água, dissolvidos ou em forma particulada, ou precipitados e acumulados nos sedimentos marinhos de fundo.

A disponibilidade dos compostos químicos em um meio está governada por suas propriedades físico-químicas, sua concentração e por sua reatividade química, que também determina a facilidade para que se acumulem e exerçam efeitos tóxicos nos organismos. A biodisponibilidade ou disponibilidade de um composto químico para o organismo pode ser definida como a fração que atinge o organismo causando nele alguma reação adversa (Lombardi & Fernandez, 2008). Os processos de transformação e degradação como a evaporação, emulsificação, dispersão, dissolução, sedimentação, hidrólise, fotooxidação e biodegradação são extremamente importantes na definição da forma de impacto do contaminante em comunidades afetadas (Milanelli, 1994).

A dissolução é a principal rota pela qual várias substâncias entram nos corpos d'água. A solubilidade em água é uma propriedade extremamente importante, por influenciar na biodisponibilidade potencial da substância, interferindo na toxicidade aquática, na biodegradação e bioacumulação. Deste modo, é um fator determinante no controle da distribuição de produtos químicos no ambiente. Os xenobióticos orgânicos normalmente encontrados nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos são compostos de baixa solubilidade na água e baixa pressão de vapor, apresentam como característica comum a baixa reatividade no ambiente e alta hidrofobicidade, o

que lhes confere altos tempos de residência nos sedimentos (Mozeto & Zagatto, 2008). Contaminantes com as características supra citadas, tendem a se adsorver nos materiais particulados e nos sedimentos (Kruijf, 1988), a exemplo dos metais pesados, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que podem se adsorver nos sedimentos e, em seguida, podem ser transferidos para os organismos que habitam estes ambientes (Baird, 2002). Os contaminantes orgânicos com baixa solubilidade em água, mas com alta pressão de vapor, como benzeno e diclorometano, tendem a volatilizar (Alberici, 1996; Kruijf, 1988). Quanto maior a massa molecular dos compostos orgânicos, menor será sua solubilidade em água, a não ser que existam grupos polares nas moléculas, tais como hidroxila ou amino, ou se esses compostos forem iônicos (Mozeto & Zagatto, 2008). Em se tratando de contaminantes orgânicos, grupos polares como hidroxilas, aminas e carboxilas aumentam sua solubilidade em água e fazem com que eles sejam volatilizados mais lentamente (Kruijf, 1988). Na água, os compostos com menor massa molecular causam mais danos devido à maior solubilidade e, portanto, maior disponibilidade (Bícego et al., 2008). Os hidrocarbonetos de baixa massa molecular apresentam maior efeito tóxico agudo, principalmente devido à sua elevada solubilidade e consequente biodisponibilidade (GESAMP, 1993).

Os contaminantes oleosos podem se apresentar em vários estados de emulsificação (Bícego et al., 2008). Uma emulsão é formada podendo conter de 20 a 80% de água e, a partir daí, os compostos tendem a ser dissolvidos (Bícego et al., 2008). A parte dissolvida representa uma pequena fração do óleo na água, que pode, entretanto, ser importante por causa de seu efeito possivelmente tóxico no sistema biológico (NRC, 2003; Fernandes, 2001).

Apesar de um elemento/composto estar presente no ambiente, sua disponibilidade pode sofrer variações dependendo da forma química em que se encontra e das interações com outros componentes presentes na água. A hidrólise é uma reação importante porque os produtos resultantes dela são tipicamente mais solúveis em água e menos voláteis do que seus precursores. Um exemplo desse tipo de reação é a conversão de ésteres a ácidos (Shaw & Chadwick, 1998).

A luz tem importante efeito sobre as alterações de contaminantes que atingem a água. Principalmente a radiação UV, é capaz de provocar a quebra de ligações químicas e assim contribuir significativamente para degradar algumas substâncias. A fotodegradação constitui o modo predominante de degradação de muitos compostos, originando produtos mais hidrossolúveis, menos voláteis e menos assimiláveis que a molécula original (Lyman, 1995). As

reações fotoquímicas podem ser responsáveis por uma variedade de transformações, incluindo oxidação, hidroxilação, ciclização e desalogenação. As reações fotoquímicas ocorrem mais freqüentemente na atmosfera e nas águas superficiais e podem provocar a degradação de compostos tóxicos ou, ainda, promover um aumento na toxicidade de compostos inicialmente pouco tóxicos (Hodgson, 2004). Por exemplo, a fotooxidação afeta os hidrocarbonetos aromáticos contidos no óleo bruto e os converte em espécies polares, aumentando assim sua suscetibilidade à biodegradação (Dutta & Harayama, 2000).

Os mecanismos de fotólise, por substâncias naturais, como a água, tanto podem ser por absorção direta de radiação UV pelo composto químico, ou pela absorção da radiação UV com a formação de espécies ativas, como o oxigênio singlete (apresenta todos elétrons emparelhados o que corresponde ao estado excitado) ou radicais hidrogênio (Staples et al, 1997).

Poluentes orgânicos e lixo podem ser mineralizados pela ação de potentes agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, que é capaz de se decompor para produzir um poderoso intermediário oxidante, o radical hidroxila (Ibanez, 2005). Considerando os poluentes orgânicos na atmosfera, as reações com radicais hidroxila são geralmente o processo mais importante de fotodegradação (Kelly et al, 1994; Atkinson et al, 1988).

Dentre os principais aspectos da poluição marinha, destaca-se a contaminação por resíduos sólidos (Windom, 1992), dentre os quais se incluem os bastões de luz química (*lightsticks*), alvo deste estudo, cujos riscos detrimentais ao ambiente costeiro ainda não foram devidamente avaliados.

1.3- Bastões de luz química

1.3.1- Características, ocorrência e uso dos bastões

Os bastões de luz química, também conhecidos como *lightsticks*, são sinalizadores luminosos usados pelas embarcações, que buscam a captura do espadarte (*Xiphias gladius*) e algumas espécies de atum (*Thunnus albacares*, *Thunnus atlanticus*). Estes bastões luminosos são presos às linhas secundárias, acompanhando cada gancho, com o objetivo de atrair os peixes aumentando assim a eficiência das iscas na pesca de espinhel (Hazin *et al.*, 2005). Estes tipos de atratores são utilizados em grandes quantidades na pesca comercial, por meio da técnica conhecida como espinhel de superfície ou pelágico (Figura 1), que consiste de uma linha

principal de poliamida monofilamento com quilômetros de extensão, podendo chegar a 80km, na qual são presos 800 a 1.200 anzóis iscados em linhas secundárias com grampos de metal (“snaps”). Numa recente análise deste tipo de pescaria para captura do espadarte revelou-se que a média do comprimento da linha era 74,5km, contendo 777 anzóis em linhas secundárias usando 397 bastões de luz química em uma profundidade média de 64 metros (Bigelow et al, 2006). Por outro lado, a quantidade de sinalizadores utilizada pode ser ainda maior, considerando que Hazin *et al.* (2005) relatam que na pesca do espadarte geralmente são usados 3 sinalizadores por anzol.

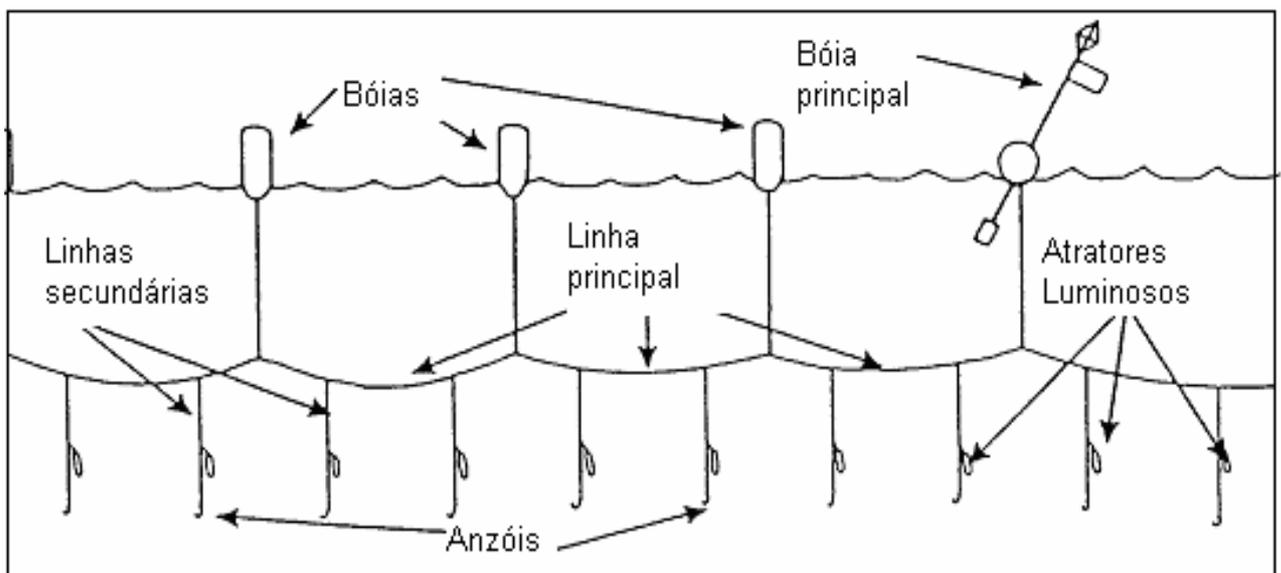


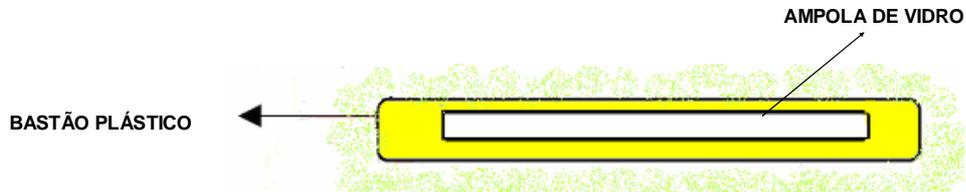
Figura 1- Esquema de espindel pelágico (Ivar do Sul, 2005).

No Brasil, na região nordeste (Recife-PE), a utilização do espindel de superfície pelos atuneiros japoneses teve início no ano de 1956 (Azevedo et al., 1999; Dallagnolo & Andrade, 2006). Entre 1983 e 1990 embarcações nacionais de pequeno porte começaram a pescar na região nordeste. Até esse momento os principais componentes das capturas eram atuns e cações (Arfelli & Amorim, 1988). De 1991 a 1997 este tipo de pesca foi direcionado para a captura do espadarte (Dallagnolo & Andrade, 2006). As principais modificações feitas para a captura do espadarte foram a adoção do náilon monofilamento e de sinalizadores luminosos, segundo o modelo de pesca americano (Arfelli & Amorim, 2000).

Este estilo de pesca geralmente ocorre à noite com a linha colocada no final da tarde ou início da noite e recuperada na manhã seguinte. Os dispositivos de luz química são

freqüentemente perdidos ou descartados no mar, após serem utilizados. A ONG internacional Global Garbage descobriu que dois navios “espinhaleiros” japoneses, autorizados a pescar nas águas brasileiras, utilizaram, em apenas cinco viagens de pesca do espadarte, 69.300 atratores luminosos sem se preocupar com o descarte deste material (Talento, 2005). Verificou-se que tartarugas marinhas são atraídas pela luz emitida pelos bastões de luz química e capturadas acidentalmente pela pesca com espinhel pelágico (Gramentz, 1988). A intensidade do consumo e a forma de descarte dos bastões de luz química têm promovido o aumento deste resíduo no ambiente costeiro (Bechara *et al.*, 2009; Pinho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2005), podendo estar contribuindo com problemas ainda não devidamente identificados.

Os sinalizadores luminosos são constituídos geralmente de tubos plásticos cilíndricos e semi-transparentes, de polietileno ou polipropileno, estreitos e selados em ambas extremidades, com cerca de 150mm de comprimento e 15mm de diâmetro (Figura 2). Apresentam um líquido oleoso e componentes químicos dentro de uma ampola de vidro fino que, quando quebrada, permite que os reagentes se misturem ao líquido oleoso externo a ela, gerando uma reação quimiluminescente que pode emitir luz por até 48 horas (Ribeiro & Hans, 2010; Bechara *et al.*, 2009; Ivar do Sul *et al.*, 2009; Stevani & Baader, 1999; Pinho *et al.*, 2008; Ermoshkin *et al.*, 2006; Karukstis & Hecke, 2003). No compartimento externo à ampola de vidro do bastão encontram-se os ésteres de ácido oxálico e o hidrocarboneto fluorescente, dissolvidos em um solvente muito viscoso (Bechara *et al.*, 2009), como o dibutil ftalato relatado por Ian Axford (1999). No outro compartimento, ou seja, dentro da ampola de vidro, estão o oxidante (peróxido de hidrogênio) e o catalisador, substância que induz ou acelera a reação (Karukstis & Hecke, 2003; Bechara *et al.*, 2009; *American Cyanamid Company*, 1987).



BASTÃO de polietileno ou polipropileno contendo:

- 1) Reagente quimiluminescente (TCPO)
- 2) Ativador (HPA)
- 3) Solvente (DBP)

AMPOLA de vidro contendo:

- 1) Oxidante (Peróxido de hidrogênio)
- 2) Catalisador (Salicilato de sódio)
- 3) Solvente (t- butil álcool)
- 4) Solvente (DMP)

Figura 2- Representação de um bastão de luz química com seus componentes.

A luz química (Figura 3) destes atratores é produzida por uma reação a partir de um éster de ácido oxálico e o peróxido de hidrogênio, na presença de um ativador (tipicamente compostos aromáticos policíclicos com baixos potenciais de oxidação e altos rendimentos quânticos de fluorescência) que irá variar em função da cor da luz a ser emitida (Albertin *et al.*, 1998). Alguns dos compostos policíclicos aromáticos que são usados nos bastões de luz química comercializados são o 9,10- bis(feniletinil)antraceno (BPEA), 9,10-difenilantraceno (DPA), 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno e rubreno (5,6,11,12 - tetrafenilnaftaleno) para produzir luz verde, azul, amarela e alaranjada, respectivamente (Coleman, 2009; Fardy & Yang, 2008; Hanhela & Paul, 1981 a,b,c). Na tabela 1 encontra-se a fórmula química e a estrutura de compostos geralmente citados nas reações que ocorrem nos bastões. Normalmente, o éster de ácido oxálico usado é o oxalato de bis (2-carbopentiloxi – 3,5,6-triclorofenil) (CPPO) ou o oxalato de bis (2,4,6- triclorofenila) (TCPO), também conhecido como *Cyalume*, nome dado à

marca de bastões de luz química mais difundida, produzida pela empresa *Cyanamid Technologies* (USA), pioneira nesta síntese (Albertin et al, 1998; Thompson & McBee, 1988).

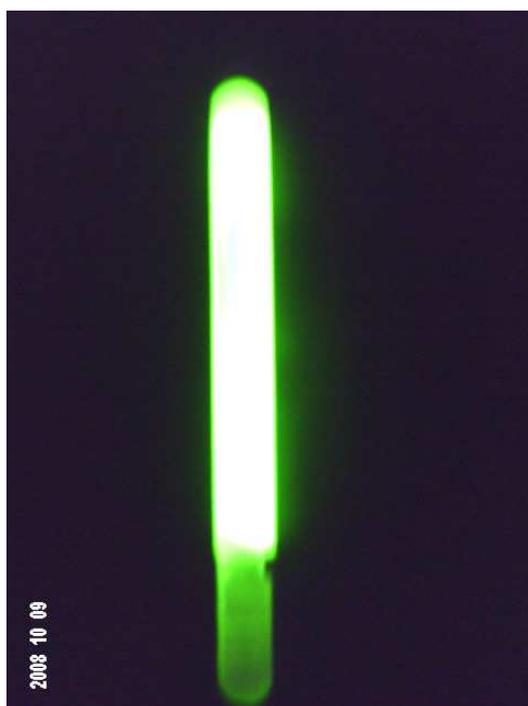
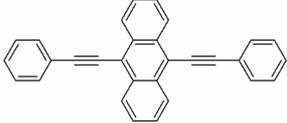
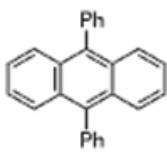
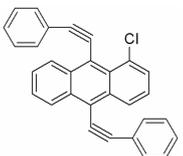
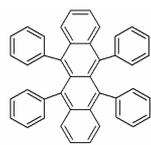
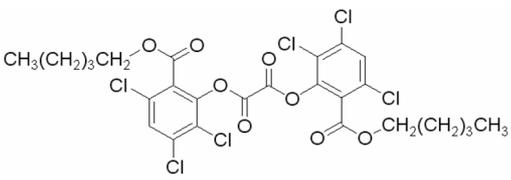
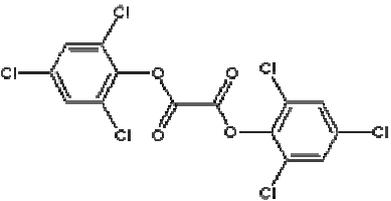
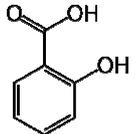


Figura 3- Quimiluminescência do bastão de luz química, após ser ativado pela mistura de seus componentes internos.

Em temperaturas altas a reação de quimiluminescência tende a durar menos tempo que em temperaturas baixas, já que a intensidade da luz diminui à medida que os reagentes são consumidos (Karukstis & Hecke, 2003). A duração e a intensidade da quimiluminescência podem ser reguladas pela utilização de determinadas substâncias, tais como um catalisador, que altera a taxa de reação dos hidroperóxidos, e pela variação dos hidroperóxidos, onde tanto o tipo como sua concentração são críticos para os fins de regulação.

Tabela 1 - Compostos relatados como constituintes dos bastões de luz química.

Composto	Fórmula	Estrutura*
9,10- bis(feniletinil)antraceno (BPEA)	$C_{30}H_{18}$	
9-10-difenilantraceno (DPA)	$C_{26}H_{18}$	
1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno	$C_{30}H_{17}Cl$	
Rubreno (5,6,11,12 – tetrafenilnaftaleno)	$C_{42}H_{28}$	
Oxalato de bis(2-carbopentiloxi – 3,5,6-triclorofenil) (CPPO)	$C_{26}H_{24}Cl_6O_8$	
Oxalato de bis(2,4,6- triclorofenila) (TCPO)	$C_{14}H_4Cl_6O_4$	
Ácido salicílico	$C_7H_5NaO_3$	

Fonte: www.sigmaaldrich.com (2010)

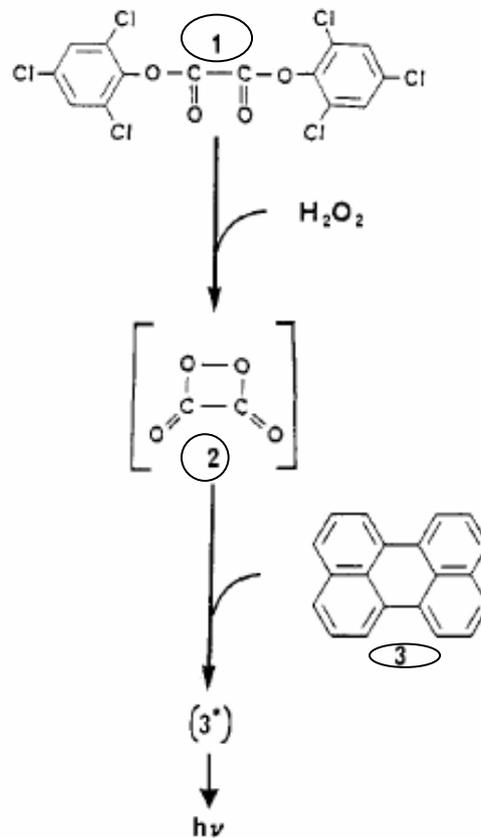


Figura 4- Seqüência proposta para a reação do peróxi-oxalato (Mohan & Rauhut,1984 apud Thompson e Mcbee, 1988).

Na figura 4, um éster oxalato como o oxalato de bis (2,4,6 triclorofenila), representado pelo número 1, reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao qual é misturado, gerando um intermediário de alta energia (IAE), a exemplo da 1,2 dioxetanodiona de número 2, que sofre clivagem e transfere energia para um composto chamado ativador (ACT), geralmente um hidrocarboneto aromático policondensado com baixo potencial de oxidação e alto rendimento quântico de fluorescência. Segundo Garcia-Campaña *et al.* (2000), o ACT doa um elétron para o IAE que posteriormente é devolvido. O ACT, também conhecido como fluoróforo demonstrado no número 3 (perileno), passa para seu estado eletronicamente excitado singlete que é instável e, desta forma, retorna ao estado fundamental, emitindo um fóton (Stevani & Baader, 1999; Nery & Baader, 2001; Albertin *et al.*, 1998). Segundo Hofmann *et al.* (2005), a reação de quimiluminescência que ocorre nos bastões de luz química é catalisada pelo salicilato de sódio,

que induz ou acelera a reação e tipicamente envolve a formação de intermediários metaestáveis ou produtos no estado eletronicamente excitado, resultando na emissão de luz pela conversão da energia química das substâncias em energia luminosa (Maybodi *et al.*, 2010; Nery & Baader, 2001; García-Campaña *et al.*, 2000; Stevani & Baader, 1999). Este mecanismo de luz fria foi descrito por Rauhut (pesquisador da *American Cyanamid Co.USA*), que o nomeou de “sistema peróxi-oxalato”, tendo como primeira aplicação prática os bastões de luz química (Stevani & Baader, 1999; Rauhut, 1969). O sistema peróxi-oxalato é um dos mais eficientes dentre os que apresentam reações quimiluminescentes não-enzimáticas, mostrando rendimento quântico acima de 50%, podendo chegar a 60% em condições ideais (Ciscato *et al.*, 2009; Stevani *et al.*, 2000).

Usando ativadores comuns como rubreno (RUB), perileno (PER) e 9,10-difenilantraceno (DPA) a transferência de elétrons do ACT para o IAE (intermediário de alta energia) no passo inicial de quimiexcitação (Bartoloni *et al.*, 2010) indica a ocorrência do mecanismo CIEEL (Luminescência Quimicamente Iniciada por Intercâmbio de Elétron), na reação quimiluminescente do peroxi-oxalato. Por outro lado, recentemente foi relatado por Bartoloni *et al.* (2010) a ocorrência de um mecanismo CIEEL inverso (transferência de elétron do IAE para o ACT) na etapa de quimiexcitação, quando foram usados ativadores que possuíam substituintes receptores de elétrons como o 9-cloroantraceno (CLA), 9-cianoantraceno (CNA), 9,10-dicloroantraceno (DCLA) e 9,10-dicianoantraceno (DCNA).

1.3.2- Considerações sobre a ocorrência, composição e toxicidade dos bastões de luz química

Coletas sistemáticas de lixo marinho, incluindo os bastões de luz química, vem sendo realizadas em praias brasileiras, com apoio financeiro e logístico de organizações não governamentais (ONGs) como a Global Garbage (www.globalgarbage.org), Associação dos Capitães da Areia e *Lighthouse Foundation*. Em 2001, num trecho de 31 quilômetros em praias da Costa dos Coqueiros, Litoral Norte da Bahia, foram encontrados 1.647 bastões (<http://globalgarbage.org/>). Segundo Ribeiro (2005), 5517 bastões (77% cheios e 23% vazios) foram recolhidos em 2004, nos 172 quilômetros de praia, entre Arembepe e Mangue Seco (Costa dos Coqueiros na Bahia). Em 2007, nos cerca de 200 km da mesma costa do Litoral Norte, foram coletados cerca de 2.554 bastões, sendo que cerca de 34% estavam abertos, e 63% apresentavam conteúdo de coloração laranja (Ribeiro & Hans, 2010).

Além de prejudicar a qualidade estética da praia, há registros de que estes sinalizadores vêm sendo erroneamente utilizados por indivíduos sem qualquer conhecimento acerca de sua toxicidade, para acender fogueiras, fazer uso como chaveiros, lubrificante e bronzeador, aplicar como solvente para retirada de piche, aplicar como remédio para dores no corpo, como repelente, como óleo massageador, para curar micoses, escabiose, bastões novos são usados para obter efeitos luminosos em festas noturnas, podendo causar riscos a saúde ainda não esclarecidos (Bechara et al., 2009; Ivar do Sul, 2005). Segundo Bechara et al (2009), as diversas propriedades benéficas atribuídas aos bastões de luz química podem não ser totalmente absurdas, pois estes contêm derivados clorados do ácido salicílico, que agem como os anti-inflamatórios e analgésicos, além de atuarem como inseticidas similares a outros clássicos compostos policlorados tóxicos, como PCBs e DDT. Os hidrocarbonetos dissolvidos no solvente oleoso também podem atuar como fotoreceptores e em resposta a isso, podem agir como elemento de bronzeamento (Bechara et al., 2009).

O conteúdo dos bastões de luz química não é projetado para ser liberado no ambiente. Com base nas fichas de dados de segurança da *Sigma Aldrich* (2010), as substâncias normalmente presentes nos bastões podem causar irritação na pele, no trato respiratório, nos olhos, algumas delas são suspeitas de provocar câncer, consideradas como muito tóxicas para organismos aquáticos e/ou como disruptores endócrinos. A tabela 2 apresenta a relação dos componentes geralmente encontrados nos bastões de luz química comercializados e sua função na reação do sistema peróxi-oxalato, de acordo com fichas de dados de segurança, patentes e pesquisas.

Embora o conteúdo dos bastões de luz química não seja considerado pelos fabricantes como ambientalmente perigoso em pequenas quantidades, se liberado em grande quantidade, pode ocasionar problemas ambientais e toxicológicos devido a presença de contaminantes marinhos, como o dibutil ftalato e possíveis disruptores endócrinos como o dimetil ftalato. O dibutil ftalato faz parte da lista das 15 substâncias mais perigosas oficialmente publicadas em 28 de outubro de 2008 pelo novo regulamento da Comunidade Européia o REACH (Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas) por ser carcinogênica, muito persistente, bioacumulável e tóxica (Burke, 2009). Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) pode causar mal formação congênita em fetos, desordens reprodutivas, com relatos de genotoxicidade em humanos (Kleinsasser et al., 2001, 2000a).

Tabela 2- Relação dos componentes comumente encontrados nos bastões de luz química e sua função na reação do sistema peróxi-oxalato de acordo com fichas de dados de segurança, patentes e pesquisas.

Componentes	Função	Citação
Tubo de polietileno	Contém os componentes dos bastões de luz química	Zila Technical, Inc. (2005) Omniglow Corporation (2003) Axford I., LFX/40/110 E ² (1999)
Dimetil ftalato (DMP)	Solvente	Zila Technical, Inc. (2005) Pedersen et al. (2003) American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987) Omniglow Corporation (1997, 2003) American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971)
Dibutil ftalato (DBP)	Solvente	Zila Technical, Inc. (2005) Pedersen et al. (2003) Axford I., LFX/40/110 E ² (1999) American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987) Nanjing Sinoglow Industrial Co., Ltda(2008)*
Butil benzil ftalato (BBP)	Solvente	Nanjing Sinoglow Industrial Co., Ltda(2008)*
Di (2-etilhexil) ftalato (DEPH)	Solvente	Nanjing Sinoglow Industrial Co., Ltda(2008)*
Dietil ftalato (DEP)	Solvente	Albertin et al., 1998
Álcool tert-butílico	Solvente	Zila Technical, Inc. (2005) American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987) Omniglow Corporation (1997, 2003)
Octanol	Solvente	American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971)
Dietil éter	Solvente	American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971) Ermoshkin et al., 2006
Acetato de etila	Solvente	American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971)
Peróxido de hidrogênio	Oxidante	Bartoloni et al., 2010 Zila Technical, Inc. (2005) American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987) Omniglow Corporation (1997, 2003) Wang et al, 2009 American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971) Albertin et al., 1998
Oxalato de bis (2-carbopentiloxi-3,5,6-triclorofenila) (CCPO)	Reação de quimiluminescencia	Axford I., LFX/40/110 E ² (1999) Wang et al, 2009 American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987)
Oxalato de bis (2,4,6-triclorofenila) (TCPO)	Reação de quimiluminescencia	Bartoloni et al., 2010 American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971) Ermoshkin et al., 2006
Bis (2-nitrofenil) oxalato	Reação de quimiluminescencia	American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971)
Bis (2,4-dinitrofenil) oxalato (DNPO)	Reação de quimiluminescencia	American Cyanamid Company, Pat.3584211 (1971) Ermoshkin et al., 2006
Composto triclorado	-	Pedersen et al (2003)
5,12-bis(feniletinil)naftacene	Ativador	Coleman (2009)
1,3-difenil-isobenzofurano	Ativador	Albertin et al., 1998
9,10-Bis(feniletinil)antraceno	Ativador	Axford I., LFX/40/110 E ² (1999) Wang et al, 2009 Albertin et al., 1998
9,10-difenil-antraceno (DPA)	Ativador	Albertin et al., 1998
Salicilato de sódio	Catalisador	American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987) Wang et al, 2009
5-clorosalicilato de sódio	Catalisador	American Cyanamid Company, Pat.4,640,193 (1987)
Imidazol (IMI-H)	Catalisador	Bartoloni et al., 2010 Albertin et al., 1998

* Identificado no líquido viscoso amarelo

Os problemas associados ao lixo marinho levaram a criação de protocolos internacionais com o intuito de prevenir os aportes, sendo que o mais importante foi o Protocolo da Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Embarcações de 1978 (conhecida pela sigla MARPOL). Nessa convenção, os resíduos sólidos foram considerados um dos cinco maiores problemas referentes à saúde dos oceanos (Santos et al., 2008). Devido a ausência da facilidade de recepção de lixo na maioria dos portos, associada a falta de fiscalização e multas para navios “faltosos”, após sua utilização estes dispositivos freqüentemente são perdidos ou descartados no oceano ao longo da costa brasileira, podendo ser levados pelos ventos e marés até as praias onde poderão causar danos ambientais (Santos et al., 2005), contrariando assim, o anexo V da MARPOL 73/78.

Não apenas centros de pesquisas, mas algumas ONGs como a Global Garbage estão tentando viabilizar financeiramente análises mais detalhadas do produto. Apesar de vários estudos do sistema peróxi-oxalato desde a década de 60, devido ao seu alto rendimento quântico de quimiluminescência e ao fato de poder ser usado em grande variedade de aplicações analíticas, seu mecanismo ainda não foi completamente estabelecido, principalmente no que diz respeito a estrutura dos intermediários de alta energia e ao passo da excitação eletrônica (Stevani & Baader, 1999).

Os ativadores das reações que ocorrem dentro dos bastões de luz química são compostos considerados altamente tóxicos pois são, na maioria dos casos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o antraceno e seus derivados. Esta classe de substâncias sofre ativação e conversão metabólica em agentes tóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (Melo, 1999; Solberg *et al.*, 1987). De modo geral, esses compostos são de difícil degradação e se acumulam no ambiente e nos organismos com os quais entram em contato.

Como resultado da reação de quimiluminescência dos bastões de luz química é provável a produção de vários intermediários, e outros compostos, como hidroperóxi-oxalatos (Milofsky & Birks, 1991; Choksi *et al.*, 1990). Entretanto, ainda não há dados na literatura científica sobre os mecanismos de ação de clorosalicilatos como os gerados nas reações quimiluminescentes de bastões de luz química (Bechara *et al.*, 2009).

Os dispositivos de luz química são praticamente não-biodegradáveis devido ao plástico utilizado na sua construção. Esse fato tem criado problemas e preocupações por envolver o uso de grandes quantidades de sinalizadores que ficam dispersos no ambiente, persistindo ao longo de

décadas ou mais. Uma possível solução para o problema seria utilizar recipiente e conteúdo que fossem biodegradáveis. Em relação ao recipiente isto é possível, de acordo com a patente de Cranor Earl CA 2478069 (<http://wikipatents.com>). Quanto ao conteúdo, o processo é mais complexo, pois deve ser eficiente na produção de luz, sem colocar em risco a saúde humana e do ambiente.

Nos bastões de luz química que apresentam embalagem, estas trazem informações quanto a sua não toxicidade (Figura 5). Entretanto, no trabalho de Pinho *et al.* (2008) o conteúdo dos bastões se mostrou tóxico tanto na sobrevivência de náuplios como no processo de eclosão dos cistos de *Artemia sp.* Para os náuplios, o CL_{50} (concentração letal do contaminante que causa mortalidade em 50% da população exposta) foi de $0,063 \text{ mL L}^{-1}$ e o CEO (menor concentração de efeito observado) de $0,04 \text{ mL L}^{-1}$. Baseado neste estudo, Pinho *et al.* (2008) sugeriram que o conteúdo do bastão é potencialmente perigoso para o ambiente marinho. Porém, é muito instável em condições ambientais, podendo assim acarretar sua ausência na sua forma original após horas ou dias de exposição. Ribeiro e Hans (2010) consideraram o líquido contido nos bastões coletados nas praias potencialmente tóxico por causar efeitos deletérios no desenvolvimento embrio larval dos ouriços do mar *Echinometra lucunter* ($CE_{50-36h} = 0,062\%$) e *Litechinus variegatus* ($CE_{50-24h} = 0,0285\%$).



Figura 5 –Tipos de bastões de luz química com embalagem encontrados a venda em lojas de pesca de Salvador-BA.

Outro aspecto preocupante é que muitos tipos de bastões de luz química estão sendo comercializados com composição diferente dos já conhecidos (de patentes e fichas de segurança de empresas que comercializam estes bastões), e dos quais se tem pouca informação. A depender do fabricante, pode haver diferenças nos componentes necessários para a reação de quimiluminescência. A maior parte dos bastões comercializados nas lojas de pesca em Salvador (Figura 6) não apresentam embalagem, não havendo assim nenhum tipo de informação quanto a sua origem; quanto aos que apresentam embalagem (Figura 5), esses são vendidos geralmente por unidades e, além de não apresentarem informações quanto a sua constituição, muitas vezes só indicam a importadora, não sendo possível identificar a marca. Como os bastões não apresentam nenhum tipo de identificação, fica difícil responsabilizar o fabricante se houver algum tipo de dano ambiental ou à saúde humana.



Figura 6- Tipos de dispositivos de luz química vendidos em Salvador-BA.

1.4- Características e efeitos registrados dos principais contaminantes encontrados nos bastões de luz química

1.4.1- Ftalatos

Os ésteres de ácidos ftálicos, conhecidos como ftalatos, são substâncias orgânicas derivadas do ácido 1,2-benzeno dicarboxílico. Constituem um grupo de compostos químicos inertes e hidrofóbicos derivados do ácido ftálico, utilizados como aditivos para deixar o plástico mais maleável (Mozeto & Zagatto, 2008; Fontenele *et al.*, 2010). São produzidos comercialmente

a partir do anidrido ftálico (obtido por oxidação do naftaleno) e álcoois, por processos convencionais de esterificação (Loureiro, 2002). São amplamente utilizados nas mais diversas atividades industriais, podendo-se citar: produção de plásticos, principalmente de policloreto de vinila (PVC), vernizes, resinas, papéis de embrulho, entre outros (Junior & Brito, 2006). Esses plastificantes não estão ligados de forma irreversível ao polímero produzido, podendo migrar para o ambiente, dependendo das condições de disposição (Salazar *et al.*, 2004). Devido a sua persistência no meio ambiente, os ftalatos são comumente encontrados em águas superficiais e de subsolo (Fromme *et al.*, 2002; Hutchins & Ward, 1984).

Ésteres de ácido ftálico têm ponto de ebulição variando entre 230°C até 486°C (Staples *et al.*, 1997). Dentre os ftalatos existentes, o di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) é um dos mais difíceis de serem biodegradados (Tabela 3). A solubilidade em água é uma propriedade extremamente importante que influencia a biodegradação e o potencial de bioacumulação das espécies químicas, além da toxicidade aquática (Staples *et al.*, 1997). O DEHP apresenta massa molar de 390,56 g mol⁻¹, ponto de ebulição de 384°C, e solubilidade em água de 0,285 mg L⁻¹ a 24°C (Lide, 1999).

Tumores de fígado e testículos em ratos, foram induzidos por exposições de longa duração ao DEHP. Em humanos, a toxicidade destes plastificantes leva a problemas hepáticos (Latini *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 1998;). As células de linfócitos humanos e de mucosas do trato aerodigestório, sofreram dano no DNA por exposição a este ftalato (Kleinsasser *et al.*, 2001, 2000a). Nos Estados Unidos, a *US Consumer Product Safety Commission* considerou o DEHP um produto carcinogênico ao ser humano (Souza *et al.*, 2009). Os organismos aquáticos e vários tipos de peixes podem acumular DEHP por fatores de até 4000 vezes, sugerindo uma maior susceptibilidade à bioacumulação, em relação aos mamíferos (Brown *et al.*, 1996).

Devido ao fato dos ftalatos trazerem riscos a saúde humana, diversos órgãos ambientais estabeleceram limites máximos para a concentração desses compostos. A União Europeia publicou uma lista de substâncias com evidências ou potencial interferência endócrina, nela estão incluídos o DBP e o DEHP, e juntamente com a Organização Mundial da Saúde estabeleceram o valor máximo de 8,0 µg L⁻¹ em água potável (EU Council, 2001; WHO, 2003). Para o DEHP, um dos ftalatos mais produzidos em todo o mundo, a USEPA recomenda a presença de concentrações inferiores a 6,0 µg L⁻¹ possa estar presente na água tratada (USEPA, 1991).

O dibutil ftalato (DBP) é usado em resinas epóxi, ésteres de celulose e formulações adesivas especializadas. O DBP apresenta massa molar de 278,3 g mol⁻¹, ponto de ebulição de

340°C, e solubilidade em água de 13 mg L⁻¹ (Pedersen *et al.*, 2003). É classificado como perigoso ao ambiente e muito tóxico para organismos aquáticos (Sigma-Aldrich, 2010). Segundo Thurèn (1986), DBP é bioacumulado por organismos de água salgada após 24 horas de exposição, sendo bioacumulado 41,6 e 30,6 vezes pela ostra e camarão, respectivamente. Os organismos aquáticos usados em testes de toxicidade demonstraram toxicidade elevada, como no teste de Microtox (Tarkpea *et al.*, 1986), em algas de água doce e dinoflagelados (Yan *et al.*, 1995; Kühn & Pattard, 1990; O'Connor *et al.*, 1989; Acey *et al.*, 1987; Yoshioka *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1978); e em microcrustáceos marinhos como misidáceos, artemias, anfípodas e copépodos harpacticóides (Lindén *et al.*, 1979; Mayer & Sanders, 1973). Estudos sugerem a má formação dos sistemas reprodutores de roedores contaminados por DBP (Salazar *et al.*, 2004). Mesmo em pequenas concentrações, quando em contato com a pele, causa irritação, queimaduras e coceiras e, quando ingerido, causa irritação no trato gastrointestinal, náuseas, vômitos, diarreia, dor de cabeça e fraqueza (Elsisi *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1987; Kawano, 1980; Tomita *et al.*, 1977; Williams & Blanchfield, 1975).

O dimetil e dietil ftalatos são usados tipicamente em plásticos a base de ésteres de celulose (Staples *et al.*, 1997). O dimetil ftalato (DMP) apresenta massa molar de 194,2 g mol⁻¹, com ponto de ebulição de 283,7°C e solubilidade em água de 4 g L⁻¹ (Pedersen *et al.*, 2003). O dietil ftalato (DEP) apresenta massa molar de 222,24 g mol⁻¹, com ponto de ebulição de 299°C (Sigma-Aldrich, 2010) e solubilidade em água de 1100 mg L⁻¹ (Harris & Sumpter, 2001). Dados obtidos a partir de experimentos com animais de laboratório (ratos e camundongos), tratados com dialquilftalatos e seus homólogos, têm demonstrado que causam danos na reprodução, afetando testículos, útero e o desenvolvimento dos organismos. Além disso, são suspeitos de interferir no sistema endócrino (Kim *et al.*, 2004).

Em brinquedos e artigos para bebês, testes mostraram que os ftalatos podem ser disponibilizados na saliva das crianças e serem ingeridos por elas (Fernández *et al.*, 2005). Nesta fase os seres humanos são mais suscetíveis aos efeitos endócrinos desses compostos, uma vez que seu sistema reprodutor ainda está em formação. Os sistemas reprodutor, nervoso e imunológico são os principais alvos dos interferentes endócrinos. Estudos observacionais sugerem que os ftalatos apresentam ação antiandrogênica em humanos (Fontenele *et al.*, 2010), como relatado por Main *et al.* (2006) que demonstraram uma associação inversa dose-dependente entre ftalatos no leite materno e níveis de testosterona em meninos aos três meses de idade.

No trabalho de Liu *et al.* (2009) foi avaliada a toxicidade de sete esteres ftalatos através de testes de toxicidade com desenvolvimento embrionário e larval do abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. Através da análise dos valores de CE_{50} obtidos, os resultados demonstraram o grau de toxicidade na seguinte ordem: butil benzil ftalato (BBP) > di-n-hexil ftalato (DNHP) > dibutil ftalato (DBP) > dietil ftalato (DEP) > dimetil ftalato (DMP) > di-n-octil ftalato (DOP) > di(2-etilhexil) ftalato (DEHP). Portanto, dentre os ftalatos estudados o butil benzil ftalato (identificado como um dos solventes usado nos tubos de luz química) foi o que apresentou maior toxicidade. Testes de toxicidade realizados por Yang *et al.* (2009), avaliando o efeito do DBP, DEP, DMP e DEHP no desenvolvimento embrionário e larval do abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, demonstraram o mesmo resultado. A tabela 3 apresenta uma relação de ftalatos com identificação química, propriedades físico-química e toxicidade calculada em relação a CL_{50} de testes de toxicidade com peixes, segundo Netzeva & Worth (2007).

Tabela 3- Identificação química, propriedades físico-químicas e toxicidade. CAS significa número do *Chemical Abstract Service*, MW é a massa molecular, WSol é a solubilidade em água, Log K_{ow} é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

Substância	CAS	MW	WSol (mg L ⁻¹)	Log K_{ow}	Classificação da toxicidade
1-butil 2-ciclohexil ftalato	84640	304,39	0,28	5,41	Muito Tóxico
Dietil ftalato	84662	222,24	1080,00	2,42	Nocivo
Diisobutil ftalato	84695	278,35	6,20	4,11	Tóxico
Dibutil ftalato	84742	278,35	11,20	4,50	Tóxico
Butil 2-etilhexil ftalato	85698	334,46	0,02	6,50	Muito tóxico
Di (2-etilhexil) ftalato	117817	390,57	0,27	7,60	Tóxico
Dimetil ftalato	131113	194,19	4000,00	1,60	Nocivo
Mono (2-etilhexil) ftalato	4376209	278,35	14,90	4,73	Nocivo

Fonte: Netzeva & Worth (2007)

A fotodegradação via ataque por radical livre deve ser a forma dominante de degradação de ésteres ftalatos na atmosfera, com previsão de meia-vida de aproximadamente um dia para a

maioria. Além disso, numerosos estudos indicam que ftalatos são degradados por ampla variedade de bactérias e actinomicetos, tanto em condições aeróbicas, quanto anaeróbicas (Staples et al, 1997).

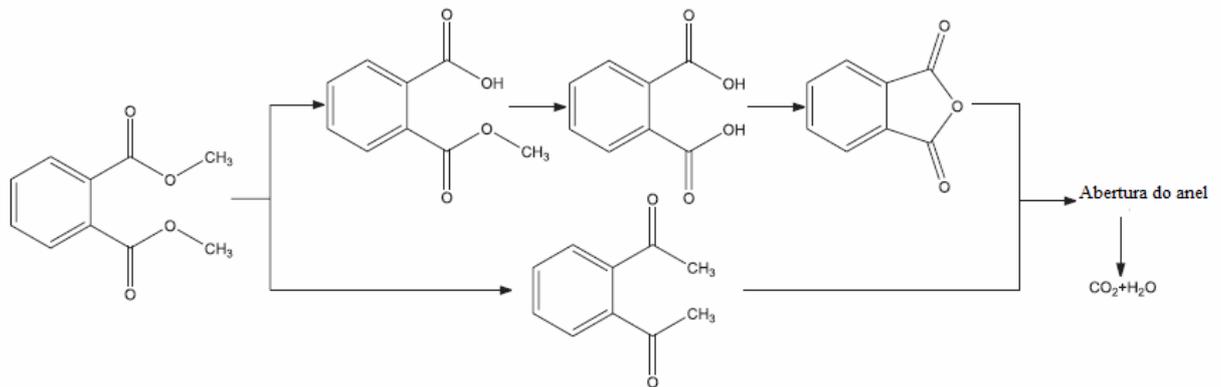


Figura 7 – Proposta do mecanismo de degradação do DMP pelo processo de microondas e fotodegradação (Liao & Wang, 2009).

Ftalatos são susceptíveis a hidrólise, todavia em baixas taxas. Segundo Liao e Wang (2009), pelo sistema de microondas e fotodegradação, a maioria dos intermediários do processo de degradação do DMP é formada pelo ataque de radicais hidroxila na sua cadeia alquílica, e devido às diferentes posições deste ataque, diferentes intermediários são produzidos (Figura 7).

Os produtos de hidrólise são o ácido ftálico e álcoois. Ftalatos podem passar por duas etapas hidrolíticas, produzindo primeiramente um monoéster e uma molécula livre de álcool e na segunda etapa da hidrólise o ácido ftálico e a segunda molécula de álcool (Staples et al, 1997). A hidrólise de ésteres pode ser catalisada por ácidos e bases, bem como por íons de metais, ânions, ou substâncias orgânicas (Harris, 1982). Os ésteres de ftalatos são hidrolisados em taxas insignificantes em pH neutro (Staples et al, 1997). A hidrólise ácida é possível, mas se estima em quatro ordens de magnitude menor do que a velocidade de hidrólise alcalina (Mabey et al, 1982). O pH médio da água de superfície do oceano é cerca de 8,1 (Baird, 2002); como ecossistemas marinhos normalmente apresentam um pH básico espera-se que estas reações de hidrólise sejam frequentes. Vários experimentos demonstram que a bioacumulação de ésteres de ftalatos na cadeia alimentar aquática e terrestre é limitada por biotransformações, que aumentam progressivamente com o nível trófico (Staples et al, 1997). Espécies de algas e invertebrados podem bioconcentrar ftalatos mais facilmente que os vertebrados por apresentarem diferenças no

metabolismo (Van Wezel et al., 2000). De acordo com o estudo de Wofford *et al.*(1981), a biotransformação de ésteres de ácido ftálico aumenta da seguinte maneira: moluscos < crustáceos < peixes. Portanto, espera-se que concentrações de ésteres de ácido ftálico diminua à medida que se avança na cadeia alimentar (Staples et al., 1997). Este padrão inverso foi observado em outras classes de compostos químicos orgânicos metabolizáveis, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (McElroy et al ,1989).

1.4.2- Compostos Aromáticos

Os compostos aromáticos contêm um ou mais anéis de átomos de carbono em estruturas similares a do benzeno. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são formados por dois ou mais anéis benzênicos ordenados de forma linear, angular ou agrupada, sendo hidrofóbicos e bastante resistentes à biodegradação microbiológica, e, portanto, consideravelmente persistentes no ambiente. A pressão de vapor dos HPA contribui para a sua distribuição ambiental entre ar-água-solo e, também, entre a fase gasosa e aerosol na atmosfera (Bidleman, 1988; Finlayson-Pitts & Pitts Jr., 1986; Sonnefeld et al, 1983). Segundo Lopes & de Andrade (1996), a grande variação dos HPA nas faixas de pressão de vapor (da ordem de 10^7) é refletida no fato de que, no ar ambiente, a 25°C, o naftaleno existe virtualmente (100%) na fase vapor, enquanto o BaP (benzo[a]pireno) e outros HPA de 5 ou mais anéis estão predominantemente adsorvidos em material particulado atmosférico. Os HPA de pressão de vapor intermediária (3 e 4 aneis) estão distribuídos em ambas as fases. De acordo com MacKay & Shiu (1977), a solubilidade em água também afeta a distribuição entre ar-água-solo, apesar da baixa solubilidade dos HPA em água pura. Contudo, a oxidação pode ser acelerada em espécies mais polares devido ao aumento de sua solubilidade (Finlayson-Pitts & Pitts Jr., 1986).

Os HPA, após transformação química ou metabólica, são eficazes agentes cancerígenos e/ou mutagênicos (Selkirk, 1980). Comprovadamente, alguns HPA apresentam atividade cancerígena e mutagênica, pois provocam tumoração em animais e mutação em bactérias (Moreira & Barek, 1995; Selkirk, 1980; Pitts et al., 1978). Entre seus efeitos nocivos também tem sido mencionado o seu potencial como disruptores do sistema endócrino. A ação danosa dos HPA sobre os organismos vivos pode ser exercida diretamente e, principalmente, através de seus derivados, muitos deles ainda desconhecidos (Lopes & de Andrade, 1996).

Segundo Johnson et al. (1977), tumores em organismos marinhos, como moluscos e briozoários, estão associados à contaminação por hidrocarbonetos aromáticos e poliaromáticos. Em seres humanos, foi comprovada por Cole (1979) a tendência destes compostos serem incorporados nos tecidos adiposos e de causarem danos em órgãos como fígado e rins. Distúrbios no fígado e sistema imunológico, leucemia, câncer e tumores no pulmão e estômago são alguns dos efeitos reportados destes compostos (CETESB, 2005). Durante a transformação enzimática, certos HPA são convertidos em compostos altamente reativos, que podem formar ligações covalentes com macromoléculas, como proteínas e DNA, modificando-as. O DNA modificado tende a evoluir, provocando disfunções bioquímicas, gerando mutações, malformações e desenvolvimento de tumores (Neilson, 1998).

O mecanismo de toxicidade dos HPA se baseia em interferências nas funções da membrana celular e nos sistemas de enzimas associados a esta membrana (Albers, 1994). Os HPA não transformados são relativamente inertes e a toxicidade aparece após um processo de ativação, que pode ser produzido através de um processo metabólico ou por efeito da luz. Os HPA tem muita afinidade pelos lipídios, fazendo com que tenham tendência a se acumular no tecido adiposo dos organismos marinhos. Na literatura, são citados valores que variam entre 0,01 e 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para HPA individuais (Kennish, 1997). Esta diferença se deve fundamentalmente à distinta capacidade que os organismos têm para metabolizá-los, mediante o sistema oxidase de função mista (MFO). Entre os invertebrados marinhos que tem menor capacidade para transformar HPA encontram-se os bivalves e, por isso, costuma-se utilizá-los como organismos sentinelas (Martins et al, 2005; Kira et al, 2000; Baumard et al, 1998). Por outro lado, outros grupos, como peixes e crustáceos, que tem o sistema MOF bem desenvolvido, só acumulam HPA quando habitam zonas muito contaminadas. Quanto maior for a massa molecular do composto, maior será a toxicidade (Bícego et al., 2008). Entretanto, na água, os compostos com menor massa molecular causam mais danos devido à maior solubilidade e, portanto, maior disponibilidade. Para muitos organismos, os HPA de baixa massa molecular (2-3 anéis benzênicos) podem apresentar toxicidade aguda, porém, um baixo potencial cancerígeno. No que se refere aos organismos aquáticos, a baixa toxicidade aguda dos hidrocarbonetos de maior massa molecular se deve provavelmente ao fato de que à medida que o mesmo aumenta, sua solubilidade diminui, e a sua concentração na água não é suficiente para causar efeitos letais nos

organismos planctônicos. Contudo, a exposição dos organismos a baixas concentrações de HPA de alta massa molecular produz efeitos subletais (Albers, 1994).

Segundo Neilson (1998), a exposição à luz UV pode aumentar a toxicidade de certos HPA. Isto foi observado em diversos organismos como na alga *Selenastrum capricornutum* (Valério & Lazzarotto, 1985; Tanner & Fajer, 1983) e nos microcrustáceos *Daphnia magna* (Alebic-Juretic et al., 1990) e *Artemia salina* (Chmielowiec & George, 1980).

O tipo de reação que um HPA pode experimentar depende de sua própria estrutura e das espécies com quem interage (Dewar, 1952). As posições em que ocorrem as reações são determinadas pela estabilidade das espécies intermediárias, sendo mais reativas aquelas adjacentes à fusão dos anéis, por serem energeticamente favorecidas (Lopes & de Andrade, 1996). Por exemplo, as reações em HPA lineares, como o antraceno, ocorrem nas posições 9 e 10, denominadas de região L (Figura 8).

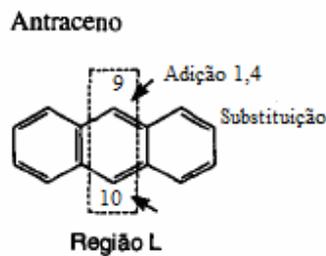


Figura 8- Posições mais reativas do antraceno (Lopes & Andrade, 1996).

No meio marinho, os principais processos de degradação dos HPA são a oxidação fotoquímica e a transformação biológica. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos absorvem fortemente na região do UV acima de 300nm (presente na radiação solar) e muitos deles são rapidamente fotooxidados. Este é, provavelmente, um dos principais processos de remoção de HPA da atmosfera, juntamente com a deposição úmida (Lopes & de Andrade, 1996). A reação mais comum dos HPA em solução é a formação de endoperóxidos. Na figura 9 é possível verificar como o 9,10-dimetilantraceno reage com O_2 em presença de luz, fornecendo o correspondente 9,10-endoperóxido (Fox & Olive, 1979; Natusch & Wallace, 1974; Southern & Waters, 1960).

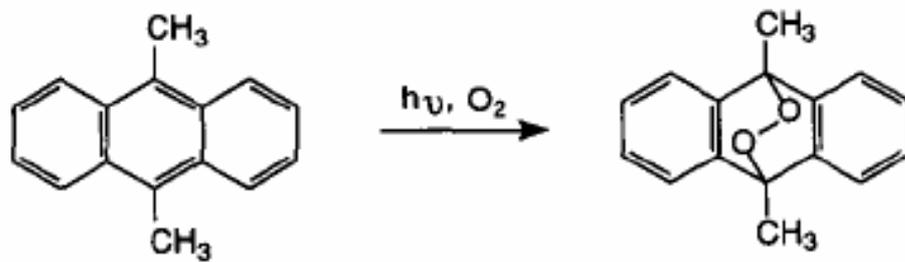


Figura 9- Esquema da reação de fotooxidação do 9,10-dimetilantraceno em solução (Lopes & Andrade, 1996).

Nos sedimentos estes processos de degradação são limitados pela falta de luz na oxidação fotoquímica e pela falta de oxigênio na transformação biológica. Assim, em determinadas condições ambientais, os HPA podem persistir durante longos períodos de tempo. Contudo, nem todos têm a mesma meia-vida, pois esta aumenta com a massa molecular; os HPA de alta massa molecular são fortemente adsorvidos aos sedimentos, persistindo por muitos anos no ambiente (Genthner et al, 1997).

O processo de oxidação pela perda de elétron é comum em alguns HPA. Os cátions-radicaís formados são bastante instáveis e reagem rapidamente com água e outros nucleófilos, fornecendo produtos de oxidação (Adams, 1969; Weinberg & Weinberg, 1968). Os HPA, principalmente os mais pesados (maior número de anéis), são extremamente sensíveis à oxidação e substituição eletrofílica. Óxidos de nitrogênio e ácido nítrico diluído podem interagir com HPA resultando em reações de adição, substituição ou oxidação. O antraceno é facilmente oxidado por ácido nítrico diluído ou óxidos de nitrogênio, fornecendo a antraquinona. Pela ação do NO_2 o antraceno é convertido em 9-nitroantraceno (Figura 10). O Benzo[a]pireno (BaP) é rapidamente nitrado com ácido nítrico diluído em ácido acético ou benzeno, à temperatura ambiente, fornecendo o derivado mononitrado como produto principal (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, 1983).

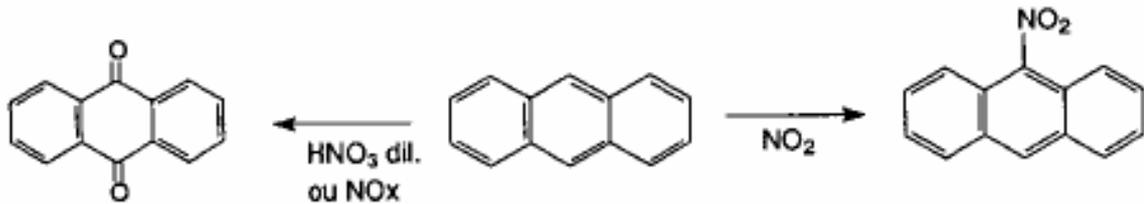


Figura 10 – Esquema da reação do antraceno com HNO_3 e com NO_x (Lopes & Andrade, 1996).

O alto grau de mutagenicidade dos nitroderivados de HPA, aliado à constatação de que muitos deles são amplamente distribuídos no ambiente, resultou em crescente interesse pelas reações entre esses hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio (Lopes & de Andrade, 1996).

As zonas costeiras e os estuários são os mais afetados pela contaminação por hidrocarbonetos. Além disso, representam a área onde se realiza a maior parte das capturas pesqueiras. O impacto dessa contaminação pode trazer alterações à biota local, uma vez que todos os organismos são suscetíveis aos hidrocarbonetos (Caprez et al., 2000). Eles podem também afetar a qualidade dos produtos pesqueiros, gerando riscos à saúde humana e prejuízos econômicos.

1.4.3- Compostos Clorados

Os compostos clorados são considerados Compostos Orgânicos Persistentes (COPs), que correspondem a substâncias orgânicas resistentes a degradação fotolítica, química e biológica, apresentando assim elevada persistência no ambiente. Os organoclorados apresentam elevada lipossolubilidade, permitindo que sejam acumulados nos tecidos adiposos dos organismos, mediante processos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação (Miranda Filho *et al.*, 2008; Pozo, et al., 2003; Fenícula & Oliveira, 2002). Os clorofenóis, compostos aromáticos halogenados, derivados de hidrocarbonetos aromáticos, com um ou mais hidrogênios substituídos por grupos $-\text{OH}$, também identificados como um dos componentes presentes em bastões de luz química, são uma preocupação do ponto de vista ambiental, devido às suas propriedades tóxicas, bioacumulação e persistência no ambiente (Rodrigues, 2004). Os clorofenóis são reconhecidamente substâncias muito tóxicas interferindo na sobrevivência de organismos devido ao seu potencial genotóxico. Como exemplo, o pentaclorofenol (PCF) provoca a atrofia da medula óssea, cirrose hepática e desordens nervosas. Smith et al. (1984) relataram a indução de sarcoma de tecido mole em indivíduos expostos a fenoxi herbicidas e clorofenóis. Dioxinas e

furanos são suspeitos de serem desreguladores endócrinos, podem ser produzidos durante a incineração de hidrocarbonetos clorados e do papel, na produção de PVC e de compostos aromáticos clorados, como o 2,4,5-triclorofenol (Bila & Dezotti, 2007). O 2,4,6-triclorofenol ($C_6H_3Cl_3O$) apresenta massa molecular de 197, com massa molecular de 288,38, log Kow de 3,38, e tem se mostrado carcinogênico em animais, produzindo linfomas, leucemia e câncer de fígado através da exposição oral (EPA, 2010). A EPA o classificou como provável carcinógeno humano. Pesquisas mostram que essas substâncias persistem e bioacumulam no meio ambiente (Louie & Sin, 2003).

1.5- Métodos para análise de compostos químicos

A escolha da melhor técnica de extração é a primeira etapa de grande importância para a análise dos compostos químicos. A extração com solvente apresenta várias desvantagens, como lentidão no processo, gasto de solventes aumentando o custo do processo além do perigo causado pela sua toxicidade, podendo ainda interferir na análise dos componentes. Apesar destas desvantagens, a extração com solventes a exemplo da extração líquido-líquido, ainda continua sendo muito usada, pois possui como vantagens a alta reprodutibilidade e menor risco de decomposição térmica dos analitos em comparação com determinadas técnicas de extração (Velo, 2005), como na microextração em fase sólida (SPME) e no *headspace* sem o uso de solvente.

1.5.1- Extração em fase sólida (SPE)

O princípio geral da extração por fase sólida (SPE) é baseado na distribuição diferencial de um ou mais analitos entre duas fases imiscíveis, líquido-sólido ou gás-sólido (Rocha Filho *et al.*, 1980). A primeira aplicação experimental da SPE ocorreu na década de 1950, quando foram utilizados cartuchos contendo carvão ativo para isolar compostos orgânicos a partir de matrizes aquosas, em análises toxicológicas (Liska, 2000). A aceitação rápida (a partir de 1986) e cada vez mais abrangente da SPE para o tratamento de amostras, reside no fato de que esta técnica permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e pré-purificação

(Aquino Neto & Nunes, 2003). A SPE sofreu um considerável avanço nos últimos anos, e tem sido aplicada com uma grande frequência na análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) em alimentos (Velo, 2005).

Segundo Aquino Neto & Nunes (2003), a aplicação da SPE implica na percolação da amostra através de sorvente, quando componentes da amostra são eluídos e os analitos ficam retidos. Pode-se lavar o sorvente que contém os analitos com um ou mais solventes. Em geral, os procedimentos de SPE contêm 5 etapas: i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; ii) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar a força do solvente de eluição com a do solvente da amostra; iii) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; iv) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e coleta do analito (Lingeman e Hoekstra-Oussoren, 1997).

Na fase sólida, contida em uma microcoluna ou cartucho, têm sido empregados vários tipos de materiais (como por exemplo, Tenax, octadecilsilano, etc). As etapas no procedimento de extração envolvem o condicionamento do cartucho (ativação do sorvente), a adsorção/partição dos compostos voláteis pela passagem da amostra e a remoção dos analitos adsorvidos por processo térmico ou com solventes.

1.5.2- Extração líquido-líquido (LLE)

Na extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (Queiroz *et al.*, 2001). Continua sendo muito empregada por ser uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada e é de fácil execução (Vieira *et al.*, 2007). Em um funil de separação adiciona-se a amostra e o solvente, essa mistura é agitada vigorosamente e posteriormente é deixada em repouso até separação completa das fases para coleta da fase orgânica a ser concentrada e analisada. A LLE é considerada uma técnica clássica de preparação de amostras e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (Queiroz *et al.*, 2001). Pode-

se destacar duas técnicas para a extração líquido-líquido, a contínua e a descontínua. No método descontínuo não é conveniente separar as substâncias da mistura com muito solvente de uma só vez. O melhor é repetir a operação várias vezes com pequenas porções do solvente, sempre puro, para garantir um maior rendimento na extração. O método contínuo de extração é usado quando a solubilidade da amostra é maior na água. Caso contrário, como o solvente orgânico passa continuamente, seria preciso empregar grandes quantidades do solvente nas sucessivas extrações.

1.5.3- *Headspace* (HS)

Headspace é o termo usado para designar a fase vapor que se encontra imediatamente acima de uma matriz sólida ou líquida. Deste modo, esta técnica desenvolvida na década de 60 do século XX (Buttery & Teranishi, 1963) consiste em analisar a fração dos compostos orgânicos voláteis (COVs) que é transferida para a fase vapor, e que leva a um enriquecimento dos analitos e, em consequência a uma melhoria na sensibilidade pela diminuição dos limites de detecção (Veloso, 2005).

Existem duas formas de aplicação desta técnica: o *headspace* estático e *headspace* dinâmico.

O *headspace* estático é um método direto de extração, onde os analitos voláteis da matriz se distribuem em equilíbrio a uma temperatura constante, entre as duas fases (vapor e sólida/líquida) em um recipiente de vidro hermeticamente fechado com um septo polimérico. Após um tempo de equilíbrio pré-determinado, uma pequena quantidade de vapor é removida do *headspace* através do septo usando-se uma microseringa de vidro (*gastight*), apropriada para análise de gás.

Por sua vez, no *headspace* dinâmico a matriz líquida ou sólida é purgada continuamente com um gás inerte e os analitos são extraídos e transportados, a partir desta, por meio do gás, para um sorvente com alto poder de retenção que funciona como o “capturador”(Veloso, 2005). Os COVs podem ser removidos pelo emprego de solvente ou aquecimento. A vantagem da dessorção por aquecimento sobre a dessorção com solventes é a não diluição dos componentes, havendo um ganho na sensibilidade. Porém, pode ocorrer reações entre analito / sorvente ou entre os analitos, nas temperaturas requeridas no processo, e apenas uma análise pode ser feita a partir da extração.

1.5.4- Microextração em fase sólida (SPME)

Nesta técnica o componente principal é um suporte sólido, constituído por uma seção de fibra de sílica fundida com aproximadamente 1-2cm da sua extremidade terminal, recoberta com uma fase extratora imobilizada que pode ser exposta a uma matriz líquida, sólida ou gasosa, por um período de tempo pré-determinado. Após a extração, os analitos extraídos e concentrados na fibra são desorvidos termicamente, em um injetor de um cromatógrafo a gás, normalmente no modo sem divisão de fluxo (*splitless*) ou são desorvidos com uma pequena quantidade de solvente e transferidos para a válvula de injeção de um cromatógrafo a líquido (Chen & Pawliszyn, 1995).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração relativamente recente, desenvolvida no final da década de 1980 por Pawliszyn e colaboradores, que pode ser usada em conjunto tanto com a GC quanto com a HPLC (Belardi & Pawliszyn, 1989; Catherine & Pawliszyn, 1990). O procedimento analítico do método de SPME é mais simples e mais rápido que a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Em geral, extratos mais limpos são obtidos e não se usam solventes para a eluição. Por outro lado, o analito necessita ser volátil e termicamente estável para ser desorvido e determinado por GC.

A SPME foi inicialmente descrita para extração e pré-concentração de poluentes orgânicos em águas. Posteriormente, teve a sua utilização expandida para extração de analitos voláteis e semi-voláteis de diversas matrizes, tais como: fluidos biológicos (Queiroz et al., 2001), amostras ambientais gasosas (Menezes Filho et al., 2010a; Koziel et al., 2001), farmacêutica (Bicchi et al, 2000) e principalmente, de acordo com os vários trabalhos publicados, alimentos e bebidas (Menezes Filho et al., 2010b; Kataoka et al., 2000; Yang & Peppard, 1994).

Na microextração em fase sólida feita por imersão direta (DI-SPME) a fibra é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente desta para a fase extratora. Outra forma de realizar o procedimento de microextração em fase sólida é através de amostragem no espaço confinado (HS-SPME). Neste caso, a amostra é frequentemente aquecida e os compostos voláteis são retidos na fibra sem que esta tenha contato direto com a amostra.

1.5.5- Separação e identificação dos compostos

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra através da distribuição destes entre duas fases, uma que permanece estacionária e a outra que se move através dela em uma direção definida (fase móvel). A separação cromatográfica se dá através dos diferentes graus de interação de cada componente da amostra com a fase estacionária e com a fase móvel, a qual pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico. Desta forma, cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos mesmos (Anazawa, 1996).

Na cromatografia gasosa é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente para não se decompor nas condições de separação. Os métodos de detecção utilizados em GC são mais rápidos e sensíveis, a aparelhagem mais fácil de ser manipulada e em geral mais barata que a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Devido à sua simplicidade, sensibilidade e efetividade para separar os componentes de misturas, a cromatografia em fase gasosa é uma das ferramentas mais importantes em química. Como técnica analítica ela depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois quase nenhuma matriz pode ser diretamente injetada num cromatógrafo a gás. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) é uma ferramenta muito utilizada para identificar componentes em misturas orgânicas ou bioquímicas complexas (Collins *et al.*, 2006).

O espectrômetro de massas usado como detector em GC faz a identificação dos compostos orgânicos através de fragmentos ionizados produzidos pelo bombardeio das moléculas, na fase vapor, por um feixe de elétrons de alta energia. Este modo de ionização é denominado impacto de elétrons (EI), e a energia de bombardeamento pode variar de 12 a 100 eV (elétron volt), sendo 70eV a mais comumente empregada.

Imediatamente após a ionização da amostra, os íons moleculares ou os seus fragmentos ionizados entram no setor de análise do espectrômetro de massas, onde serão separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). O analisador mais comumente utilizado em análise não magnética é o analisador de quadropólo. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído na coluna (Braithwaite & Smith, 1999; Silverstein *et al.*, 1994).

1.6- Testes de toxicidade para avaliação de ecossistemas em risco

As técnicas químicas avaliam as concentrações das substâncias, mas não a ação integrada do seu efeito tóxico que só é possível através de técnicas biológicas. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as substâncias, os testes de toxicidade são utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente ao agente tóxico de causar efeito deletério em organismos vivos. A Ecotoxicologia requer uma visão mais ampla do que a simples avaliação de efeitos das substâncias sobre os organismos, sendo fundamental ter conhecimento das fontes de emissão dos poluentes, bem como de suas transformações, difusão, e destinos no ambiente (Zagatto, 2008). Quando associados a um sistema de detecção adequado, os testes ecotoxicológicos possibilitam avaliar o amplo efeito das substâncias presentes sobre os sistemas bióticos (Costa e Espíndola, 2002). Deve-se levar em conta que no meio natural uma substância pode não produzir efeitos adversos sobre uma espécie em particular, mas afeta seus predadores ou sua fonte de alimento, alterando o equilíbrio do ambiente e afetando indiretamente a sobrevivência do organismo.

Segundo Metcalfe (1989), o uso das respostas biológicas como indicadores de degradação ambiental é vantajosa em relação às medidas físicas e químicas da água que registram apenas o momento em que foram coletadas, como numa fotografia, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente. Outra desvantagem é que, se forem feitas longe da fonte poluente, as concentrações das substâncias serão muito baixas; assim, as medições químicas não serão capazes de detectar perturbações sutis no ecossistema que, por sua vez, acarretam alterações no comportamento dos organismos, na taxa de fecundação, entre outras (Pratt e Coler, 1976). Pequenas diferenças físicas e químicas no ambiente e na composição de espécies podem levar a diferenças significativas nos efeitos de um agente tóxico no ambiente (RAND, 1995). Assim, para caracterização adequada e controle de contaminantes, a estratégia mais eficiente é o uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas para avaliação e previsão do risco ambiental (Costan et al, 1993; Bertoletti, 1990;).

Um dos desafios da Ecotoxicologia é identificar os princípios comuns que possam permitir a extrapolação e segura predição dos efeitos de substâncias tóxicas no ambiente, sobretudo quando o dano é insidioso e perceptível somente à longo prazo. Outro desafio é

desenvolver instrumentos técnicos simples e de baixo custo, capazes de detectar respostas biológicas significativas e ainda reversíveis, portanto preventivas, que possam garantir a sustentabilidade do ecossistema (Nascimento et al., 2008). Para a avaliação ecotoxicológica de um determinado ambiente, é essencial o conhecimento dos riscos potenciais dos contaminantes à biota.

Para poder prever o risco real que implica a presença de uma substância tóxica no ambiente, é necessário levar em conta que a toxicidade de um composto pode ser potencializada (sinergismo), reduzida (antagonismo) ou pode não ser afetada pela presença do outro composto (efeito aditivo). A análise experimental mais utilizada para estudar interações, é testar a toxicidade dos compostos combinados e compará-la com os efeitos tóxicos individuais. Quando não existem diferenças significativas entre a toxicidade combinada e a esperada a partir das toxicidades individuais, se considera que os efeitos são aditivos.

Nos estudos de risco ecológico usam-se em geral dados obtidos por ensaios laboratoriais padronizados e, usualmente, um fator de extrapolação é usado para determinar critérios de qualidade ambiental que assegurem a saúde das populações e, conseqüentemente, dos ecossistemas (Roex et al., 2000). O potencial tóxico de uma substância é calculado através do estabelecimento de vários parâmetros que caracterizam sua ação, não em um indivíduo isolado, mas sobre uma população. Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (Costa, et al, 2008), através da avaliação do grau de sensibilidade (ou resistência) de diferentes espécies de organismos. Os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis biológicos de organização, tais como o bioquímico/celular, fisiológico, em nível individual, de populações, comunidades, ou mesmo nos ecossistemas (Ronco et al., 2004; ; Adams & Rowland, 2003; Rand, 1995; USEPA, 1992). Dentre os efeitos bioquímicos e fisiológicos provocados pelos agentes tóxicos podemos destacar: modificações na permeabilidade das membranas celulares; interferência na produção de ATP; inibição reversível ou irreversível de enzimas; distúrbios no metabolismo de lipídios, podendo resultar em alterações hepáticas; alterações nos sistemas enzimáticos microssomais, os quais são responsáveis pela biotransformação de xenobióticos; alteração na estrutura ou na atividade de enzimas que participam de processos reguladores, comprometendo a síntese e liberação de hormônios, bem como reduzindo a velocidade de crescimento dos organismos; distúrbios no

metabolismo de carboidratos e distúrbios no processo respiratório pela inibição do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (Connell & Miller, 1984). Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser formadas intracelularmente ameaçando a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, e podem comprometer processos biológicos importantes. O dano oxidativo de biomoléculas pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana levando até a morte celular.

A cada degrau que se desce na hierarquia biológica (dos níveis de comunidade, populações, organismos para o nível celular-bioquímico) tem-se menor significado ecológico, pois torna-se mais difícil relacionar os efeitos de poluentes observados em níveis bioquímico/celular com as alterações do ecossistema. As relações específicas entre respostas bioquímicas e efeitos adversos em ecossistemas, não são claras, o que torna difícil interpretar, em níveis de organização mais alta, as consequências de uma alteração bioquímica (Neff, 1984). Uma forma de minimizar as dificuldades de prognóstico, diagnóstico e monitoramento ambiental é utilizar testes de toxicidade que forneçam respostas em nível de organismos, para diagnosticar e monitorar um ambiente, sendo preferível nesses casos utilizar embriões por ser a fase mais sensível do ciclo de vida do organismo. A legislação atual (Resolução Conama 357/05), ainda que usando as respostas em nível de organismos, também se baseia em indicadores de danos ecotoxicológicos que geralmente exigem um longo tempo de resposta como nas análises exploratórias, são dispendiosos e laboriosos, exigindo muitas vezes a manutenção de culturas em laboratório e a importação de espécies utilizadas em testes internacionalmente padronizados. A necessidade de respostas em tempo real leva à busca de técnicas rápidas, precisas e de baixo custo, envolvendo o uso de espécies locais sensíveis que respondem de forma integrada aos sinergismos das ações de contaminantes. O uso de espécies locais nos testes propicia resultados mais facilmente extrapoláveis para os ecossistemas em risco, além de se evitar a introdução e manutenção no laboratório de espécies alóctones (Nascimento *et al.*, 2008).

A maioria dos padrões de qualidade para a proteção do ambiente foi, e ainda é, estabelecida com base em estudos de laboratório; dentre esses se destacam os testes ecotoxicológicos agudos e crônicos com diversos organismos, por apresentarem custo reduzido e simularem o que pode ocorrer nos ecossistemas com relativa exatidão (Bertoletti, 2000). Assim, sob condições controladas, é possível estimar as concentrações dos agentes químicos que causam

efeitos danosos aos organismos, além da possibilidade de ampla utilização no estabelecimento de padrões e/ou critérios de qualidade para a proteção das comunidades.

No Brasil, a Ecotoxicologia se iniciou em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda de peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade de Águas TC 147 da *International Organization for Standardization* (ISO). A partir daí, foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica de curta duração, utilizando outros grupos e espécies de organismos de água doce, dentre os quais algas, microcrustáceos e peixes, além de testes com sedimentos para avaliação da poluição hídrica. Somente 10 anos depois foram realizados testes com espécies marinhas e estuarinas.

Apesar da crescente utilização dos testes ecotoxicológicos no Brasil, segundo Bertolotti (2000), poucas espécies de organismos aquáticos nativos são empregadas em métodos padronizados. Dentre esses, destacam-se os crustáceos dulciaquícolas *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella sp*, o crustáceo marinho *Mysidopsis juniae*, e o equinóide *Lytechinus variegatus*. Além desses, a espécie *Crassostrea rhizophorae* tem sido utilizada com sucesso para avaliação da toxicidade de efluentes e produtos, e para determinação de qualidade em corpos d'água (Cruz, 2007; Nascimento, 2002). Trata-se de uma ostra representativa de ecossistemas locais, que habita os manguezais desde o Caribe até Santa Catarina (Rios, 1970), sendo por isso importante na avaliação da qualidade desses ambientes, uma vez que não é uma espécie introduzida. No que tange à reprodução, embora ocorram picos, em geral em torno de março/abril e setembro/outubro, esta espécie desova durante todo ano, não havendo necessidade de condicionamento prévio de reprodutores para a realização dos testes (Nascimento & Lunetta, 1978). Um protocolo de teste com *C. rhizophorae* foi testado e sugerido por Nascimento et al. (2002) para determinações de efeitos tóxicos de diferentes poluentes.

Previamente, a utilização de testes de toxicidade usando-se embriões de ostras havia sido indicada pela *American Society for Testing and Materials* como um critério para determinação de qualidade da água em ambientes marinhos, desde 1980, (ASTM, 1995, 1992). Dados da literatura relativos a embriões de ostra mostram que estes organismos respondem à ação de substâncias químicas, ou alterações de variáveis físico-químicas, desenvolvendo-se de forma anormal (Paixão et al., 2007; Nascimento, 2002; Martin et al., 1981; MacInnes e Calabrese, 1979, 1978; Calabrese et al., 1973; Calabrese e Davis, 1970). A exposição continuada dos organismos a agentes tóxicos presentes nos ecossistemas muitas vezes não provoca diretamente a sua morte, mas afeta a

estrutura e função de alguns órgãos vitais como brânquias, rins, gônadas, fígado dentre outros, comprometendo a viabilidade do organismo. Por isso, mudanças morfológicas decorrentes da toxicidade do meio, constatadas em escala microscópica no laboratório, são indicadoras de possíveis alterações no ecossistema em questão.

Geralmente os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (Costa *et al.*, 2008). Portanto, a interpretação dos resultados nos testes de toxicidade, analisados por estimativas pontuais, tem sido usualmente expressos pelo cálculo da concentração letal, efetiva ou inibitória (CL_{50} , CE_{50} ou CI_{50}) causando, respectivamente, mortalidade, anormalidade e inibição no crescimento ou reprodução a 50% dos organismos testes.

O efeito biológico de uma substância tóxica sobre um organismo vivo depende das suas propriedades químicas, de sua concentração e do tempo de exposição (Rand *et al.*, 1995). Porém, na prática os fatores concentração e tempo de exposição interagem diferentemente na fisiologia dos organismos, fazendo com que doses agudas e crônicas nem sempre apresentem o mesmo efeito biológico (Westman, 1985). Isto significa dizer que uma espécie pode apresentar maior resistência a uma baixa concentração de uma substância por um longo período e ao mesmo tempo ser a mais sensível a esta mesma substância, a uma alta concentração por um curto período de tempo.

Para atribuir maior confiabilidade aos testes de toxicidade, são usados controles de precisão e sensibilidade. O Controle negativo (sem o contaminante a ser examinado) serve para monitorar a qualidade do experimento e o positivo para a padronização do nível de sensibilidade dos organismos-teste. Neste último se utiliza uma substância tóxica com efeito conhecido (substância de referência), a ser comparado com os efeitos do contaminante testado. Segundo a USEPA (1993), deve-se estabelecer a qualidade analítica (QA) dos resultados baseando-se, mediante a confecção de cartas controle (gráfico-controle) elaboradas com base nos resultados dos testes com substância de referência. Esta substância é um agente químico como, por exemplo, o Dodecil Sulfato de Sódio, fenol, 4-clorofenol, etc.

O Dodecil Sulfato de Sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) é um exemplo de substância comumente utilizada como tóxico de referência por ser de ação rápida, não seletiva e consistente em sua toxicidade a animais aquáticos (Araujo e Nascimento, 1999; Davis e Hoos, 1975). As substâncias

de referência possibilitam estabelecer a faixa de aceitação de resultados da sensibilidade dos organismos usados nos testes de toxicidade. Com estes resultados o laboratório pode traçar a carta-controle, ferramenta de registro que estabelece os intervalos aceitáveis de variação da resposta dos organismos, a um determinado tóxico de referência, com uma margem de confiança de 95%. Representam assim, um meio de detectar mudanças na performance de organismos-teste e de avaliar a precisão destes testes (Environment Canada, 1990).

Organismos vivos podem exibir diferentes reações a uma mesma substância tóxica, dependendo das quantidades absorvidas e do tempo de exposição. Desta forma, os parâmetros de avaliação da toxicidade podem compreender desde mortalidade até alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas. Os testes de toxicidade (aguda ou crônica) se subdividem em estático (sem renovação ou com renovação) e de fluxo contínuo. Usualmente os testes agudos avaliam efeitos severos e rápidos, como a letalidade e a imobilidade dos organismos que foram expostos a altas concentrações da amostra por um curto período de tempo (geralmente até 96h), enquanto que os testes crônicos medem parâmetros subletais (crescimento, sucesso reprodutivo, alterações histológicas, efeitos bioquímicos) por um período de exposição relativamente longo e sob concentrações menores. Os dados de testes de toxicidade crônica normalmente são mais confiáveis, fornecendo respostas relacionadas ao ciclo de vida completo ou parcial das espécies teste. Assim, testes crônicos ou sub-crônicos podem ter maior relevância ecológica quando se referem ao desenvolvimento embrionário de espécies-chave para o ecossistema em risco (Nascimento *et al.*, 2000; Norberg-King, 1989; McKim, 1977). Essa relevância é assegurada quando os resultados do teste apresentam estimativa de como o efluente ou a concentração do contaminante age produzindo efeito tóxico crônico na biota local. Esta concentração estimada é comparada aos limites permitidos de toxicidade ou concentração de exposição ambiental para indicar o risco de impacto ambiental (Cruz *et al.*, 2007).

As respostas dos organismos podem ser mais evidentes sob períodos mais longos de exposição. Porém, em casos de contaminantes que tendam à degradação ou no caso de amostras quimicamente instáveis, torna-se essencial o uso de testes rápidos (Pereira *et al.*, 2010).

Os testes embriolarvais (*early-life stage tests*) fornecem respostas de toda a fase embrionária do organismo, sendo portanto considerados como testes de efeito sub-crônico ou crônicos de curta duração (Nascimento *et al.*, 2000; Nascimento, 2002). Os testes de toxicidade com duração de até 96 horas podem ser considerados como testes agudos. Entretanto, os

embriolarvais por envolverem a fase completa, embora inicial, do ciclo de vida do organismo, quando ocorrem muitas divisões celulares, e portanto maior suscetibilidade do DNA a influências externas, são hoje considerados testes especiais, fora da classificação de agudos ou crônicos (McKim, 1985).

Sempre que possível, é recomendável avaliar o efeito de uma substância ou efluente para mais de uma espécie da biota aquática para que, por meio do resultado obtido com o organismo mais sensível, seja possível estimar com mais segurança o impacto do contaminante no corpo d'água receptor (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990). Apesar disso, por razões práticas e econômicas, muitas vezes os testes de toxicidade são realizados com uma única espécie de organismo-teste (Ribo, 1997).

A sensibilidade do organismo vai depender da espécie, da etapa de desenvolvimento em que ela se encontra e das características do ecossistema em que está. Um bom indicador biológico deve apresentar algumas características essenciais como: ser sésil, de fácil coleta, possuir vasta distribuição, estar presente ao longo de todo o ano e ser sensível ao estresse (USEPA, 1988).

Contaminantes solúveis em água são introduzidos nos organismos aquáticos por meio da superfície do corpo (exposição dérmica), pelos tecidos respiratórios ou por ingestão. Contaminantes presentes nos alimentos podem ser ingeridos (exposição oral) e absorvidos pelo trato gastrointestinal, enquanto que contaminantes adsorvidos em partículas e sedimentos podem penetrar no organismo por exposição dérmica ou respiratória ou também por ingestão (Costa et al., 2008). As rotas de exposição podem afetar a cinética de absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos contaminantes e, dessa forma, pode influenciar na sua toxicidade (Rand et al., 1995).

Contaminantes absorvidos podem ser retidos nos organismos e provocar efeitos deletérios quando níveis elevados são atingidos. Os processos de acumulação nos organismos envolvem a bioconcentração, a bioacumulação e biomagnificação. No processo de bioconcentração a substância química é absorvida do ambiente aquático pelo organismo por meio das superfícies respiratórias e dérmicas. A bioacumulação é um termo mais abrangente que inclui todas as rotas de exposição ao contaminante, inclusive a dieta alimentar. O aumento da concentração de contaminantes nos tecidos à medida que se avança nos níveis tróficos, resultantes principalmente da acumulação ocasionada pela dieta alimentar, recebe o nome de biomagnificação (Arnot & Gobas, 2006; Spacie et al., 1995).

Os resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos podem ser usados para controlar o lançamento de efluentes, hierarquização das contribuições de indústrias na toxicidade do “corpo receptor”, avaliar a eficiência de estações de tratamento para realizar o monitoramento ambiental, a avaliação de impacto ambiental, além de indicar critérios e determinar padrões de segurança contra efeitos tóxicos de poluentes.

No Brasil, os padrões e critérios de qualidade de águas foram estabelecidos em junho de 1986, pela Resolução nº 20 do CONAMA. No entanto, estudos realizados com diferentes organismos têm demonstrado que alguns padrões estabelecidos por esta resolução, não estão isentos de causar efeitos tóxicos à biota. Somente em 1987 o órgão responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), por meio dos trabalhos desenvolvidos pelo GT02 (Grupo Toxicidade) da Comissão Técnica de Qualidade das Águas, começou a publicar suas primeiras normas relativas a testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos (Zagatto, 2008). Através da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também tem sido padronizados testes de toxicidade. Assim, outro grande avanço foi a publicação da Resolução CONAMA nº 357/2005 que indica a investigação através de ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos ou outros métodos científicos reconhecidos que possibilitem avaliar interações entre substâncias e a presença de contaminantes passíveis de causar danos aos seres vivos (Prósperi e Nascimento, 2008). Convém ressaltar neste contexto que uma das limitações da atual legislação é o fato da maior parte dos dados adotados pelo CONAMA ser proveniente de regiões temperadas, sendo, portanto, de extrema importância a revisão destes padrões, pois ainda são poucos os estudos de avaliação dos limites permissíveis de poluentes que permitem o diagnóstico seguro das menores concentrações de poluentes que não causam efeito adverso em ambientes tropicais (Marques Jr. et al., 2002).

A utilização de ensaios padronizados apresenta algumas vantagens em relação aos demais, como a de permitir que os resultados gerados em diferentes laboratórios possam ser comparados entre si. Assim, testes realizados sob condições controladas e padronizadas vêm servindo como fonte de informações para avaliar os efeitos ecológicos de contaminantes tóxicos (Ronco et al., 2004). Entretanto, deve-se levar em conta a escolha adequada do ensaio a ser utilizado em cada estudo, que irá depender dos objetivos do trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1- Geral:

Avaliar a composição química e a toxicidade do conteúdo de sinalizadores “*bastões de luz química*” comercializados e/ou encontrados em praias da Costa dos Coqueiros.

2.2- Específicos:

- 1- desenvolver e otimizar método, baseado em GC-MS, para a extração e análise dos compostos orgânicos presentes nos bastões de luz química;
- 2- identificar as substâncias presentes nos bastões de luz química comercializados em Salvador e/ou encontrados na área costeira da Costa dos Coqueiros;
- 3- estudar as variações no perfil de composição da fração solúvel em água do mar (FSA) das substâncias contidas nos sinalizadores, em função do tempo, temperatura e exposição à luz;
- 4- avaliar a toxicidade da FSA, através de testes com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*; estudar as variações na toxicidade da FSA em função do tempo, temperatura e exposição à luz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostragem

3.1.1- Coleta do material a ser analisado (bastões de luz química)

Os bastões de luz química coletados na praia eram oriundos da plataforma continental na Costa dos Coqueiros, região relativamente estreita que permite as embarcações transitarem em áreas próximas à praia. Essa proximidade, aliada a ação dos ventos, faz com que os resíduos flutuantes oriundos dos navios cheguem com frequência à praia.

A Costa dos Coqueiros (15°54’S,38°20’W a 11°34’S,37°47’W) é formada por sete municípios localizados ao norte da capital baiana (Lauro de Freitas, Camaçari, Mata de São João, Entre Rios, Esplanada, Conde e Jandaíra); neste contexto deve ser ressaltado que a faixa litorânea

da Costa dos Coqueiros é uma das zonas turísticas mais procuradas do Estado (Figura 11), compreendendo destinos conhecidos como Praia do Forte, Costa do Sauípe (maior conjunto de “resorts” da América do Sul), Imbassaí e Mangue Seco. Não se deve esquecer que esta região de quase 200 quilômetros de litoral abriga um dos principais bolsões de desova de tartarugas marinhas do Brasil (Marcovaldi & Marcovaldi, 1999). Assim, a ocorrência de lixo nesta área representa um risco potencial para esta e outras espécies de organismos.



(Fonte: <http://www.diarioturismo.com.br/costa-dos-coqueiros.php>, 2010)

Figura 11- Mapa da Costa dos Coqueiros.

O tipo de bastão de luz química encontrado com maior frequência nas coletas foi o que apresentava conteúdo de cor amarela a laranja (quando novos são amarelos e com o tempo vão adquirindo a cor alaranjada), indicando ser o mais usado na região (Figura 12). Os bastões

amarelos são também os mais comercializados nas lojas de artigos de pesca de Salvador, justificando, assim, a escolha deste tipo para ser estudado.

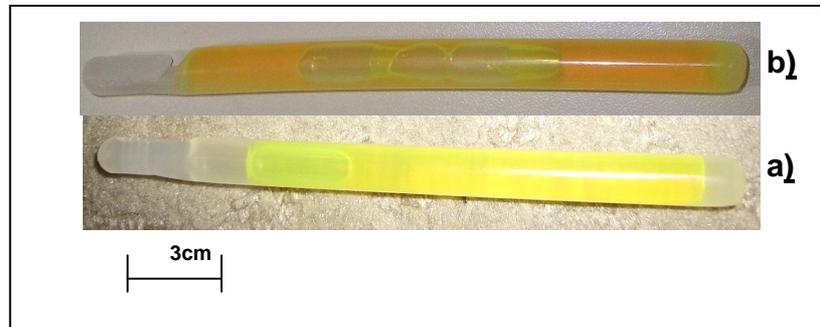


Figura 12- Bastão novo antes de ser ativado (a) e um ano após ser ativado (b).

3.1.2- Coleta e manutenção de organismos testes em laboratório

Nos testes ecotoxicológicos da *C. rhizophorae* foram usados organismos coletados em área não contaminada da Ilha de Itaparica. As ostras foram lavadas e limpas de incrustações (Figura 13), foram aclimatadas por 24 horas em recipientes contendo água do mar filtrada com salinidade 28, esterilizada em autoclave e sob constante aeração (Figura 14). Os procedimentos para correção da salinidade, filtragem e esterilização da água do mar encontram-se descritos no item 3.3.1.



Figura 13- Limpeza das ostras.



Figura 14- Aclimação das ostras.

3.2- Metodologia analítica

3.2.1- Limpeza da vidraria

Toda a vidraria utilizada na execução dos testes foi previamente limpa por meio de enxague em água corrente por três vezes, lavagem com solução de Extran neutro a 3%, enxague com água corrente por mais cinco vezes, descontaminação com ácido nítrico a 10%, durante 24 horas, lavagem novamente em água corrente por cinco vezes e três vezes em água deionizada, sendo então levada a estufa para secagem. A vidraria a ser usada na análise química ainda foi lavada numa etapa final com acetonitrila.

3.2.2- Reagentes e solventes

Padrões de dibutil ftalato (Sigma-Aldrich, Inc. USA lote 046K0686) e de dimetil ftalato (Sigma-Aldrich, Inc. USA lote 02825EE) ambos com grau de pureza superior a 99,9%.

Substância de referência usada no controle positivo dos testes de toxicidade foi o Dodecil Sulfato de Sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) com massa molar de 288,38 g mol⁻¹. Lote: 8170341000, fabricado pela MERCK.

Diclorometano com grau de pureza de 99,9% (UltimAR[®], Mallinckrodt Baker, Inc. USA lote H19J00) e hexanos com grau de pureza de 99,5% (ChromAR[®], Mallinckrodt Baker, Inc. USA lote G37E81) como solventes.

Acetonitrila, grau HPLC – Merck S.A. Industrias Químicas

Acetona, grau de pureza 99,5%, lote 1216057003, Merck S.A. Industrias Químicas

Metanol, grau de pureza 100%, Mallinckrodt Baker, Inc. USA lote C52E02

3.3- Procedimento analítico

Os procedimentos para análise do conteúdo dos bastões de luz química e avaliação da toxicidade encontram-se resumidos na figura 15 que se segue.

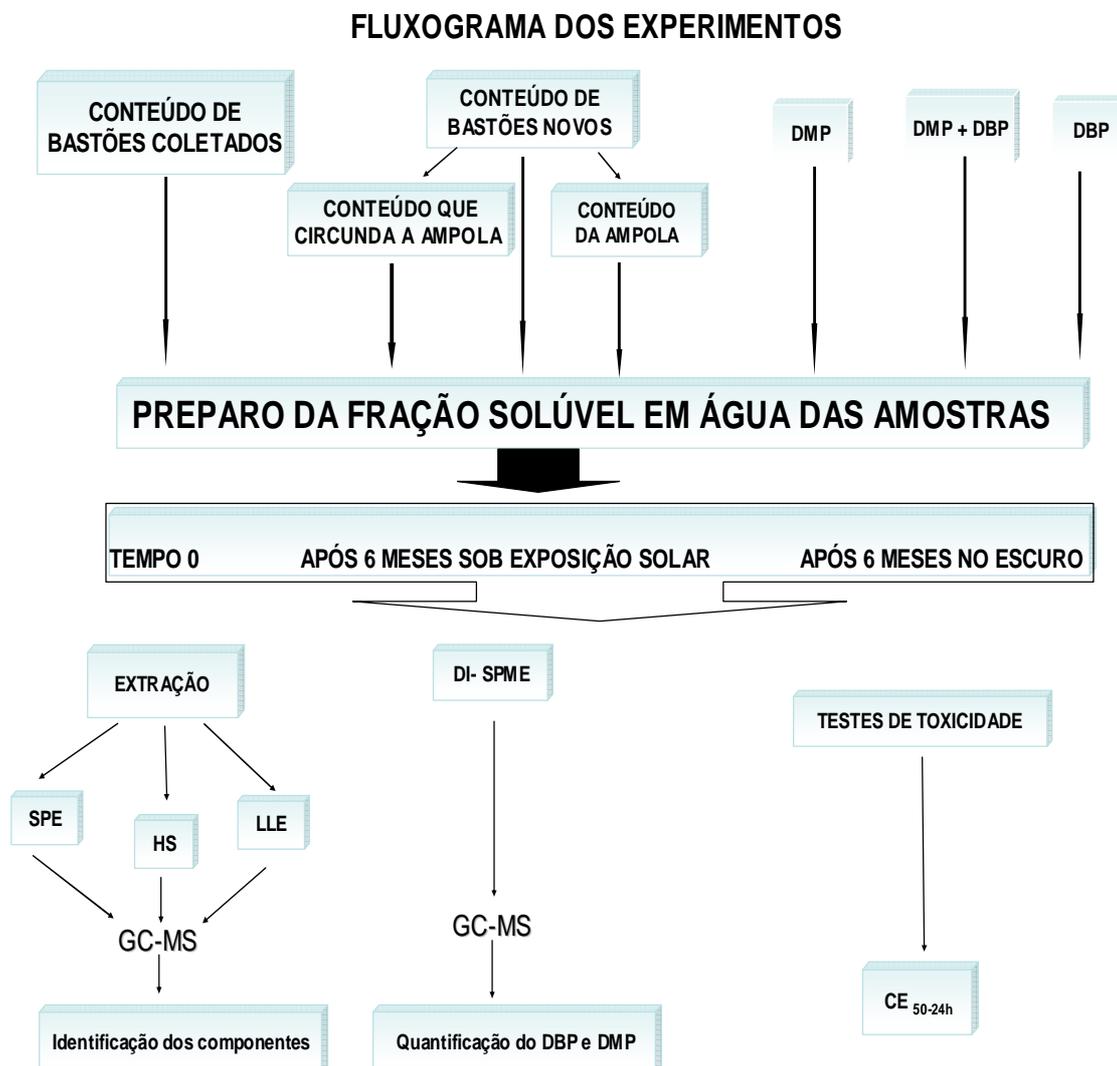


Figura 15- Fluxograma dos experimentos.

3.3.1-Preparo da água de diluição

A água do mar utilizada no presente estudo foi coletada na praia do Forte (Litoral Norte da Bahia), filtrada em filtros Whatman[®] GF/C (capacidade de retenção de partículas 1,2 μ m); a salinidade foi verificada com o auxílio do refratômetro (ATAGO[®] modelo s/Mill), a fim de ajustá-la para 28 através da diluição com água destilada. Após a correção da salinidade, 8 litros da água foram transferidos para um garrafão de vidro pirex[®] tampado com papel alumínio e

esterilizada em autoclave (FABBER-PRIMAR, modelo 103), a uma temperatura de 127°C, e sob pressão de 1,5kg/cm², durante 20 minutos. A seguir foi estocada por pelo menos 48 horas antes de ser utilizada, para garantir a estabilização do pH que variou entre 8,2 a 8,6.

3.3.2- Preparo das Frações Solúveis em Água (FSA) do conteúdo dos bastões e de DBP e DMP

A grande maioria dos bioensaios com organismos marinhos é realizada com substâncias que são solúveis em água do mar. Porém, no caso das substâncias encontradas nos sinalizadores, é necessário um procedimento especial, por se tratar de uma mistura líquida pouco solúvel em água. O preparo da Fração Solúvel em Água (FSA) foi baseado na técnica de Anderson et al. (1974). O conteúdo dos sinalizadores, DBP e DMP foram diluídos na proporção 1/9 em água do mar filtrada (100 mL / 900 mL), esterilizada e com salinidade ajustada para 28, por ser a salinidade usada nos testes embriolarvais da ostra *C. rhizophorae*. As suspensões foram mantidas sob agitação, com agitador magnético, na velocidade de 150 rpm por 20 horas; após este período esperou-se por uma hora o extrato decantar. Este procedimento foi baseado nos trabalhos realizados por Anderson et al. (1974), Winters et al. (1976) e Singer et al. (2000), os quais demonstram que, agitando durante 20 horas a baixa velocidade em sistema fechado, pode-se alcançar o nível máximo de dissolução de hidrocarbonetos em fase aquosa com o mínimo de contaminação bacteriana.



Figura 16- Frasco Mariotte usado no preparo da FSA.

No preparo da FSA de DBP e DMP puros ou combinados, verificou-se que, devido a sua alta densidade, havia uma tendência dessas substâncias se depositarem no fundo do frasco Mariotte com torneira de vidro acoplada (Figura 16) apresentando, porém, fina camada na superfície da água. O conteúdo dos bastões de luz química apresentou o mesmo comportamento. Isso se deve principalmente ao fato do DBP e DMP serem os componentes que prevaleceram nas amostras das FSA dos bastões analisados, indicando serem os principais responsáveis pela constituição do líquido viscoso observado. Por isso, para os experimentos de toxicidade e análises quantitativas das amostras foi necessário fazer a coleta da FSA na região intermediária do frasco Mariotte entre o fundo e a superfície, evitando assim a interferência do líquido viscoso na concentração das amostras e no efeito tóxico exercido sobre os organismos-teste.

3.3.3- Preparo das amostras

Foram preparadas amostras de Fração Solúvel em Água (FSA) usando conteúdo de bastões coletados na região costeira do Litoral Norte, a fim de avaliar a sensibilidade dos embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*, em relação ao conteúdo dos referidos sinalizadores de luz química. Também foi verificada a toxicidade da Fração Solúvel em Água (FSA) do conteúdo destes dispositivos novos (Figura 17), seguindo o mesmo procedimento em ambos os casos.

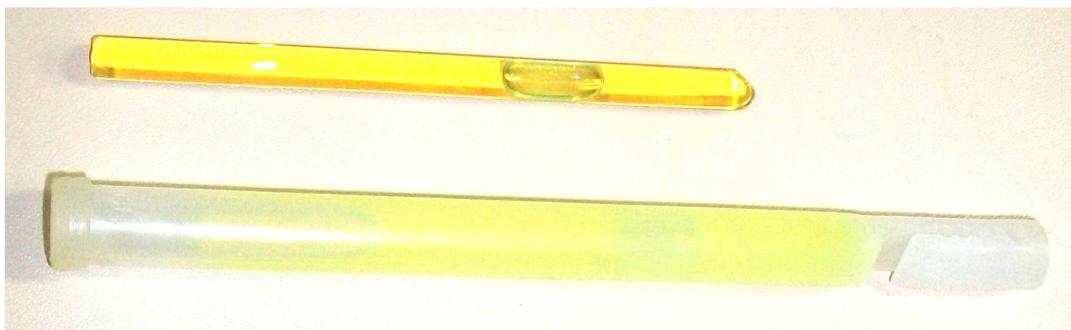


Figura 17- Detalhe da ampola de vidro contida dentro dos bastões antes de ser quebrada.

Os bastões de luz química foram abertos e com seu conteúdo (interno e externo à ampola, isolados e juntos) foi preparada a FSA como descrito no item 3.3.2. Foram também testadas as

FSA da substância pura do DBP, DMP e mistura de ambos, neste caso foram utilizados padrões das referidas substâncias com grau de pureza acima de 99,9%. Com o conteúdo de bastões ativados mantidos durante um ano sob exposição solar foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. Com as FSA obtidas, foram preparadas nos recipientes testes diversas concentrações diluídas com a água de diluição descrita no item 3.3.1 para serem avaliadas nos testes de toxicidade, estas FSA usadas imediatamente após preparo foram chamadas de FSA de tempo 0.

3.4 - Caracterização química das amostras

A caracterização química das amostras foi realizada nas instalações do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química (LPQ) do Instituto de Química da UFBA. Para a extração dos componentes dos bastões, foram testados quatro procedimentos: extração em fase sólida (SPE), *headspace* (HS), extração líquido-líquido (LLE) e microextração em fase sólida (SPME).

A composição química dos sinalizadores foi avaliada através da análise de suas frações volátil, semi-volátil, polar e apolar. As frações volátil e semi-volátil das amostras foram determinadas usando extração por *headspace*, microextração em fase sólida do *headspace* (HS-SPME) e microextração em fase sólida por imersão direta (DI-SPME). As frações polar e apolar, solúveis respectivamente em água e solvente apolar (hexano e diclorometano), foram avaliadas com técnicas de extração em fase sólida e extração líquido-líquido. Dessa forma, buscou-se avaliar quais procedimentos eram mais adequados para extrair os compostos de diferentes polaridades e pressões de vapor. Antes e alternadamente à injeção das amostras eram realizadas análises com o solvente (branco) a fim de verificar as condições do sistema cromatográfico.

3.4.1- Extração em fase sólida

A Extração em Fase Sólida (SPE) foi realizada com cartucho Sep-Pak C₁₈ (Waters, 360 mg de fase sólida C18). As etapas no processo de extração envolveram o condicionamento do cartucho, a adsorção/partição dos analitos pela passagem da amostra e a remoção dos analitos sorvidos através dos solventes hexano e diclorometano. O cartucho C₁₈ era acoplado a uma

seringa e 3mL de hexano foi usado no condicionamento para em seguida o líquido ser descartado para posterior passagem de 10mL da amostra e 10mL de hexano, a fim de remover os analitos adsorvidos. O líquido foi recolhido em ambos procedimentos e concentrados para duas frações de 2mL. Em seguida, com o cartucho acoplado foram adicionados mais 10mL de diclorometano (DCM), posteriormente o eluato foi recolhido em tubo de ensaio e concentrado para 2mL, sendo então acondicionados em ependorf para em seguida serem injetados no GC.

3.4.2- Extração por *headspace*

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes na fase vapor foram extraídos através de *headspace* estático. O método de extração foi otimizado monitorando-se a influência de cada uma das variáveis (tempo de extração, temperatura de extração e efeito da agitação) sobre a resposta experimental.

Para esta técnica de extração, alíquotas (1mL) de cada amostra foram colocadas em frasco de *headspace* juntamente com 9mL de água do mar de salinidade 28. O frasco era a seguir selado com um septo de silicone facetado com teflon. Foram também avaliadas amostras das FSA prontas, usando mesmo procedimento para acondicioná-las nos frascos de *headspace*. Buscou-se otimizar a extração através de três procedimentos, todos com aquecimento da FSA a 90°C mantendo a amostra durante 15 minutos sem e com agitação e a 30 minutos sem agitação.

Os recipientes contendo as amostras foram aquecidos em placa aquecedora (IKA[®], modelo HS7) na temperatura de 90°C e sob agitação durante 15min, de acordo com a otimização das condições de extração. Após este período 300 µL da fase vapor eram retirados por meio de seringa cromatográfica *gastight* (Hamilton) e injetados num cromatógrafo a gás para análise dos COVs, seguindo as condições otimizadas descritas no Anexo 2.

3.4.3- Extração líquido-líquido.

A extração líquido-líquido (descontínua) foi realizada adicionando-se 25 mL da FSA da amostra dos bastões de luz química (conteúdo interno e externo à ampola isolados e juntos) a ser analisada e 5 mL do solvente orgânico (DCM) no funil de separação, sendo então agitados durante 15 minutos (sempre tendo o cuidado de abrir a torneira para aliviar a pressão), seguindo-

se 5 minutos em repouso mantendo o funil no suporte para então realizar a retirada da fração orgânica. Adicionou-se mais 25 mL da FSA da amostra e 5 mL do DCM para após 5 minutos de repouso retirar a fração orgânica que foi adicionada à coletada anteriormente, sendo então concentrada a 2 mL através de placa aquecedora com temperatura de 50°C. Após procedimento de LLE foi injetado 0,5 µL do extrato concentrado (obtido da FSA) no GC-MS nas condições descritas no Anexo 3A e 3B.

3.4.4- Microextração em fase sólida do *headspace* (HS-SPME) e por imersão direta (DI-SPME)

Para executar a extração por SPME, as amostras (FSA do DBP e DMP puros e misturados e conteúdo dos bastões da porção interna e externa à ampola isolados e juntos) foram colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados com septo de teflon. Em seguida o septo foi perfurado à medida que a seringa de SPME foi introduzida. Empurrando o êmbolo da seringa para baixo se expõe a fibra na amostra de duas formas, pela extração via *headspace* e por extração direta. Na microextração em fase sólida do *headspace* (HS-SPME) a fibra revestida de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µL foi inserida no espaço acima da amostra contida no frasco selado, ou seja, na fase gasosa em equilíbrio com a amostra, na temperatura de 50°C com agitação de 250 rpm, para os compostos voláteis e semivoláteis serem absorvidos/adsorvidos. Posteriormente, por exposição da fibra no injetor do cromatógrafo, ocorreu a dessorção térmica pela exposição à temperatura de 260°C durante 5 minutos que resultou na extração dos analitos voláteis. Visando a quantificação do DBP e DMP, foi realizado novo protocolo baseado em microextração em fase sólida por imersão direta (DI-SPME), usando a mesma fibra de 100 µL e sistema amostrador automático (AOC-5000) acoplado ao cromatógrafo. Na extração direta, a fibra foi colocada diretamente em contato com a amostra fazendo com que os analitos (voláteis ou não) fossem transportados para a fase extratora. Com o emprego da DI-SPME realizou-se a análise do conteúdo interno e externo da ampola, por GC-MS no modo qualitativo (SCAN - varredura) e no modo quantitativo, por monitoramento seletivo de íons (SIM), segundo as condições cromatográficas descritas no Anexo 4.

3.5- Análise das amostras por GC-MS

Após as extrações, os compostos foram separados e identificados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). As determinações foram realizadas usando sistemas de GC-MS (Figura 18 e 19), sendo um por ion-trap (Varian Saturno II GC/MS 3900) acoplado a autoamostrador para *headspace* e SPME (detector Saturno 2100T) e o outro por quadrupolo (Shimadzu modelo QP 2010 Kyoto, Japão) com autoamostrador (AOC-5000), ambos usando injetor no modo split. Nos dois casos, usou-se hélio (pureza de 99,99%) como gás de arraste e colunas capilares de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura. As condições de análise, em cada caso, estão descritas nos anexos 1, 2, 3A,3B e 4.



Figura 18- Cromatógrafo Varian GC/MS 3900.



Figura 19- Cromatógrafo Shimadzu GC-QP 2010.

A identificação dos compostos extraídos e separados por GC foi baseada na comparação de seus espectros obtidos aos espectros de massa da biblioteca NIST, disponível nos *softwares* dos equipamentos. No caso do DMP e DBP, a identificação foi inequívoca, pela comparação aos espectros e tempos de retenção de padrões.

3.5.1- Preparo da solução de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do dibutil ftalato e dimetil ftalato e das curvas padrão

Para preparar solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do DMP e DBP, retirou-se $100 \mu\text{L}$ da solução de 10 mg L^{-1} ($41,9 \mu\text{L}$ do DMP + $47,9 \mu\text{L}$ do DBP diluído em acetona até o volume de 5 mL) da

mistura de DBP e DMP diluída em acetona preparada no mesmo dia, tendo sido o volume completado para 100mL com água do mar esterilizada de salinidade 28 obtendo assim a concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

A quantificação do DBP e DMP nas FSA foi realizada por GC-MS por meio da construção de curvas analíticas para as referidas substâncias a partir de diversas diluições da solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do DBP e DMP (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$) analisadas em triplicata no GC-MS por DI-SPME.

Para calcular o limite de detecção da curva analítica do DBP e DMP, o erro padrão da interseção foi multiplicado por três e posteriormente dividido pelo coeficiente da variável X através das ferramentas do programa Excel. Para calcular o limite de quantificação realizou-se procedimento semelhante, tendo como única diferença a multiplicação do erro padrão por dez ao invés de três. Para efeito prático, foram considerados os menores valores obtidos na curva analítica.

3.6- Estudo da influência da exposição ao sol e temperatura na composição e toxicidade da FSA do conteúdo dos sinalizadores e das substâncias puras de DBP e DMP após seis meses

Para avaliar a interferência do tempo e condições ambientais no perfil da composição e toxicidade das FSA do conteúdo dos sinalizadores e dos solventes DBP e DMP, amostras das FSA dos conteúdos interno e externo dos bastões (separados e misturados), do DBP e do DMP (separados e misturados) foram acondicionadas em frascos de 500mL com tampa esmerilhada (frasco de DBO) em triplicata e mantidos durante 6 meses sem exposição solar e com exposição solar na temperatura ambiente ($29 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$). Foi também avaliada a concentração do DBP e DMP da FSA mantida no escuro por 6 meses em refrigerador a 5°C .

3.7- Ensaio Biológicos: testes de toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento Ambiental situado no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

Estes testes foram realizados com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*, devido sua eficiência para diagnosticar e monitorar o ambiente aquático. Por ser filtradora a ostra apresenta

alta sensibilidade a alterações ambientais e os embriões se constituem na fase mais sensível do ciclo de vida destes organismos. Os testes embrio-larvais (*early-life stages tests*) fornecem respostas de toda a fase embrionária do organismo, quando ocorrem muitas divisões celulares e, portanto, maior acessibilidade do DNA à influências externas.

Além dos testes de toxicidade com o conteúdo dos bastões de luz química novos e usados, foram realizados testes de toxicidade com as duas substâncias que prevaleceram nas amostras dos bastões, o dibutil ftalato (DBP) e dimetil ftalato (DMP). Para estes testes a FSA foi preparada usando a solução padrão de DBP e do DMP. A toxicidade em função do tempo e da exposição solar foi avaliada.

Como controle negativo foi usada água do mar na salinidade 28, filtrada e esterilizada (a mesma usada como água de diluição). O tóxico de referência usado no controle positivo foi o dodecil sulfato de sódio (DSS). No preparo da solução-mãe, o produto foi dissolvido, lentamente, evitando formação de espuma. Após a avolumação do balão volumétrico, agitou-se a solução em baixa rotação durante 30 minutos, em placa magnética, para total homogeneização. As soluções-teste de 0,32; 0,56; 1,0; 1,76; 3,2 mg L⁻¹ foram preparadas a partir da diluição da solução-mãe de 100 mg L⁻¹.

Os testes de toxicidade foram executados em duas etapas: na primeira foram realizados ensaios preliminares exploratórios (*screening*), para estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo; na segunda etapa foram realizados os testes definitivos, para determinação do CE₅₀ (concentração que causa anormalidades em 50% da população exposta). Nos testes ecotoxicológicos com FSA do DBP e DMP foram usadas as concentrações de 10, 18, 32 e 56% e para o conteúdo dos bastões de luz química foi de 0,32; 0,56; 1,0; 1,76 e 2,24%. Não houve necessidade de realizar a correção do pH devido à pequena quantidade do conteúdo dos bastões necessária para causar efeito tóxico, não comprometendo assim o desenvolvimento dos organismos presentes nos recipientes testes.

3.7.1 Parâmetros físico-químicos medidos

Nos testes de toxicidade o pH foi determinado no início (0h) e final do experimento (24h), com auxílio de um potenciômetro marca Analyser, 300, precisão $\pm 0,01$.

O controle da temperatura foi realizado com termômetro de máxima e mínima diplex[®], precisão 0,1°C.

3.7.2 Montagem e realização dos testes de toxicidade com a *Crassostrea rhizophorae*

Os testes de toxicidade foram realizados com embriões de ostras seguindo-se a técnica desenvolvida por Nascimento (2002). Os gametas masculinos e femininos da ostra *C. rhizophorae* foram coletados diretamente das gônadas e com eles foram preparadas suspensões concentradas de ovócitos e espermatozóides. A suspensão de ovócitos foi agitada e removeu-se uma alíquota de 1 mL, contando os mesmos em câmara de *Sedgwick-Rafter*. A fecundação foi feita mantendo-se de 10^6 a 4×10^6 ovócitos / litro. A suspensão de ovócitos foi filtrada em malha de 150 μm para a retirada de partículas teciduais maiores. Foi acrescentado 1,0 mL da suspensão semi-espessa de espermatozóides em 500 mL da suspensão de ovócitos. Após uma hora foram retiradas três sub-amostras de 0,1 mL, diluindo-se para 1 mL e contados os embriões em câmara de *Sedgwick-Rafter*. Foi calculada a média de embriões na suspensão e foram feitos os cálculos necessários para se ter nos recipientes-teste 10 embriões mL^{-1} . Em água do mar filtrada e esterilizada ($S= 28$, $T^\circ\text{C} = 27 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH}= 8,2$ a $8,6$) os embriões foram distribuídos nos recipientes testes, com cinco réplicas para cada concentração da FSA analisada (FSA do DBP e DMP, puros e misturados, e conteúdo dos bastões da porção interna e externa à ampola isolados e juntos), incluindo nos controles com água de diluição (controle negativo) e com a substância de referência DSS (controle positivo).

Amostras de 10 mL foram retiradas dos recipientes-teste após 24 h da fecundação e foram fixadas (usando-se formol cálcico a 4%), sendo observadas ao microscópio para determinação do percentual de anormalidades (extrusão do material interno, deslocamento do manto, reentrâncias e fraturas na concha, concha aberta, concha vazia, alteração no tamanho e ausência de concha na larva) ou falhas no desenvolvimento embrionário em relação ao controle (Figura 20). A normalidade foi verificada pela presença de larvas que apresentavam a concha no formato da letra D, sem apresentar nenhum tipo de alteração na forma ou tamanho, sendo assim chamada de larva D normal.

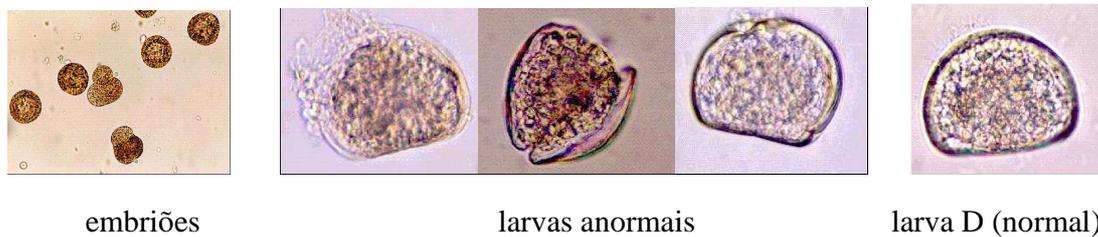


Figura 20- Anormalidades no desenvolvimento embrionário da ostra *Crassostrea rhizophorae*, usadas na avaliação do efeito adverso em relação a larva D normal obtida em cerca de 24 horas após fecundação.

3.7.3- Estatística aplicada aos resultados

Como os organismos utilizados como bioindicadores são muito sensíveis e o próprio controle já apresenta um certo percentual de indivíduos anormais, foi calculado o percentual líquido de anormalidade (*% Net Risk*) usando a fórmula de Abbott (Finney, 1971), através da qual o número de indivíduos anormais do controle é abatido dos anormais dos tratamentos. A interpretação dos resultados dos testes de toxicidade com a ostra *C. rhizophorae* foi realizada calculando-se, com base nos valores de *% Net Risk* o $CE_{50,24h}$ (a concentração que causa anormalidade a 50% dos organismos, considerando-se limites de confiança de 95%).

O método estatístico apropriado para analisar dados de toxicidade deve apresentar três características principais: ser razoavelmente preciso e acurado; ser programável, para que os cálculos possam ser realizados por um computador e, ser suficientemente robusto, o que significa que não deve falhar quando os dados forem atípicos (Costa et al, 2008). Dentre os métodos para determinar o CE_{50} nos testes de toxicidade com embriões da *Crassostrea rhizophorae* escolheu-se usar o *trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton et al., 1977), que utiliza os logaritmos das concentrações testadas nas amostras versus a porcentagem líquida de anormalidade em cada tratamento. É um método não paramétrico, válido tanto para curvas dose-resposta simétricas como assimétricas sendo, portanto, recomendado para cálculos precisos de CE_{50} com intervalo de confiança de 95%. A única limitação desse método em relação aos métodos paramétricos é que devem cobrir o intervalo de zero a 100% de mortalidade ou de efeito agudo (American Public Health Association, 1998; Báez et al., 2004; Hamilton et al., 1977).

A precisão analítica dos resultados foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (C.V.) de acordo com a seguinte fórmula: $C.V. = (s/x) \times 100$; onde s = desvio padrão e x = média

dos resultados dos testes efetuados. O desvio padrão, média e comparação de médias foram obtidas através do programa computadorizado Graphpad Instant (1997), versão 3.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Extração e Análise dos Compostos Presentes nos Bastões

Desde 1960, a cromatografia gasosa tem sido um dos principais métodos para a determinação de compostos orgânicos em ambientes urbanos e em zonas industriais (Lopes & Andrade, 1996). A modernização dos instrumentos nos últimos anos, a fabricação de detectores altamente sensíveis, colunas capilares de alta resolução e a utilização de técnicas hífenadas como a GC-MS, tornou possível uma considerável melhoria da seletividade e da eficiência deste método para a análise de contaminantes orgânicos. Daí a escolha da GC-MS para identificar os componentes presentes nos bastões de luz química e quantificar o DBP e DMP nas amostras de FSA testadas.

A identificação das substâncias por tentativa pode ser feita pela obtenção de um espectro para cada componente da mistura e, também, pela quantidade e qualidade das informações contidas nos espectros de massas (Lopes & Andrade, 1996). Portanto, pela análise do conteúdo dos bastões de luz química novos foi possível identificar por tentativa os componentes e as alterações sofridas relacionadas com o período que a FSA estudada foi submetida a diferentes condições de temperatura e exposição solar. Também foram identificados por tentativa os componentes presentes no conteúdo de bastões de luz química já ativados e coletados nas praias, demonstrando a persistência das substâncias e alertando para o risco de impacto ambiental.

Por outro lado, a identificação de DBP e DMP entre as substâncias presentes foi feita por comparação dos espectros obtidos nas amostras com os obtidos usando as substâncias padrão. As substâncias que prevaleceram nos sinalizadores de luz química foram o dibutil ftalato e dimetil ftalato, atuando como solventes nestes artefatos. Os resultados confirmaram os obtidos pelo *Danish Technological Institute* (Pederson et al. 2003) que, usando o diclorometano como solvente e a Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), detectaram a presença do dibutil ftalato e dimetil ftalato como componentes orgânicos dos bastões de luz química, ressaltando assim o interesse em se avaliar sua toxicidade e o efeito sob diversas condições ambientais.

4.1.1- Seleção do método de extração e pré-concentração dos constituintes químicos presentes nos sinalizadores

Desde que os resultados de extração obtidos com cada um dos métodos testados foram diferentes, em termos de número total e tipos de substâncias extraídas, procurou-se otimizar cada método e as condições de análise por GC-MS para poder comparar o melhor conjunto de resultados. Dentre os métodos de extração otimizados, o que se mostrou mais eficiente, considerando a quantidade de compostos extraídos, foi o *headspace*, sendo identificadas por tentativa até 19 substâncias diferentes em bastões de luz química coletados, gerando identificações com altos percentuais de similaridade e picos bem definidos.

No processo de otimização da extração por *headspace*, foram avaliados três procedimentos, todos com aquecimento da FSA a 90°C, mantendo a amostra durante 15 minutos sem e com agitação e durante 30 minutos sem agitação. As análises foram realizadas injetando-se 500 µL do vapor e as condições cromatográficas e de detector estão descritas no anexo 2. Os três procedimentos resultaram na identificação das mesmas substâncias, o ácido benzóico butil éster; DMP e DBP. Optou-se por se utilizar o procedimento com a manutenção da amostra a 90°C por 15 minutos sob agitação, por ter proporcionado melhores resultados com picos bem definidos em curto espaço de tempo. Dentre as rampas de temperatura testadas, a que se mostrou mais eficiente foi 45°C (4min) → 5°C/min → 100°C (0,5min) → 20°C/min → 200°C (2min) → 10°C/min → 270°C (10min) por permitir a identificação de maior número de substâncias, além de apresentar picos bem definidos.

Com a extração líquido-líquido, foi possível extrair e identificar em bastões novos, além do DMP e DBP, o 3,5,6 ácido triclorosalicílico, a 1[3H] Isobenzofuranona; o 2,4,6 triclorofenol; o 2-etil nitrofenilacetato e o Di(2-etilhexil) ftalato (anexo 5 Fig.21 a 27). Já no conteúdo dos bastões coletados foi possível extrair e identificar o DMP, DBP, o anidrido ftálico e butil metil ftalato (Figura 23).

Por outro lado, o processo de extração em fase sólida (SPE) foi o menos eficiente, possivelmente devido à baixa capacidade de eluição dos solventes testados (hexano e diclorometano) ou baixa afinidade com o adsorvente escolhido. Assim, na amostra analisada, usando o referido procedimento com hexano, só foi possível identificar o DMP. Usando o DCM foi possível identificar, além do DMP, o anidrido ftálico, DBP e acetato de butila. Entre os dois

tipos de solventes utilizados (hexano e o diclorometano) nas extrações por SPE e LLE, pela análise qualitativa das substâncias presentes verificou-se que o mais eficiente foi o diclorometano.

Com base nestes resultados, pode-se concluir que a metodologia mais adequada para a extração, a fim de identificar mais substâncias, foi a de *headspace*, seguida da extração líquido-líquido, usando-se a programação otimizada para análise por GC-MS, a qual é apresentada nos anexos 2 e 3A, respectivamente. Após o uso das metodologias de extração descritas, foram identificados por tentativa 23 compostos que se encontram listados na Tabela 4. O sistema de extração era testado nas mesmas condições a serem usadas no HS, SPE e LLE após sua descontaminação (branco), e como pode ser verificado, por exemplo, no cromatograma da Figura 21 onde, nenhum pico era detectado, garantindo a limpeza do mesmo e confiabilidade dos resultados.

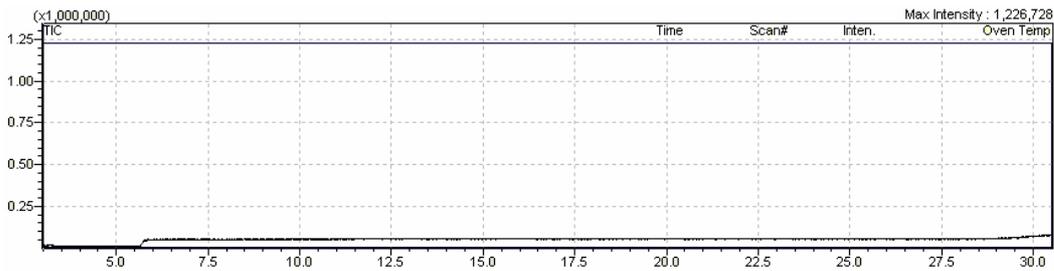


Figura 21 - Cromatograma típico (*full scan*) para o branco do sistema de extração usado para verificar limpeza do mesmo.

Para cada procedimento de extração, os resultados obtidos com as amostras analisadas nas condições otimizadas estão apresentados na Tabela 4, que contém os compostos identificados nos bastões de luz química (usados e novos). Os componentes foram identificados por tentativa, de acordo com o maior percentual de similaridade obtido para cada substância, quanto na comparação à biblioteca eletrônica NIST 147 e indicação do compartimento em que os compostos se encontravam, ao se tratar de bastões novos antes de serem ativados (conteúdo interno da ampola ou externo à ampola).

As Figuras 22 a 24 a seguir apresentam exemplos de cromatogramas obtidos pela análise da FSA do conteúdo dos bastões coletados usando ionização no MS realizada por impacto de elétrons a uma energia de 70eV, empregando-se cada um dos procedimentos de extração discutidos.

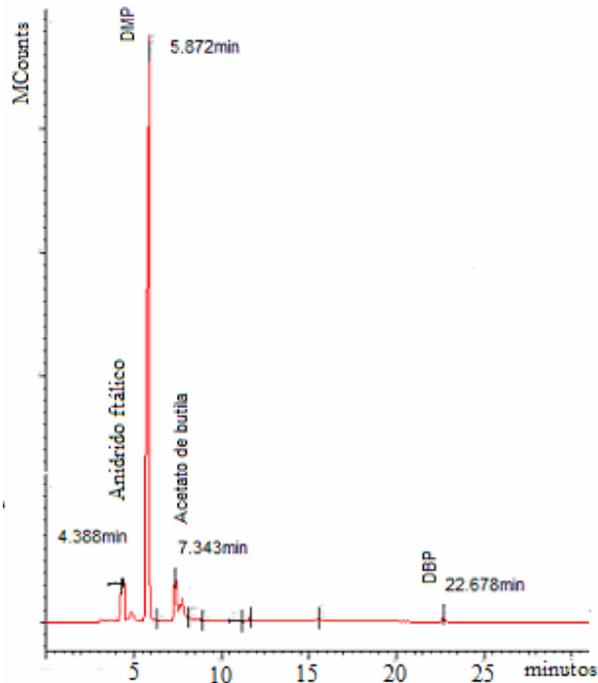


Figura 22 - Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por SPE, nas condições descritas no anexo 1.

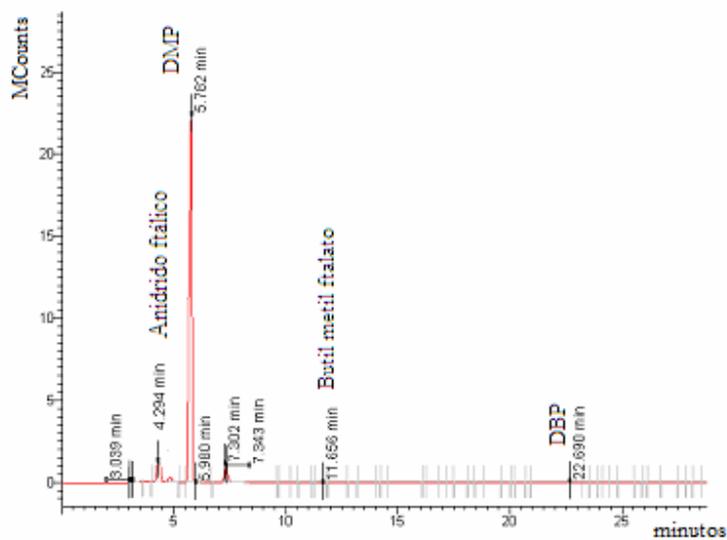


Figura 23 - Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por LLE, nas condições descritas no anexo 3A.

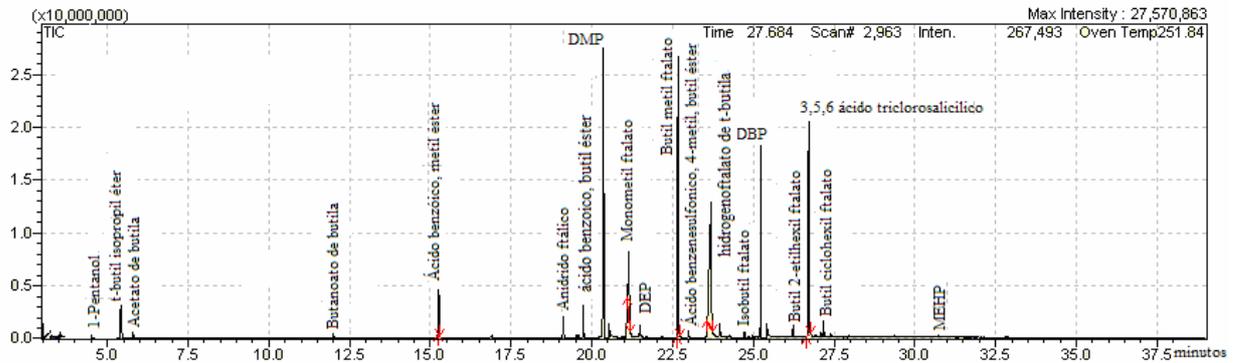


Figura 24- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por HS, nas condições descritas no anexo 2.

De acordo com a Tabela 4, confirmou-se a presença do dimetil ftalato, além da identificação por tentativa do 2-etil nitrofenilacetato no compartimento externo à ampola de vidro de bastões novos (Anexo 5- Fig. 27). No conteúdo da ampola de vidro foi possível confirmar a presença do dibutil ftalato e identificar por tentativa o diisobutil ftalato; ácido benzóico, butil éster (benzoato de butila); butil 2-etilhexil ftalato, ftalato de dietila; 2,4,6 triclorofenol (Figura 25a); ácido 3,5,6 triclorosalicílico (Figura 25b) ; 1[3H] isobenzofuranona (Figura 25c) ; e di(2-etilhexil) ftalato. Pedersen et al. (2003) conseguiram identificar por GC-MS o DBP , DMP e um composto triclorado que poderia corresponder ao 2,4,6 triclorofenol ou ácido 3,5,6 triclorosalicílico encontrado neste trabalho. O ácido 3,5,6 triclorosalicílico, também conhecido como ácido 2,3,5-tricloro-6-hidroxibenzoico, é um composto utilizado em processos envolvendo reações de quimiluminescência (Cosmos, 2010). No processo de degradação do DMP estruturas intermediárias como o monometil ftalato e o anidrido ftálico (Figura 25d) identificados, podem ser formados pelo ataque de radicais hidroxila nas suas cadeias alquil. O mesmo pode ocorrer com o dibutil ftalato formando o benzoato de butila e com o DEHP formando o mono(2-etilhexil)ftalato. Portanto, as diferentes posições do ataque de radicais hidroxila nas suas cadeias alquil podem ter produzido diferentes intermediários, justificando assim a grande variedade de ftalatos identificados. Quanto ao 2,4,6 triclorofenol (25a) e ao ácido 3,5,6 triclorosalicílico (25b) identificados, é possível que tenham sido formados a partir de clivagens do TCPO ou CPPO, oxalatos normalmente utilizados no processo de quimiluminescência dos bastões de luz química. Não há dados na literatura científica sobre os mecanismos de ação de clorosalicilatos, como os presentes nas reações quimiluminescentes dos bastões de luz química (Bechara *et al.*, 2009).

Ésteres de ácido clorosalicílico são compostos de difícil degradação e se acumulam no ambiente e nos organismos com os quais entram em contato (Bechara et al., 2009).

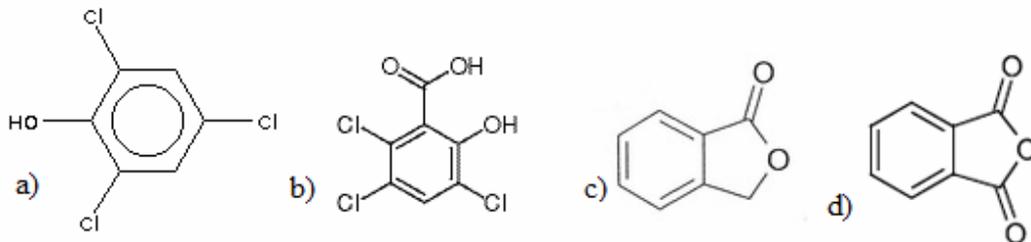


Figura 25- Estruturas de: (a) 2,4,6 triclorofenol; (b) ácido 3,5,6 triclorosalicílico; (c) 1[3H] isobenzofuranona e (d) anidrido ftálico.

De acordo com a descrição contida em patentes, a solução fluorescente deve ficar preferencialmente dentro de uma fina ampola de vidro contendo um oxalato. O fluoróforo presente nesta solução pode ser rubreno, 9,10-difenilantraceno; 1-cloro-9-10-bis(feniletinil)antraceno entre outros, e o dibutil ftalato deve atuar como solvente. A outra solução, responsável por induzir a reação de quimiluminescência dos sinalizadores, pode conter água, um catalisador (preferencialmente salicilato de sódio, 5-bromosalicilato de sódio ou 5-clorosalicilato de sódio), o peróxido de hidrogênio e o solvente (preferencialmente mistura de dimetil ftalato e álcool t-butílico). Essa solução pode ser usada fora da ampola, desde que fique separada da solução fluorescente, estando assim de acordo com o tipo de sinalizador analisado neste estudo, diferindo apenas quanto a presença do ácido 3,5,6 triclorosalicílico que foi identificado por tentativa dentro da ampola junto à solução, contendo o fluoróforo que por sua vez foi o responsável pela cor amarela do referido conteúdo.

Pela LLE de bastões novos identificou-se a presença do 2,4,6 triclorofenol, que pode estar relacionada à síntese do TCPO, a partir da reação com cloreto de oxalila, citado como reagente da reação peróxido-oxalato (Mohan & Turro, 1974).

No presente trabalho foram identificados por tentativa, dentre as várias substâncias presentes nos bastões de luz química usados, o t-butil isopropil éter e o hidrogeno ftalato de t-butila, os quais podem representar produtos de reação ocorrida com o álcool *tert*-butílico, citado como componente de bastões de luz química (Zila Technical, 2005).

Tabela 4- Substâncias encontradas nos bastões de luz química (novos e usados) usando os diferentes métodos de extração otimizados

Composto	Método de extração				Similaridade ^a (%)	Conteúdo	Origem do bastão	Anexo 5 (Figura)
	SPE	LLE	HS	SPME-ID				
Dimetil ftalato *	+	+	+	+	97	T	Novo/Coletado	9
2-etil nitrofenilacetato	-	+	-	-	75	T	Novo	27
1[3H] Isobenzofuranona	-	+	-	-	88	A	Novo	24
2,4,6 triclorofenol *	-	+	-	-	71	A	Novo	25
Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) *	-	+	-	-	85	A	Novo	22
Dibutil ftalato *	+	+	+	+	97	A	Novo/Coletado	16
Ftalato de dietila (DEP) *	-	-	+	-	91	A	Novo/Coletado	11
Diisobutil ftalato	-	-	+	+	94	A	Novo/Coletado	15
Butil 2-etilhexil ftalato	-	-	+	-	93	A	Novo/Coletado	17
Ácido benzóico, butil éster (Benzoato de butila)	-	-	+	-	97	A	Novo/Coletado	8
3,5,6 ácido triclorosalicílico*	-	+	+	+	68	A	Novo/Coletado	18
1- Pentanol	-	-	+	-	96	A + T	Coletado	2
t – butil isopropil éter	-	-	+	-	90	A + T	Coletado	3
Acetato de butila	+	+	+	-	95	A + T	Coletado	4
Butanoato de butila	-	-	+	-	96	A + T	Coletado	5
Ácido benzóico, metil éster	-	-	+	-	95	A + T	Coletado	6
Anidrido ftálico (1,3- isobenzofurandiona)	+	-	+	-	96	A + T	Coletado	7
Monometil ftalato	-	-	+	-	85	A + T	Coletado	10
Butil metil ftalato	-	-	+	-	86	A + T	Coletado	12
Ácido benzenesulfônico, 4-metil, butil éster	-	-	+	-	91	A + T	Coletado	13
hidrogênofalato t-butila	-	-	+	-	82	A + T	Coletado	14
Butil ciclohexil ftalato	-	-	+	-	82	A + T	Coletado	19
Mono(2-etilhexil)ftalato (MEHP)	-	-	+	-	97	A + T	Coletado	20

a – similaridade do espectro do composto em relação ao extraído da biblioteca eletrônica do software (NIST 147 Lib.).

Conteúdo do tubo externo a ampola -T Conteúdo da ampola- A Mistura do conteúdo interno e externo- A + T

Composto detectado pelo método (+) Composto não detectado pelo método (-)

Relatado como componente dos bastões de luz química *

4. 1.2 – Avaliação de alterações sofridas nos componentes da ampola dos bastões de luz química durante preparo da FSA

Um estudo cinético com ésteres de ácido ftálico (PAEs) em água do mar feito por Sullivan *et al.* (1982), mostrou que uma maior adsorção do DEHP em sedimento marinho e vidro dos tubos-teste ocorre durante a primeira hora e que, após 12 horas, o adsorvente sólido e a fase aquosa ficam essencialmente em equilíbrio. Assim, foram avaliadas amostras da FSA do conteúdo da ampola do bastão novo durante 13 horas, através da extração por *headspace* e análise por GC-MS a fim de identificar o comportamento dos componentes presentes e possíveis alterações ocorridas durante o preparo. As amostras, foram analisadas por HS/GC-MS, com programação de 120°C (1min)- 15°C/min – 160°C(3min)- 1°C/min – 180°C(1min)- 20°C/min – 230°C(1min), em intervalos de 30min, 1h, 2h e 13h. Os cromatogramas são mostrados no Anexo 7. Os compostos foram identificados por tentativa e a relação entre as áreas normalizadas dos picos obtidos para cada componente, ao longo do tempo, são mostrados na Figura 26 e Tabela 5. Para calcular a área normalizada considerou-se como o 100% a maior área de cada substância. Os únicos compostos identificados que desapareceram no decorrer do tempo foram o 1,4-diisobutil-1,4-dimetilbutil; nitrito de butila e butil 6-cloro-2-tioxo-1,3-benzoxazole-3(2H)-carboxilato. As substâncias em questão apresentavam baixas abundâncias, as quais diminuíram com o tempo devido provavelmente a reações ou adsorção nas paredes do recipiente, impossibilitando sua identificação após uma hora. Das 11 substâncias identificadas por tentativa (Tabela 5 e Figura 26), o benzoato de butila e o ácido cloroacético 4-pentadecil éster foram os únicos que demonstraram aumento na sua concentração final. Isso pode ser devido à sua dessorção, com o tempo, das paredes do recipiente ou por condições favoráveis a sua solubilidade. Em todas as outras substâncias identificadas verificou-se o decaimento das concentrações de acordo com a análise de abundâncias relativas, sendo que o butil 2-etilhexil ftalato, diisobutil ftalato e DBP identificados na FSA da ampola do bastão de luz química permaneceram na FSA pronta para uso como pode ser visto na Tabela 4. As concentrações das substâncias com duas horas parecem começar a entrar em equilíbrio, não apresentando grandes diferenças na área observada em relação ao tempo final analisado (13 horas). De acordo com a análise, ficou registrada a concentração consideravelmente maior do dibutil ftalato em relação aos outros compostos (Tabela 5), apesar de ter ficado claro que sua concentração diminuiu sensivelmente ($\pm 42\%$) com

o passar do tempo. As outras duas substâncias que tiveram maior abundância em relação às demais substâncias identificadas foram o butil 2-etil ftalato e o diisobutil ftalato, indicando sua importância na composição da ampola dos bastões de luz química analisados.

Tabela 5- Relação de compostos identificados por tentativa durante preparo da FSA do conteúdo da ampola dos bastões de luz química, em intervalos de 30min, 1h, 2h e 13h, com a área dos picos e área normalizada obtida de cada componente nas condições descritas no anexo 2.

Composto	Tempo	Área	Área normalizada (%)
ácido benzóico butil éster	30min	124.859	20,0
	1 hora	355.938	56,9
	2 horas	635.817	100,0
	13 horas	546.176	87,3
1,4-diisobutil-1,4-dimetilbutil	30min	545.832	100,0
nitrito de butila	30min	143.788	100,0
butil 6-cloro-2-tioxo-1,3-benzoxazole-3(2H)-carboxilato	30min	100.226	100,0
ácido pentadecanoico	30min	525.036	100,0
	1 horas	250.518	47,7
	2 horas	232.050	44,2
	13 horas	297.007	56,6
2,3-dimetil-2,3-difenilbutano	30min	331.549	100,0
	1 horas	325.679	98,2
	2 horas	162.000	48,9
	13 horas	161.861	48,8
butil 2-etilhexil ftalato	30min	1.791.495	100,0
	1 horas	971.369	54,2
	2 horas	776.118	43,3
	13 horas	734.092	41,0
diisobutil ftalato	30min	1.590.965	100,0
	1 horas	1.051.828	66,1
	2 horas	749.449	47,1
	13 horas	613.252	38,5
dibutil ftalato (DBP)	30min	10.469.935	100,0
	1 horas	9.213.765	88,0
	2 horas	5.191.889	49,6
	13 horas	6.026.920	57,56
ácido hexadecanoico	30min	864.531	90,2
	1 horas	958.244	100,0
	2 horas	586.645	61,2
	13 horas	608.701	63,5
ácido cloroacético 4-pentadecil éster	30min	159.620	71,2
	1 horas	195.233	87,1
	2 horas	168.281	75,0
	13 horas	224.219	100,0

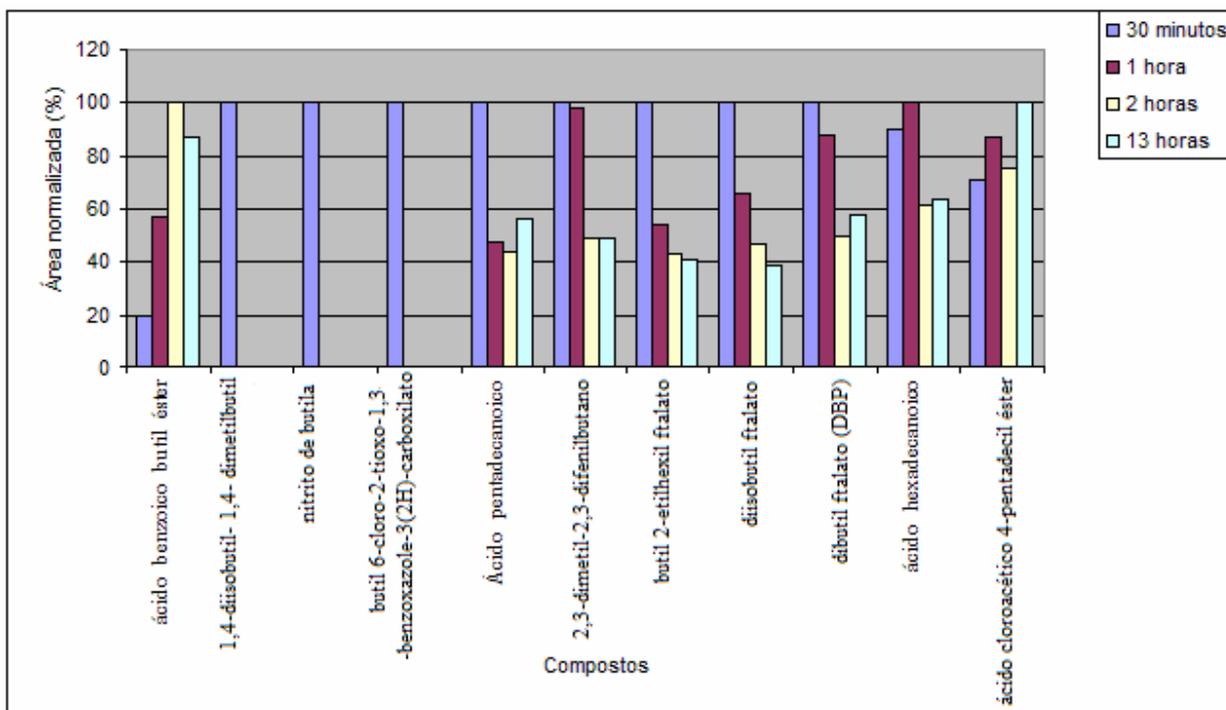


Figura 26- Representação gráfica da área normalizada das substâncias identificadas pela análise de abundâncias relativas dos compostos contidos na ampola dos bastões de luz química (novos), em intervalos de 30min, 1h, 2h e 13h durante preparo da FSA nas condições descritas no Anexo 2.

4.2- Quantificação do DBP e DMP

As curvas analíticas para DBP e DMP foram construídas a partir de cinco padrões, cujas concentrações variaram entre 0,02 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir das curvas analíticas (área *versus* concentração), construídas, foram obtidas equações com as quais foram calculadas as concentrações destas substâncias nas amostras analisadas no tempo inicial e após 6 meses (Tabela 6). Observou-se uma boa relação linear para o intervalo estudado, uma vez que o coeficiente de correlação foi superior a 0,99. Para o DBP a faixa de linearidade foi de 0,02 a 1,0 $\mu\text{g/L}$, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,992 a 0,997 e o limite de quantificação entre 0,02 e 0,05 $\mu\text{g/L}$ baseado na menor concentração utilizada na curva analítica. Para o DMP a faixa de

linearidade foi de 0,1 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, o coeficiente de correlação variou entre 0,999 a 0,997 e o limite de quantificação foi 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 6- Dados das curvas analíticas de dibutil ftalato e dimetil ftalato e limites de quantificação (LOQ) obtidos com método desenvolvido para DI-SPME.

Composto	Faixa de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva	Coefficiente de correlação (R^2)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Dibutil ftalato	0,02 – 1,0	$A=3.106 c + 25980$	0,992	0,02
	0,05 – 1,0	$A=1.107 c - 245172$	0,997	0,05
Dimetil ftalato	0,1 – 5,0	$A=16642c + 2624$	0,999	0,1
	0,1 – 10,0	$A=56642c - 3161$	0,997	0,1

O protocolo usando microextração em fase sólida do *headspace* (HS-SPME) não foi eficiente para a quantificação do DBP e DMP, provavelmente devido à grande quantidade de vapor d'água nas amostras analisadas, que tendia a saturar os sítios ativos da fibra. Sendo assim, escolheu-se o procedimento de microextração em fase sólida por imersão direta na amostra (DI-SPME) para avaliar as concentrações do DBP e DMP, por ser um procedimento rápido e eficiente. Além disso, as substâncias em questão apresentaram grande afinidade à fibra utilizada. As concentrações de DBP e DMP nas FSA dos bastões de luz química novos recém preparadas são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio padrão (N=3) do DBP e DMP nas FSA das amostras analisadas de bastões de luz química novos.

Fração solúvel em água do conteúdo dos sinalizadores	Mistura dos conteúdos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conteúdo interno ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conteúdo externo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Concentração do DBP	$18,8 \pm 0,6$	$78,4 \pm 7,2$	-
Concentração do DMP	$2860,7 \pm 7,0$	-	$4514,3 \pm 22,3$

4.3- Avaliação do efeito do tempo, temperatura e exposição à luz no comportamento das FSA do DBP e DMP

Tendo em vista o DMP e DBP serem os compostos predominantes no conteúdo dos bastões, além de apresentarem toxicidade para organismos vivos, tais como microcrustáceos marinhos como misidáceos, artemias, anfipodas e copépodos harpacticóides (Mayer & Sanders,

1973; Lindén et al., 1979) e serem suspeitos de interferir no sistema endócrino (Kim et al., 2004), o comportamento de ambos foi estudado nas FSA.

As concentrações do dibutil ftalato e dimetil ftalato, presentes nas FSA preparadas tanto a partir das substâncias puras quanto do conteúdo dos sinalizadores, foram avaliadas com relação aos efeitos do tempo e exposição à luz solar e da temperatura, em relação a possíveis processos de degradação que possam causar mudanças. A Tabela 8 apresenta os valores determinados para as diferentes condições testadas.

A concentração do DBP e DMP nas FSA preparada a partir destas substâncias puras logo após seu preparo foi de $83,6 \pm 8,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4833,3 \pm 208,2 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente (Tabela 8), semelhante às encontradas nas FSA do conteúdo dos bastões de luz química (Tabela 7) com $78,0 \pm 7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de DBP dentro da ampola e de $4514,3 \pm 22,28 \mu\text{g L}^{-1}$ do DMP no compartimento externo a ampola. Essa grande diferença de concentrações entre as duas substâncias se deve, principalmente, à maior solubilidade em água do DMP, quando comparado ao DBP. Observou-se que as concentrações do DBP e DMP diminuíram nas FSA preparadas com a mistura de ambos (DBP= $4,9 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e DMP= $318,7 \pm 10,3 \mu\text{g L}^{-1}$) e também com a mistura do conteúdo dos bastões (DBP= $18,8 \pm 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e DMP= $2860,7 \pm 7,0 \mu\text{g L}^{-1}$), embora nesse segundo caso (Tabela 7) a diminuição não tenha sido tão acentuada, provavelmente pelo efeito de cossolvência exercido por outras substâncias lipofílicas presentes. Possivelmente a redução observada em relação às FSA preparadas a partir de cada substância pura se deve a uma interação entre o DMP e DBP, levando a uma diminuição na solubilidade em água de ambos.

Tabela 8- Concentrações médias ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvios padrão (N=3) do DBP e DMP nas FSA preparadas a partir das substâncias puras e da mistura de ambos: no momento de preparo (0); mantidas em temperatura ambiente durante 6 meses no escuro (6E) e sob radiação solar (6S).

Tratamento	Substância	0 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6E ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6S ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6G * ($\mu\text{g L}^{-1}$)
DBP	Pura	$83,6 \pm 8,5$	$15 \pm 0,7$	$10,3 \pm 0,6$	$17,31 \pm 0,3$
DMP	Pura	$4833,3 \pm 208,2$	$4986,7 \pm 337,2$	$4563,3 \pm 35,1$	$4760 \pm 176,9$
DBP	Mistura	$4,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,02$	
DMP		$318,7 \pm 10,3$	$189,3 \pm 2,5$	$158,7 \pm 1,5$	

* mantidas durante 6 meses no escuro a 5°C (6G) para avaliar estabilidade das FSA.

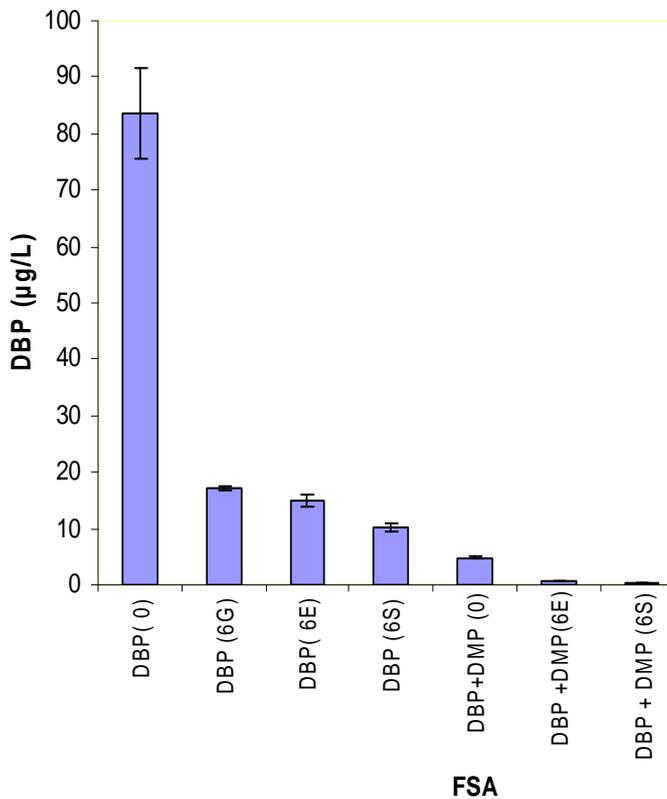


Figura 27- Concentração média (\pm desvio padrão) do DBP ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas FSA em função do tempo, temperatura e ação da luz solar (N= 3).

Pela análise da Tabela 8 e Figura 27 é possível perceber que, após 6 meses, a concentração do DBP na FSA em presença de luz solar ($\text{DBP} = 10,3 \pm 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentou uma redução na concentração da ordem de quase 88%, e considerando a FSA na ausência de luz mantida refrigerada na temperatura de 5°C e na temperatura ambiente ($29 \pm 4^\circ\text{C}$) durante o mesmo período, as reduções foram de 79% e 82%, respectivamente. Portanto, em todos os casos, mesmo a 5°C , ocorreu a diminuição na concentração do DBP em relação a verificada na FSA logo após seu preparo (pronta para ser utilizada) indicando uma baixa estabilidade deste composto. No caso da FSA exposta à luz, essa diminuição foi ligeiramente maior, porém, não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Geralmente a fotooxidação e hidrólise não tem contribuição significativa na degradação do DBP, com exceção em águas

oligotróficas alcalinas (Spectrum Laboratories, 1996 apud Loureiro, 2002). O resultado observado pode ser bom em termos ambientais, pois mostra um decréscimo considerável nas concentrações do dibutil ftalato mesmo em condições brandas de exposição (escuro e baixa temperatura).

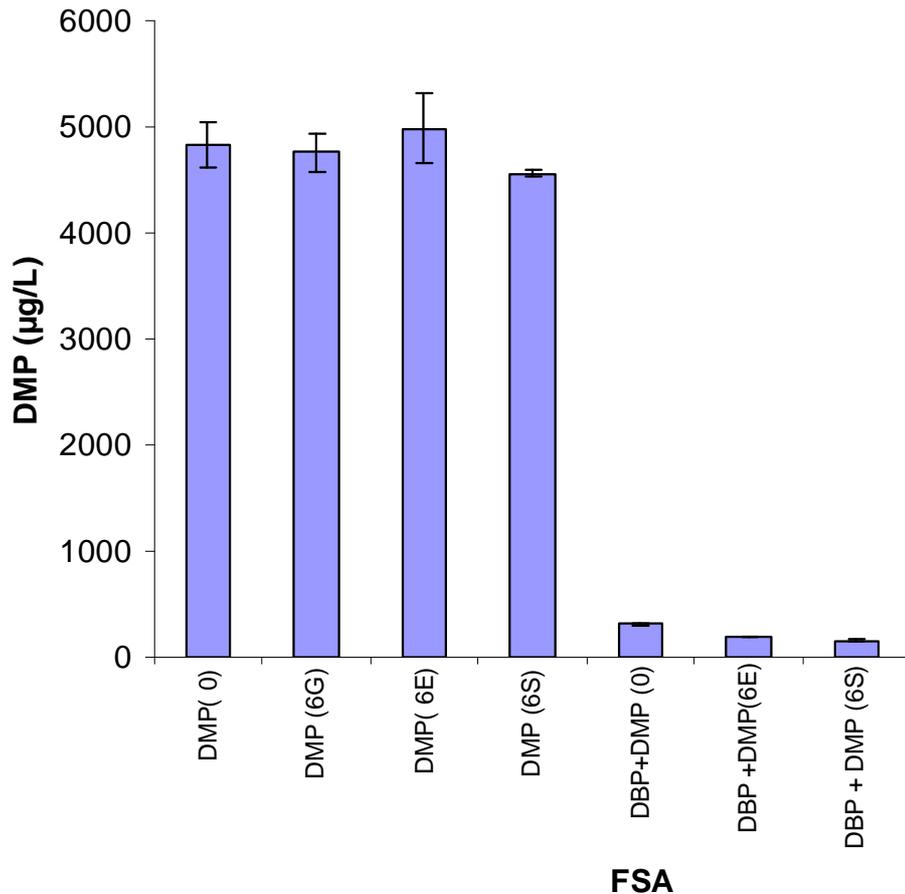


Figura 28- Concentração média (\pm desvio padrão) do DMP($\mu\text{g L}^{-1}$) nas FSA em função do tempo, temperatura e ação da luz solar (N= 3).

Com relação à concentração do DMP, as FSA mantidas por 6 meses em geladeira (DMP= $4760 \pm 177 \mu\text{g L}^{-1}$), na ausência de luz (DMP= $4987 \pm 337 \mu\text{g L}^{-1}$) e em presença de luz solar (DMP= $4563 \pm 35 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram apenas uma pequena variação (Figura 28) em relação à concentração na FSA inicial (pronta para uso), demonstrando sua persistência na FSA analisada. Por outro lado, quando foi feita a mistura de ambos os ftalatos, foi observada uma queda de concentração de ambas as substâncias tanto na FSA exposta à luz solar (DBP= 90% e DMP=

50%), como na ausência de luz (DBP= 87% e DMP= 40%). A grande diferença no comportamento do DMP em relação ao DBP se deve provavelmente a sua maior solubilidade, menor adsorção ao substrato (vidro dos recipientes), menor degradabilidade ou uma combinação destes fatores. O DBP tende a adsorver-se moderadamente aos sedimentos e particulados, enquanto que o DMP tende a se manter na coluna da água, já que é fracamente adsorvido pelos sedimentos (Spectrum Laboratories, 1996 apud Loureiro, 2002). De acordo com os resultados obtidos por Kim & Hong (2002), era esperado que expondo a luz solar, fosse intensificada a eficiência de remoção do DMP. O aumento na eficiência de remoção é causado pelo aumento da energia luminosa disponível para a quebra das ligações químicas do DMP, e de reações envolvendo catalizadores, que podem aumentar a formação de radicais hidroxila na solução (Liao & Wang, 2009). Por outro lado, de acordo com o trabalho de Liao & Wang (2009), a fotólise tem pouca eficiência na decomposição do DMP. É possível que no presente estudo a eficiência na remoção do DMP não tenha sido tão alta quanto se esperava, devido às características do pH da FSA preparada com água do mar, que simula a alcalinidade do ambiente marinho, já que, a degradação do DMP é estimulada em meio ácido, porém inibida em meio alcalino (Liao & Wang, 2009). O meio alcalino pode causar redução na concentração do radical hidroxila formado (Muruganandham & Swaminathan, 2004). Vários estudos indicam que o DMP é pouco degradado e considerado resistente ao tratamento biológico (Ejlertsson et al., 1997), estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Os resultados obtidos para as FSA preparadas com a mistura do DBP e DMP, nas condições testadas, demonstram claramente que ocorreu uma interação entre eles, a qual provocou diminuição na concentração de ambos (Tabela 8). Nas FSA das substâncias puras, houve uma significativa redução na concentração do DBP analisado após 6 meses nas diferentes condições testadas, enquanto para o DMP manteve sua concentração alta. Por outro lado, na FSA contendo o DMP misturado ao DBP, ambos tiveram redução em sua concentração após 6 meses, sendo esta mais acentuada para o DBP. O motivo para estas diferenças observadas merece investigação mais aprofundada. Em termos ambientais a diminuição na concentração dos ftalatos estudados pode ser positiva, apesar de ser necessário levar em conta que compostos mais tóxicos podem ser produzidos a partir dos processos de degradação e, neste caso, o efeito tóxico pode se manter, principalmente a longo prazo.

4.4- Testes de toxicidade embriolarvais com a *Crassostrea rhizophorae*

4.4.1- Substância de referência e carta-controlê

Os valores de CE_{50} 24h obtidos nos testes de toxicidade embriolarvais com a *Crassostrea rhizophorae* usando o DSS como substância de referência (Controle Positivo) foram plotados em uma Carta Controle do laboratório e o valor médio do CE_{50} foi de $1,36 \text{ mg L}^{-1}$. Os valores correspondentes ao desvio padrão inferior e superior a esse valor médio, obtido a partir de vários testes com a substância de referência DSS, indicaram os limites para aceitação do teste (Figura 29).

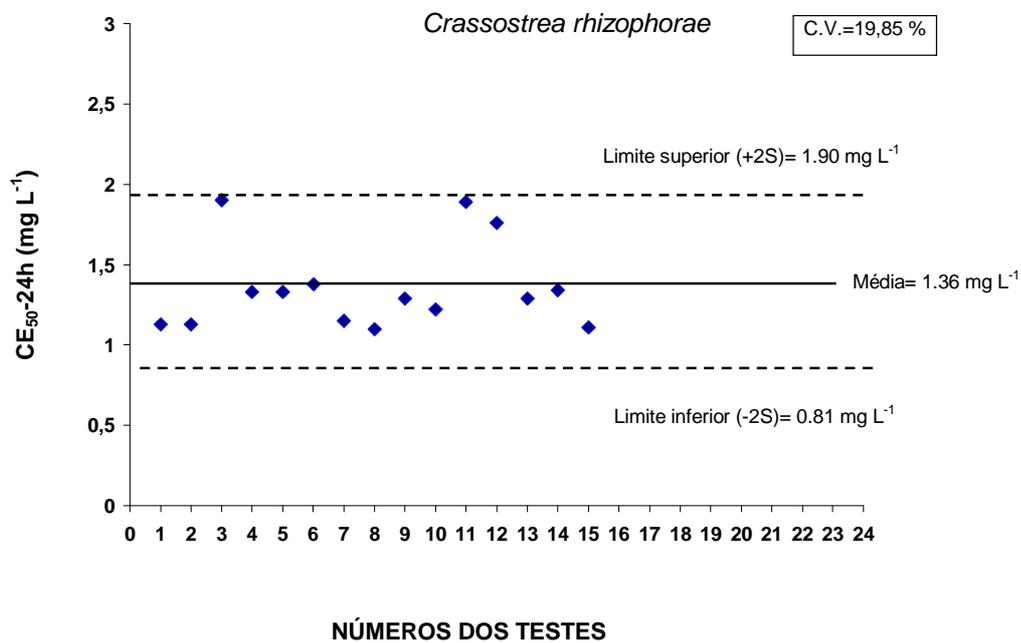


Figura 29- Controle da sensibilidade de embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* à substância de referência DSS.

Os resultados de CE_{50} obtidos posteriormente foram plotados nesta carta-controlê e, estando compreendidos nos limites estabelecidos (desvio padrão de ± 2), foram considerados

apropriados e a nova média e os respectivos desvios foram recalculados ($1,51 \pm 0,27 \text{ mg L}^{-1}$). Resultados que saem dessa faixa são facilmente identificáveis, significando que os organismos podem estar mais ou menos sensíveis, ou que as condições do teste foram alteradas, fato não identificado, garantindo assim a repetibilidade e confiabilidade dos resultados.

4.4.2- Testes de toxicidade com FSA dos solventes (DBP e DMP) e conteúdo de bastões de luz química

Em se tratando de amostras de natureza química complexa, como é o caso do conteúdo dos bastões luminosos os quais são constituídos de várias substâncias químicas, analítica e economicamente é difícil detectar, identificar e quantificar todas as substâncias presentes. Além disso, somente com a identificação e a quantificação dessas substâncias não seria possível estimar os efeitos que elas apresentam sobre a biota, uma vez que a atividade biológica de uma substância pode depender de suas interações com outros componentes presentes nestes atratores luminosos e no ambiente marinho, incluindo aqueles que não são tóxicos mas que afetam as propriedades químicas ou físicas do sistema e, conseqüentemente, as condições de vida dos organismos. Sendo assim, é impossível identificar uma única substância como responsável por um determinado efeito tóxico por si só (Ronco et al, 2004; Gherardi-Goldstein et al, 1990; Harmel, 2004). Nestes casos, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam.

No presente trabalho foi usada FSA a partir de 10% da amostra-teste em 90% de água do mar mantendo sempre esta proporção de 1:9. A parte dissolvida representa uma pequena fração do líquido oleoso na água, entretanto, foi demonstrado importante efeito tóxico nos organismos testados.

A ostra *C. rhizophorae* usada nos testes apresenta várias características de um bom indicador como: ser sésil, de fácil coleta, possuir vasta distribuição, estar presente ao longo de todo o ano e ser sensível ao estresse. Aconselha-se o uso dos embriões de ostras nos testes de toxicidade com as amostras em questão, já que possibilitam a utilização de pequenas quantidades da FSA nos recipientes testes, devido ao seu pequeno tamanho e a sua alta sensibilidade, apresentando efeitos adversos mesmo quando submetidos a pequenas concentrações. Segundo Araújo (1991), os testes de toxicidade com DSS usando embriões de ostras (*C. rhizophorae*)

apresentam sensibilidade cerca de 30 vezes maior que os com náuplios de *Artemia salina* e três vezes maior que os testes com embriões de ouriço do mar (*E. lucunter*), o que indica uma maior eficiência dos testes com embriões de ostras para atuar como indicadores de possível impacto ambiental.

4.4.3 Avaliação do efeito tóxico das FSA recém preparadas

No presente estudo, com testes de toxicidade usando embriões de *Crassostrea rhizophorae*, os resultados de CE_{50-24h} obtidos (Tabela 9 e 10) usando a FSA do DBP apresentaram média de $7,42 \pm 1,13\%$, resultando num coeficiente de variação (CV) de 15,28% diferindo significativamente de todas as FSA analisadas e demonstrando maior toxicidade que a FSA do DMP ($CE_{50} = 13,07 \pm 0,66\%$ e $CV = 5,04\%$) que, por sua vez, não diferiu significativamente dos resultados obtidos com a FSA da mistura do DBP e DMP ($CE_{50} = 15,18 \pm 2,92\%$ e $CV = 19,21\%$). Todos os resultados de toxicidade obtidos para a FSA, usando DMP, DBP e a mistura de ambos, diferiram significativamente ($P < 0,001$) das amostras analisadas com conteúdo dos bastões de luz química, que se mostraram consideravelmente mais tóxicos (Figura 30).

Tabela 9– Dados de CE_{50} obtido a partir dos testes de toxicidade com a ostra *C. rhizophorae*, usando FSA das amostras analisadas pronta para ser usada (N=4).

Fração Solúvel em Água	CE_{50} (%)
conteúdo total do bastão de luz novo	$0,35 \pm 0,06$
conteúdo da ampola	*
conteúdo externo a ampola	*
conteúdo do bastão coletado na praia	$0,69 \pm 0,05$
conteúdo total do bastão após 1 ano	0,65
DBP	$7,42 \pm 1,13$
DMP	$13,07 \pm 0,66$
DBP+DMP	$15,17 \pm 2,92$

* 100% de anormalidade na menor concentração testada de 0,32%

Tanto a FSA do conteúdo interno como a FSA do conteúdo externo à ampola dos bastões de luz química novos, usadas nos testes de toxicidade com a *C. rhizophorae*, causaram 100% de

anormalidade na menor concentração testada de 0,32%, indicando assim, a alta toxicidade dos componentes presentes no compartimento interno e externo à ampola dos sinalizadores analisados (Tabela 9).

Tabela 10 - Análise estatística dos dados de CE_{50} com média e desvio padrão (N=4).

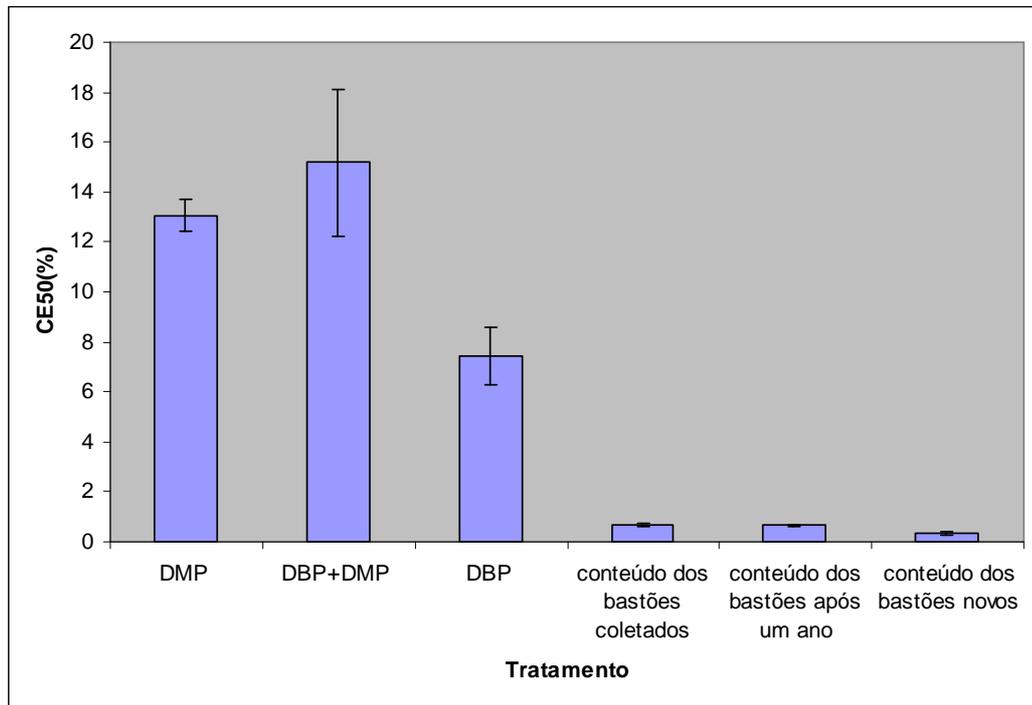
Tratamento (FSA)	Número de Pontos	Média (%)	Desvio Padrão	Erro padrão médio	Mediana	CV (%)
Bastões coletados	4	0,692	0,050	0,025	0,685	7,21
Bastões novos	4	0,352	0,065	0,032	0,340	18,44
DBP	4	7,420	1,134	0,567	7,645	15,28
DMP	4	13,070	0,660	0,330	13,035	5,04
DBP+DMP	4	15,175	2,915	1,457	14,485	19,21

Controle positivo (DSS) com $CE_{50} = 1,505 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,27$.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)
Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

O 2-etil nitrofenilacetato identificado por tentativa junto ao DMP presente no compartimento externo do bastão possivelmente foi o responsável pela alta toxicidade verificada, já que a toxicidade da FSA do DMP foi bem menor ($CE_{50} = 13,07 \pm 0,66\%$) que o conteúdo externo a ampola presente no bastão. Apesar da FSA do conteúdo da ampola apresentar a concentração do DBP um pouco menor ($78,36 \mu\text{g L}^{-1}$), quando comparada a FSA do DBP ($83,6 \mu\text{g L}^{-1}$), demonstrou toxicidade significativamente maior, indicando efeito sinérgico ou aditivo, ou ainda a presença de substâncias mais tóxicas para os embriões da *C. rhizophorae* que o DBP, como o 2,4,6 triclorofenol, diisobutil ftalato e butil 2-etilhexil ftalato classificados como muito tóxicos pela Sigma-aldrich (2010) e Netzeva & Worth (2007). Por sua vez, a FSA do conteúdo do sinalizador novo (mistura do conteúdo interno e externo a ampola) utilizada nos experimentos indicou menor toxicidade ($CE_{50} = 0,35 \pm 0,07\%$) em relação a análise separada do conteúdo interno e externo a ampola (Tabela 10). Isso pode ser em parte devido ao efeito de redução das concentrações de DMP e DBP observado na FSA da mistura de ambos por uma possível diminuição na solubilidade. Porém, pela análise feita através do programa estatístico *Graphpad instant*, verificou-se não haver diferença significativa entre os resultados de toxicidade obtidos com o conteúdo dos bastões novos e usados (Figura 30), a do conteúdo dos bastões coletados na praia teve média de $CE_{50} = 0,69 \pm 0,05\%$ e $CV = 7,21\%$, resultado semelhante ao obtido nos testes de toxicidade usando a FSA do conteúdo do bastão com um ano após sua ativação ($CE_{50} =$

0,65%). Provavelmente esta redução de toxicidade nas FSA do conteúdo de bastões usados se deve a degradação do DBP e DMP e/ou transformações sofridas por substâncias de maior toxicidade. Apesar das FSA do conteúdo interno e externo da ampola dos bastões, juntos ou separados, apresentarem concentrações de DBP e DMP menores que as FSA com estas substâncias puras (Tabela 7 e 8), elas se mostraram mais tóxicas, com $P < 0,001$ considerada extremamente significativa (Figura 30), ficando claro que tanto no conteúdo interno como no externo da ampola existem substâncias mais tóxicas e persistentes que na FSA do DBP e DMP.



Fração Solúvel em Água Analisada

Comparação de Médias Múltiplas

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($P > 0,05$)

Uso de FSA de 24h Produtos	DBP+DMP	DMP	DBP	conteúdo de bastões coletados	conteúdo de bastões após um ano	conteúdo de bastões novos
Valores CE ₅₀	15,18	13,07	7,42	0,69	0,65	0,35
	_____		_	_____		

Figura 30- Comparação de médias múltiplas e valores médios de CE₅₀ resultantes da ação das FSA testadas sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *Crassostrea rhizophorae*, num período de 24 horas de exposição.

Todos os coeficientes de variação (C.V.) calculados com base nas médias das CE_{50} obtidas nos testes de toxicidade, realizados com a *C. rhizophorae*, apresentaram valores menores que 20%, demonstrando boa precisão analítica nos resultados obtidos. Segundo o *Environment Canadá* (1990), o C.V. de até 30% é aceitável à reprodutibilidade dos resultados na ausência de algum padrão historicamente aceito. Estes 30% foram selecionados com base em discussões entre toxicologistas e autores de experiências laboratoriais, testando substâncias de referência (*Environment Canadá*, 1990).

4.4.4- Avaliação do efeito tóxico da FSA submetida a diferentes tratamentos durante seis meses

Considerando os diversos tratamentos (com e sem radiação solar) testados com FSA da substância pura do DBP e DMP (separados e juntos) seis meses após seu preparo, verificou-se que os resultados de CE_{50} , obtidos nos testes de toxicidade com embriões da *C. rhizophorae* foram semelhantes entre si, apresentando toxicidade consideravelmente menor que a verificada nos sinalizadores de luz química (Figura 31). Na FSA do DBP exposta ao sol, a concentração foi levemente menor que na FSA mantida no escuro (Tabela 8), mas o CE_{50} foi um pouco menor (Tabela 11), indicando que outras substâncias mais tóxicas que o DBP podem ter sido formadas. Por sua vez, a concentração do DMP na FSA desta substância foi consideravelmente maior ($4987\mu\text{g L}^{-1}$) na ausência, do que na presença de luz solar ($4563\mu\text{g L}^{-1}$) ao se comparar com a FSA do DMP misturada ao DBP, apresentando 189 e $159\mu\text{g L}^{-1}$ na ausência e presença de luz solar respectivamente. Porém, a toxicidade das FSA das substâncias puras foi semelhante a da mistura (DMP+DBP) mantida no escuro por seis meses. Neste caso, o efeito tóxico se deve principalmente ao DBP, apesar de sua baixa concentração ($0,60\mu\text{g L}^{-1}$); neste caso a toxicidade registrada (Tabela 11) pode ser justificada pela presença de substâncias tóxicas formadas a partir dele.

Tabela 11- Dados de CE_{50} obtido a partir dos testes de toxicidade com a ostra *C. rhizophorae*, usando FSA após 6 meses do seu preparo (6E– FSA mantida durante 6 meses no escuro e 6S– FSA mantida durante 6 meses sob radiação solar).

Fração Solúvel em Água	CE_{50} (%)
conteúdo dos bastões (6E)	0,37
conteúdo externo a ampola (6E)	*
conteúdo da ampola (6E)	*
conteúdo externo a ampola (6S)	0,54
conteúdo da ampola (6S)	1,45
DBP (6S)	10,35
DBP(6E)	11,76
DMP (6S)	13,50
DMP(6E)	12,31
DBP +DMP(6E)	12,50

* 100% de anormalidade na menor concentração testada de 0,32%

A FSA do conteúdo dos bastões se manteve tóxica no período estudado de 6 meses, tanto sob ausência de luz como quando exposta a radiação solar (Tabela 11 e Figura 31). Usando-se nos testes de toxicidade com embriões de ostras a FSA do bastão (conteúdo interno e externo a ampola misturados), mantida no escuro, obteve-se $CE_{50} = 0,37\%$. Porém, quando a FSA do conteúdo dos dois compartimentos presentes nos sinalizadores foram analisados separadamente, verificou-se 100% de anormalidade na menor concentração testada de 0,32% (Tabela 11). Nesta menor concentração testada da FSA do conteúdo externo à ampola só foram encontrados embriões da *C. rhizophorae* enquanto que, na do conteúdo da ampola foi possível identificar larvas D anormais. Após 6 meses de exposição à radiação solar, a FSA do conteúdo da ampola e conteúdo oleoso incolor externo à ampola ainda se apresentavam tóxicos ($CE_{50} = 1,45\%$ e $CE_{50} = 0,54\%$, respectivamente). Estes resultados indicam a persistência de toxicidade do conteúdo dos bastões nas FSA.

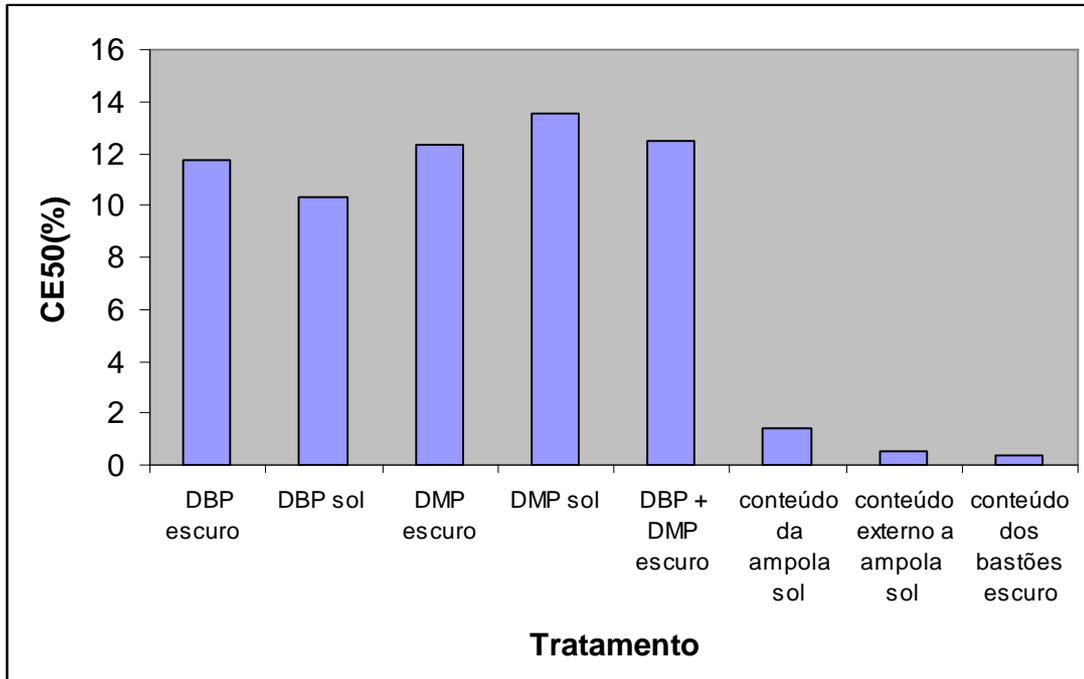


Figura 31- Valores de CE_{50} obtidos com FSA de 6 meses, exposta a diferentes condições de exposição solar.

Apesar do DBP e DMP serem os componentes que prevaleceram nos bastões de luz química novos e coletados nas praias, a FSA do conteúdo total dos sinalizadores se mostrou mais tóxica que a FSA obtida a partir de soluções padrão de DBP e DMP. Diferente da FSA do DBP mantida seis meses exposta a luz solar, as FSA dos conteúdos externo e interno à ampola dos bastões de luz química tiveram seu efeito tóxico reduzido quando comparado com o conteúdo dos bastões mantidos seis meses na ausência de luz solar (Tabela 11). Estes resultados demonstraram o efeito positivo da exposição solar na diminuição da toxicidade do conteúdo dos bastões de luz química.

4.4.5- Comparação da toxicidade dos bastões de luz química determinada no presente trabalho com dados de trabalhos prévios.

Neste estudo, usando a FSA do conteúdo de bastões de luz química coletados da mesma região de praia (Costa dos Coqueiros) dos bastões usados por Ribeiro (2010), Ribeiro & Hans (2010), Bechara *et al.* (2009), Ivar do Sul *et al.* (2009) e Pinho *et al.* (2008) o que se verificou foi

o $CE_{50-24h} = 0,69\%$ para o teste embriolarval (*early-life stages tests*) da ostra *C. rhizophorae*. Utilizando *E. lucunter* como organismo teste, para o mesmo material testado, Ribeiro (2010) obteve o CE_{50-36h} de 0,062%. Para outra espécie de ouriço do mar (*L. variegatus*) o CE_{50-24h} foi de 0,029% enquanto, para *Artemia*, os valores de CL_{50} (24h e 48h) foram respectivamente de 0,287% e 0,14%. Diferentemente do presente trabalho, Ribeiro (2010) homogeneizou o óleo com a água do mar na proporção 1:1 (o líquido contido no bastão foi dissolvido em água do mar com salinidade 35 e 5% de etanol), realizou a separação em centrífuga (1min), obtendo assim a fração aquosa que considerou como solução estoque de 100% e, a partir do qual, foram preparadas as diluições para a execução dos testes. A alta toxicidade verificada pode ser justificada pelo fato da fração aquosa utilizada ser cinco vezes mais concentrada que a FSA usada no presente trabalho, além de ter sido usado o etanol, que permitiu uma maior dissolução dos componentes do bastão, tornando a FSA utilizada por Ribeiro (2010) consideravelmente mais concentrada. No presente estudo foi avaliada a toxicidade das substâncias dissolvidas na água num processo natural (sem nenhum tipo de solvente envolvido), possibilitando assim se alertar quanto ao perigo real destes compostos no ambiente aquático.

Bechara et al.(2009) afirmam que o conteúdo de atratores encontrados nas praias são capazes de modificar a albumina e bases nitrogenadas do DNA em reações em laboratório. Ivar do Sul et al (2009) avaliaram o efeito do conteúdo dos bastões coletados nas praias da Costa dos Coqueiros na pele de ratos Wistar e verificaram alterações nos tecidos biológicos através de análises histopatológicas, indicando que podem conduzir ao câncer de pele, ressaltando assim, a necessidade de se investigar melhor o efeito do conteúdo dos bastões sobre a vida costeira e marinha.

A toxicidade do conteúdo dos bastões variou em outros trabalhos (Ribeiro & Hans, 2010; Pinho et al, 2008, Portz et al, 2005) em função da metodologia empregada para o preparo da fração aquosa a ser estudada (concentração diferente, tempo sob agitação diferente, etc) e análise laboratorial, dificultando assim a comparação dos resultados. Outro problema encontrado foi que todos os testes de toxicidade relatados na bibliografia consultada foram realizados com bastões coletados nas praias, não havendo assim um controle do tempo transcorrido desde sua ativação.

O presente estudo permitiu a identificação dos possíveis componentes que podem estar interagindo, causando os efeitos tóxicos obtidos nos testes de toxicidade. Apesar do DBP e DMP serem os componentes que prevalecem nos bastões novos e nos coletados nas praias, as FSA do

conteúdo total dos mesmos se mostraram mais tóxicas que as FSA obtida a partir de soluções puras de DBP e DMP, o que leva a crer que outros contaminantes presentes estão determinando esta maior toxicidade. Além do DBP e DMP, outros componentes como o anidrido ftálico, monometil ftalato citados como produtos intermediários do DMP (Liao & Wang, 2009) e o mono(2-etilhexil)ftalato puderam ser identificados por tentativa nos bastões de luz química. Monoésteres e anidrido ftálico são relatados como principais produtos formados pelas rotas de degradação de ftalatos (Loureiro, 2002). Segundo Loureiro (2002), o anidrido ftálico também pode ser obtido pela oxidação do naftaleno. O mono(2-etilhexil)ftalato pode ser resultante de hidrólise do DEHP, o qual foi identificado dentro da ampola do bastão. Tanto o DEHP quanto o MEHP tiveram seu efeito genotóxico observado em linfócitos humanos, de acordo com o trabalho de Anderson et al. (1999). Este efeito genotóxico do MEHP foi confirmado nos linfócitos e também em células da mucosa humana (Kleinsasser, et al. 2004).

Tanto o DBP, como o diisobutil ftalato identificados por tentativa nos bastões coletados nas praias e novos, foram classificados como genotóxicos para células humanas da mucosa nasal e faringe por Kleinsasser et al. (2000a), na laringe e faringe de pacientes com células escamosas cancerosas (Kleinsasser et al., 1999) e em linfócitos de pacientes com e sem tumor (Kleinsasser et al., 2000b). O DBP e seu isômero diisobutil ftalato (DiBP) tem um impacto genotóxico não somente em células epiteliais, mas também em linfócitos humanos (Kleinsasser et al., 2001). Estes ftalatos citados podem ser apontados como responsáveis por boa parte do efeito tóxico verificado nos bastões; embora não sejam muito solúveis em água, em pequenas concentrações já causam danos ao ser humano. As propriedades tóxicas do DBP merecem mais atenção, considerando sua persistência no ambiente e o alto nível do potencial de bioacumulação em diferentes organismos (Staples et al., 1997). Nos últimos anos, a pesquisa ambiental tem se defrontado com sérios problemas em relação a algumas substâncias presentes no meio aquático em pequenas concentrações, como os disruptores endócrinos.

Dentre as substâncias identificadas no presente trabalho, cinco delas estão na lista dos 126 poluentes prioritários listados pela USEPA (2010): o 2,4,6 triclorofenol, DEHP, DBP, DEP e DMP. A tabela 12 apresenta uma relação das substâncias encontradas classificadas de acordo com sua toxicidade, permitindo assim identificar os componentes mais tóxicos e, portanto, possíveis causadores da alta toxicidade identificada no conteúdo dos bastões analisados.

Tabela 12- Classificação das substâncias encontradas nos bastões de luz química de acordo com o nível de toxicidade.

Composto	Nível de toxicidade	Referência
1- Pentanol	Nocivo	b
1[3H] Isobenzofuranona	Nocivo	b
2,4,6 triclorofenol	Suspeito de provocar câncer Muito tóxico para organismos aquáticos Perigoso para o ambiente	b
Acetato de butila	Nocivo	a
Benzoato de metila	Nocivo	a
Anidrido ftálico	Tóxico	b
Benzoato de butila	Nocivo	a
Dimetil ftalato	Nocivo	a
Monometil ftalato	Nocivo	b
Ftalato de dietila (DEP)	Nocivo	b
Ácido benzenesulfônico, 4- metil, butil éster	Nocivo	b
Diisobutil ftalato	Muito tóxico para organismos aquáticos Pode comprometer a fertilidade	b
Dibutil ftalato	Muito tóxico para organismos aquáticos Pode comprometer a fertilidade Perigoso para o ambiente	b
Butil 2-etilhexil ftalato	Muito tóxico	c
3,5,6 ácido triclorosalicílico	Nocivo	a
Butil ciclohexil ftalato	Muito tóxico	c
Mono(2-etilhexil)ftalato (MEHP)	Nocivo	c
Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	Tóxico Pode comprometer a fertilidade	b

a-Sigma-aldrich (2011) b- Sigma-aldrich (2010) c- Netzeva & Worth (2007)

Compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), apesar de não terem sido detectados no presente estudo são descritos na constituição dos sinalizadores, como responsáveis pela cor (fluoróforo), apresentando fluorescência quando excitados por radiação ultra-violeta. Segundo Tevini (1993), o antraceno, presente em alguns atratores, absorve fortemente na faixa do UV-A, entre 310 e 360nm. A sua capacidade sub-carcinogênica e mutagênica (Boffeta et al., 1997; Who, 1988) dificulta e interfere em processos essenciais como replicação, transcrição e tradução, podendo causar a deformação das larvas, ou até apoptose e necrose celular. É possível que tenha havido a perda do HPA no preparo da FSA, devido sua baixa concentração e solubilidade em água ou este componente pode ter sofrido transformações, justificando assim não ter sido possível sua detecção nas FSA estudadas. Outra possibilidade é a de que outro tipo de substância tenha atuado como fluoróforo nos sinalizadores estudados, como

exemplo, o composto aromático 1,3-difenilisobenzofurano (DFB), citado como ativador (ACT) na emissão de luz verde (Albertin et al, 1998). Maybodi et al. (2010) descreveram um novo processo de quimiluminescência, usando derivados de quioxalinas como fluoróforos.

Os testes de toxicidade realizados com a mistura do DMP e DBP revelaram uma menor toxicidade em relação aos testes realizados com o DMP e DBP separadamente. Desde que as solubilidades do DMP e DBP juntas foram menores do que as suas solubilidades individuais, é possível que a toxicidade tenha se reduzido em função disso. Nos bastões de luz química, porém, a redução na concentração foi principalmente verificada para o DBP, e mesmo assim, foi pequena quando comparada com a concentração verificada na FSA da mistura do DBP e DMP. Isso se deve possivelmente a presença de outros solventes no bastão que facilitam a dissolução de seus componentes. Os testes com o conteúdo dos bastões após um ano de ativação no laboratório indicaram o possível risco para o ambiente, mesmo após um longo tempo de exposição do conteúdo devido à persistência de sua toxicidade.

Nos testes embriolarvais com a *C. rhizophorae* foi evidenciada a maior toxicidade do líquido viscoso incolor que estava no compartimento externo a ampola de vidro dos bastões de luz química, apresentando o dimetil ftalato como solvente e, provavelmente, contendo também o 2-etil nitrofenilacetato e peróxido de hidrogênio. Como foram feitos testes de toxicidade com o dimetil ftalato e provou-se que a concentração do dimetil ftalato da FSA do conteúdo externo à ampola de bastões novos era equivalente a da FSA usada nos testes de toxicidade do DMP, deduziu-se que essa maior toxicidade observada nos bastões era devida a outros componentes. Segundo Ribeiro (2010), a toxicidade do conteúdo dos bastões sofre interferência do tiosulfato de sódio e da aeração, indicando que compostos oxidáveis, como o peróxido de hidrogênio, são removidos pelo tiosulfato de sódio e os voláteis, como os HPA, pela aeração, demonstrando que podem ser possíveis responsáveis pelos efeitos tóxicos. Uma possibilidade seria resultante da ação do peróxido de hidrogênio; por ser uma espécie reativa de oxigênio (ERO), causando efeitos oxidativos em nível celular e supramolecular (Storey, 1996) e aumentando a atividade enzimática das peroxidases que catalisam a redução dos peróxidos (Uliana et al., 2008), poderia estar promovendo gasto energético o que determina como consequência o atraso no desenvolvimento das larvas. O efeito crônico do peróxido de hidrogênio já foi avaliado para cladóceros (Meinertz et al., 2008), demonstrando sua atividade xenobiótica. Porém, no presente trabalho, ao utilizar a FSA obtida com o conteúdo incolor que circunda a ampola do bastão, verificou-se a manutenção

da toxicidade após 6 meses, ficando evidente que o H_2O_2 não é o responsável por esta toxicidade, já que certamente não estava mais presente por ser instável e de rápida decomposição. Podemos deduzir que o responsável por essa toxicidade é outro componente ou a mistura de vários presentes neste compartimento, possivelmente o 2-etil nitrofenilacetato ou interação deste componente com o DMP.

O conteúdo dos bastões se mostrou bastante tóxico para embriões da *C. rhizophorae* e persistente ao longo do tempo. Como a ostra é considerada espécie-chave no ecossistema estuarino, fica evidenciado o perigo do conteúdo dos sinalizadores causarem efeitos a longo prazo neste ecossistema.

4.5- Características das FSA utilizadas e risco do conteúdo dos bastões de luz química para o ambiente

Verificou-se que a FSA recém preparada do DBP apresentou pH de 9,3, a do DMP foi de 8,4 e a mistura de ambos foi bem semelhante com pH de 8,5. A FSA do conteúdo interno da ampola de vidro (cor amarela) dos bastões de luz química novos apresentou pH de 6,8 e quanto ao conteúdo externo (incolor) foi de 2,7. Apesar do conteúdo externo à ampola ter se mostrado muito ácido, a quantidade da FSA utilizada na faixa de concentração selecionada para os testes de toxicidade foi consideravelmente pequena, não sendo suficiente para alterar o pH das amostras analisadas dos recipientes testes, que se mantiveram em torno de $8,5 \pm 0,4$ em todos os tratamentos avaliados.

Como resultado da baixa solubilidade em água e alto coeficiente de partição octanol/água, ésteres de ácidos ftálicos tendem a se acumular no solo, sedimento e na biota que vive na água (Xu & Li, 2008; Wang et al., 2004). O DMP, DEP, DIBP, DBP e DEHP apresentam, respectivamente, solubilidade em água de $4,5 \times 10^7$; $1,2 \times 10^6$; $6,2 \times 10^3$; $1,01 \times 10^3$ e $41 \mu\text{g L}^{-1}$ (Leyder e Boulanger, 1983 apud Loureiro, 2002). A solubilidade do DBP e DEHP foi reportada como sendo de 28×10^3 e $18 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para água destilada (Morita et al., 1974) e de $3,2 \times 10^3$ e $1,2 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para água do mar artificial (Kakareka, 1974 apud Sullivan, 1982). No presente trabalho, as concentrações do DMP e do DBP nas FSA recém preparadas foram, respectivamente, de $4,8 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,083 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$, valores bem menores que os valores de solubilidade em água relatados por Loureiro (2002). Isso pode se

explicar pela esperada diminuição da solubilidade dos referidos ftalatos na água salgada, como verificado nos resultados obtidos por Sullivan et al. (1982) e pelo procedimento usado para avaliar a solubilidade. Segundo Loureiro (2002), geralmente a solubilidade de ftalatos em água é baixa, mas dispersões coloidais ou adsorção a partículas e sedimento podem ocorrer, gerando concentrações aparentemente maiores. As amostras de sedimento mostram significativa irreversibilidade de adsorção, sugerindo que o sedimento marinho pode atuar como repositório final para os ésteres ftálicos (Sullivan et al., 1982).

Convém considerar que, além do efeito adverso da FSA nos organismos aquáticos, os componentes oleosos dos sinalizadores depositados no substrato (sedimento marinho) e a presença da fina camada oleosa superficial podem interferir no desenvolvimento e sobrevivência dos organismos, além de fazer com que o efeito tóxico permaneça mais tempo no ambiente, oferecendo perigo aos organismos que vivem associados ao substrato e na superfície da água. O conteúdo dos sinalizadores poderá ser adsorvido ou absorvido por organismos, por alimentos e por outros tipos de materiais presentes no ambiente em questão. A extensão da adsorção aumenta com o aumento da salinidade ou com a diminuição na solubilidade dos ftalatos, a exemplo do DBP (Sullivan et al., 1982, Xu & Li, 2008). A diminuição na solubilidade do DBP resultante do aumento da salinidade pode forçar efetivamente o componente químico para a superfície do sedimento (Chiou, 1981). Com a diminuição da salinidade de 30 para 5, diminui a quantidade do DBP adsorvido no sedimento marinho (Xu & Li, 2008). Como só foi avaliado o efeito tóxico da FSA, estima-se que a ação adversa e a persistência do conteúdo dos bastões de luz química sejam ainda maiores do que os resultados apresentados neste estudo.

Uma vez no ambiente, os contaminantes podem estar sujeitos a uma combinação de processos que podem afetar o seu destino e comportamento. Em oceano aberto, as concentrações do líquido oleoso contido nos bastões poderiam decrescer rapidamente devido à dispersão e às correntes marinhas. Mas, geralmente, estes sinalizadores são levados pelas correntes marinhas e pela ação das ondas para ambientes costeiros, onde é mais difícil ocorrer a redução na concentração das substâncias presentes nos bastões, uma vez que, quando atingem a costa, vários fatores relatados por Bicego et al. (2008) podem determinar a sua persistência, como as propriedades do contaminante, porosidade do sedimento, presença de organismos, atividade de ondas, etc. Na superfície da água do mar, vários processos físico-químicos podem alterar a

composição e toxicidade de alguns tipos de xenobióticos como, por exemplo, o líquido oleoso contido nos atratores analisados.

Considerando que o conteúdo dos bastões de luz química é oleoso, numa avaliação de risco ambiental deve-se levar em conta o comportamento do óleo na água, que vai depender dos componentes que possuem, com propriedades distintas. Com a emulsificação, processo de formação de vários estados de óleo em água (Bícego et al., 2008), normalmente ocorre um aumento de aproximadamente mil vezes na viscosidade, diminui o espalhamento e a evaporação e devido à sua estabilidade e persistência, fica retardada sua eliminação, inibindo algumas reações químicas e biológicas, uma vez que se reduz a área exposta ao ar e à água (Fernandes, 2001). A fração dissolvida também pode ser foto-oxidada e os produtos resultantes, por serem mais solúveis, dispersam-se mais na coluna d'água (NRC, 1985). A degradação microbiológica dependerá da disponibilidade de nutrientes de cada ambiente em questão. Grande parte do óleo que sofre evaporação é oxidada fotoquimicamente e os produtos podem retornar ao ambiente marinho (NRC, 1985). Fatores como quantidade e características dos componentes orgânicos nos sedimentos naturais, podem influenciar significativamente o comportamento a longo prazo dos ftalatos nos sedimentos marinhos. Com o aumento da lipofilicidade do adsorvente aumenta a adsorção dos ftalatos (Sullivan et al, 1982). A adsorção do DBP nas partículas e sedimentos afeta outros processos de transformação em águas naturais, incluindo transporte, dissolução, degradação, volatilização e bioacumulação (Xu & Li, 2008), o que ressalta a importância destes processos que também vão determinar o destino dos ftalatos no sistema aquático.

5- CONCLUSÕES

Dentre os métodos de extração testados e otimizados neste estudo, o de *Headspace* acoplado com a análise por GC-MS foi o de maior eficiência para extrair e identificar as substâncias presentes nos bastões de luz química. Através das análises químicas foi possível identificar um total de 23 substâncias presentes no conteúdo dos bastões analisados. Destas, foram também quantificados o dimetil ftalato, e dibutil ftalato, sendo estes os componentes predominantes na constituição dos dispositivos.

Alguns dos compostos identificados no presente trabalho já foram relatados na bibliografia como componentes envolvidos nos processos de quimiluminescência dos bastões,

como o DBP, DMP, DEHP e DEP, que atuam como solventes, o 2,4,6 triclorofenol, importante na síntese do TCPO, e o ácido 3,5,6 triclorosalicílico, como intermediário no preparo do CPPO. Os demais componentes relatados neste estudo são citados como resultantes de reações e processos de degradação, como é o caso do anidrido ftálico e monoésteres de ftalato. Foram também identificados por tentativa isômeros como o diisobutil ftalato e MEHP. Outros podem ter sido citados pela primeira vez neste trabalho, como é o caso do 1[3H] isobenzofuranona e o 2-etil nitrofenilacetato.

Apesar dos testes de toxicidade com o DBP e DMP terem sido positivos, existem componentes nos bastões que potencializam esta toxicidade e a sua persistência, sendo eles possivelmente o 2,4,6 triclorofenol, diisobutil ftalato, butil 2-etilhexil ftalato e 2-etil nitrofenilacetato, e outros resultantes do processo de degradação do DMP, DBP e DEHP, encontrados na FSA do conteúdo de bastões usados. As amostras de FSA submetidas a ausência e exposição ao sol durante seis meses não apresentaram mudanças significativas na toxicidade. As concentrações do DMP nas FSA, devido a sua maior solubilidade, foram maiores que as do DBP que, por sua vez, demonstrou maior toxicidade.

Na FSA da mistura DMP+DBP, ocorreu uma diminuição na concentração de ambas substâncias, quando comparadas à das FSA desses compostos individualmente, provavelmente devido a uma interação existente entre as referidas substâncias.

A mistura presente no compartimento externo à ampola apresentou alta toxicidade (tanto na FSA recém preparada quanto na analisada após 6 meses). O 2-etil nitrofenilacetato, identificado neste trabalho, assim como outros possíveis produtos não identificados de reações com o peróxido de hidrogênio, podem ser responsáveis por essa toxicidade. O conteúdo da ampola também se mostrou muito tóxico. Em ambos compartimentos o conteúdo da FSA após 6 meses manteve a toxicidade alta.

Os resultados deste trabalho apontam para a importância de se estudar com maior profundidade os componentes dos bastões de luz química e seus produtos de degradação, pelo fato de terem demonstrado alta e persistente toxicidade, e terem sido identificadas em seus conteúdos substâncias carcinogênicas e disruptores endócrinos. Os dados obtidos no presente estudo poderão ser usados para avaliar e identificar os componentes mais perigosos presentes nos bastões, possibilitando assim propor mudanças bem fundamentadas na sua composição, alertando tanto quanto aos perigos existentes como aos cuidados que devem ser tomados.

6- RECOMENDAÇÕES

Sugere-se um estudo para identificar inequivocamente, por meio de técnicas mais robustas de identificação como GC –MS/MS, HPLC-MS/MS e padrões, as demais substâncias identificadas por tentativa neste trabalho, procurando assim estabelecer a composição exata dos conteúdos interno e externo dos bastões. Neste aspecto, deve-se dar atenção especial ao conteúdo externo, no caso dos dispositivos utilizados neste estudo, tendo em vista sua aparente maior toxicidade em relação ao conteúdo interno. Além disso, deve-se verificar a possibilidade de realizar testes de toxicidade com cada uma destas substâncias isoladamente.

Além dos bastões de luz química, outros adereços luminosos semelhantes como braceletes e colares, são amplamente usados em festas sem qualquer preocupação com o manuseio e descarte desses materiais. Tendo em vista que todos os bastões comercializados em Salvador-BA são importados e nenhum deles apresenta dados quanto a sua composição química, é necessário mobilizar os respectivos círculos científicos e a comunidade em geral, no que se refere à necessidade de demonstrar o perigo em potencial, praticamente desconhecido por todos os segmentos da nossa sociedade, quanto ao descarte indevido e à exposição do conteúdo destes artefatos. Pois não havendo uma regulamentação e esforço para se identificar a origem e a composição dos bastões, se acontecerem danos ao ambiente ou aos seres humanos, não existem informações e dados suficientes para responsabilizar o causador do prejuízo (empresa, país), sendo assim difícil ou até impossível buscar as soluções corretas e desejáveis.

Para finalizar, é necessário sublinhar a importância de dar continuidade à limpeza das praias e realizar ações educativas que conscientizem a população para evitar o uso indevido e perigoso dos bastões. Como a prevenção ou diminuição dos aportes é a estratégia mais eficiente a longo prazo, recomenda-se melhorar a infra-estrutura dos portos já existentes, aumentar a quantidade dos portos nos pontos críticos da costa brasileira e criar novos mecanismos para fiscalizar os navios de pesca, evitando assim o descarte indevido dos atratores no mar e no lixo comum.

As ações sugeridas acima fazem parte da luta pela preservação do meio-ambiente, garantindo a sobrevivência e manutenção da diversidade não somente do ecossistema das zonas costeiras do Estado da Bahia e do Brasil, senão também dos oceanos em geral de todo o nosso Planeta.

REFERÊNCIAS

- ACEY, R.; HEALY, P.; UNGER, T.F.; FORD, C.E.; HUDSON, R.A. Growth & aggregation behavior of representative phytoplankton as affected by the environmental contaminant di-n-butyl phthalate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.39, p.1-6, 1987.
- ADAMS, R.N. Anodic oxidation pathways of aromatic hydrocarbons and amines. *Accounts of Chemical Research*, v.2, p. 175-180, 1969.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic toxicology test methods. In: Hoffman, David. J. et al. *Handbook of ecotoxicology*. 2. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003, cap. 2, p. 19-43.
- ALBERICI, R. M. **Destrução de compostos orgânicos voláteis em fase gasosa por fotocatalise heterogênea**. 1996. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- ALBRO, P.W. et al. Chromatographic separation and quantitative determination of the metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate from the urine of laboratory animals. *Journal Chromatogr.* v. 244, p. 65-79, 1982.
- ALBERS, P.H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J. RATTNER, B.A; BURTON, Jr. G.A. ; CAIRNS, Jr. J. (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- ALBERTIN, R. et al. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova*, v. 21, n.6, p. 772-779, 1998.
- ALEBIC-JURETIC, A.; CVITAS, T.; KLASINC, L. Heterogeneous polycyclic aromatic hydrocarbons degradation with ozone on silica gel carrier. *Environ. Sci. Technol.*, v. 24, n.1, p. 62-66, 1990.
- AMERICAN CYANAMID COMPANY. Chemiluminescent liquid dispensing or display container. Rauhut, Michael McKay. *United States Patent*. n. 3.584.211, 3 feb. 1971.
- _____. Chemiluminescent light container. Anthony Koroscil. *United States Patent*. n. 4.640.193, 3 feb. 1987.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. American Water Works Association. Water Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20. ed., Washington: American Public Health Association, 1998.
- ANAZAWA, T. A. **Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE**. 1996. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

ANDERSON, J.W. et. al .Characteristics of dispersion and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine. Biology**, v. 27, p. 75-88, 1974.

ANDERSON, J. W. Oil pollution: effects and retention in the coastal zone. **Proc. Siuec.**, Rio Grande, RS, Brazil, n.1, p. 197-214., 1985.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; HINCAL, F. Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay. Teratogen. **Carcin. Mut.**, v. 19, p. 275-280. 1999.

API - American Petroleum Institute. **Recommended practice**. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H), 1984.

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.

ARAÚJO, M.M.S. DE. **Testes de toxicidade como mecanismo de biomonitoramento e previsão de impacto ambiental – I**. 1991. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1991.

ARAÚJO, M.M.S. DE; NASCIMENTO I.A. Testes ecotoxicológicos marinhos: análise de sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, Coimbra, v.1, n.1, p. 41-47. 1999.

ARFELLI, C.A.; AMORIM, A.F. Description of the Brazilian swordfish fishery, in Santos. **Collective Volume of Scientific Papers**, ICCAT, Madrid, v. 27, p 315-7, 1988.

_____. Analysis of Santos (SP) longliners from southern Brazil. **Collective Volume of Scientific Papers**, ICCAT, Madrid , n. 51, v. 4, p. 1359-1366, 2000.

ARNOT, J.A.; GOBAS, F. A. P. C.A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. **Environ. Rev.**, v. 14, p. 257-297, 2006.

ASTM - American Society for Testing and Materials. Guide for conducting static acute toxicity testing with embryos of four species of saltwater bivalve mollusks. E724-89. In: **Annual Book of ASTM Standards: water and environmental technology**, Philadelphia, PA., USA, v. 11.05. p. 221-238, 1995.

_____. Guide for conducting static toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve mollusks. E 724-89. In: **Annual Book of ASTM Standards: water and environmental technology**, Philadelphia, section, p. 377-394, 1992.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for di(2-ethylhexyl)phthalate. Update. **Final Report**, ATSDR/TP-92/05, Atlanta, GA: ATSDR, Public

Health Service, U. S. Department of Health and Human Services, NTIS Accession n. PB93-182400, 1993, 171 p.

ATKINSON, R. et. al.. A survey of ambient concentrations of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) at various locations in California. **Final Report for California Air Resources Board**. Contract n. A5-185-32, Sacramento, CA. 1988.

AXFORD. I. Consumer safety research programme. **Fluorescent Lightsticks**. LFX/40/110 E2. 8 p. 14 October 1999.

AZEVEDO, V.G.; KOTAS, J.E.; DOS SANTOS, S. A pesca de espinhel de superfície (“Longline”) na região Sudeste-Sul ano 1998. **Relatório anual técnico-científico**. Programa REVIZZE- Score Sul. Itajaí, SC, 1999.

BÁEZ, M. C. D.; ROSSINI, G. D. B. ; GRANADOS, Y. P. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. In: MORALES, G. C. (Ed.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004. cap. 5, p. 99-124.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.

BARTOLONI, F. H. et. al. Transferência de elétron inversa na quimiexcitação da reação peróxido-oxalato usando ativadores facilmente redutíveis. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 1-9, 2010.

BAUMARD, P. et. al.. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 47, p. 77-90, 1998.

BECHARA, E.J.H. et. al. Atratores luminosos: poluição na costa brasileira. **Ciência Hoje**, v. 43, n. 257, 2009.

BELARDI, R. P.; PAWLISZYN, J.B. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. **Water Pollut. Res. J. Can.** v. 24, p. 179-191, 1989.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na Grande São Paulo. **Ciência e Cultura**, v. 42, n.3/4, p. 271-277, 1990.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com danio rerio (pisces, cyprinidae)**. 2000. 117 f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

BICCHI, C. RUBIOLO, P. Influence of fibre coating in headspace solid- phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. **J. Chromat. A**, v. 892, p. 469-485, 2000.

BÍCEGO, M. C. et. al., Poluição por petróleo. In: BAPTISTA NETO , José Antônio; WALLNER-KERSANACH , Mônica; PATCHINEELAM, Soraya Maia (Orgs.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 4, p. 77-96.

BIDLEMAN, T. F. Atmospheric processes. **Environ. Sci. Technol.**, v. 22, 1988. p. 361-367.

BIGELOW, K.; MUSYL, M.K.; POISSON, F.; KLEIBER, P. Pelagic longline gear depth and shoaling. **Fish. Res.** v.77, p. 173-183, 2006.

BILA, D.M. & DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes & Control**, v. 8, p. 444-472, 1997.

BONETTI, C. **Foraminíferos como bioindicadores do gradiente de estresse ecológico em ambientes costeiros poluídos**: estudo aplicado ao sistema estuarino de Santos. 2000. 229 f. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), São Vicente, SP, 2000.

BOS, R. et. al. Search of a chemiluminescence 1,4-dioxy biradical. **J. Am. Chem. Soc.**, v.131, p. 2770-2771. 2009

BRAITHWAITE A.; SMITH F. J., **Chromatographic methods**. 5. ed. Dordrecht: Ed. Kluwer Academic, 1999.

BRASIL. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Projeto Flora/Fauna - Ue/Ba - Herbário RadamBrasil**: flora das restingas do Litoral Norte da Bahia Costa dos Coqueiros e Salvador. 2004. p. 137.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal (MMA). **Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil**: na escala da União. 1996. 277 p.

BROWN, D. et. al. The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. **Chemosphere**, v. 32, p. 2177, 1996.

BURATINI, S.V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, p. 55-88, 2008.

BURKE, M. The start of something big. **Environmental Science & Technology**, 15 feb., p. 977, 2009.

BURRUETA, I. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. **Chromatographia**, v. 40, p. 474-481, 1995.

BUTTERY, R. G.; TERANISHI, R. Measurement of fat autoxidation and browning aldehydes by direct vapour injection gas liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** v. 11, p. 505-507, 1963.

CALABRESE, A.; DAVIS, H.C. Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgol. Wiss. Meeresunters*, v. 20 p. 553-564, 1970.

_____. et. al. The toxicity of heavy metals of embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. **Mar. Biol.**, v.18, p. 162-166, 1973.

CAPREZ, M.A.C. et. al. Acute and chronic impacts caused by aromatics hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco beaches, Guanabara Bay, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 291-295, 2000.

CARPENTER, E.J. ; SMITH, K. Plastics on the Sargasso Sea surface. **Science**, v. 175, p. 1240-1241, 1972.

CATHERINE, A.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo. p.1-1, 1990.

_____. PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_toxicologicos.asp>. Acesso em: 27 out 2005.

CHAPMAN, P. M.; ROMBERG, G. P. A. V. G. Design of monitoring studies for priority pollutants. **Journal of Water Pollution Control Federation.**, v. 54, p. 292-297, 1982.

CHARLIER, R.H.; BOLOGA, A.S. Costal zone under siege: is the realistic relief available? **Journal of Coastal Research**, v. 19, n. 4, p. 884-889, 2003.

CHEN, J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction coupled to high- performance liquid-chromatography. **Anal. Chem.** v. 67, p.2530-2533, 1995.

CHIOU, C.T. Partition coefficient and water solubility in environmental chemistry. In: Saxena, J., Fisher, F. (Eds.). **Hazardous Assessment of Chemicals-Current Developments**. New York: Academic Press, 1981. p. 117-253.

CHMIELOWIEC, J.; GEORGE, A. E. Polar bonded-phase sorbents for high performance liquid chromatographic separations of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Anal. Chem.** v .52, 1980, p.1154-1157.

CHOKSHI, H.P. et. al. Luminol and TCPO Chemiluminescence. **Biomed. Chrom.** ,v. 4, n. 3, p. 96-99, 1990.

CISCATO, L.F.M.L.; BARTOLONI, F.H.; BASTOS, E.L.; BAADER, W.J. Direct Kinetic Observation of the Chemiluminescence. **J. Org. Chem.** v. 74, p. 8974-8979.2009.

CLARK, B.R. **Marine Pollution**. Oxford: Clarendon Press, 1997. 161 p.

COE, J.M.; ROGERS, D.B. **Marine Debris: sources, impacts and solutions**. New York: Springer-Verlag, 1997. 432 p.

COLE, H.A. (Ed.). **The assessment of sublethal effects of pollutants in the sea**. The Royal Society, London., 1979.

COLEMAN, W.F. Molecular models of compounds in lightsticks. **Journal of Chemical Education.**, v. 86, n. 1, jan. 2009, p. 128.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 452 p.

CONNELL, D. W.; MILLER, G.J. **Chemistry and ecotoxicology of pollutio**. New York: John Wiley & Sons, 1984.

COSMOS Online. Disponível em:< [http:// www.cosmos.com.mx/b/fqcn.htm](http://www.cosmos.com.mx/b/fqcn.htm)> . Acesso em: 24 maio 2010.

COSTA, J. B. da; ESPÍNDOLA, E. L. G. Avaliação ecotoxicológica da água e sedimento em tributários do reservatório de Barra Bonita (Média Tietê Superior, SP) In: ESPÍNDOLA, E. L. G. et. al. (Eds.). **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. 2. ed. São Carlos: Rima, p.75-93. 2002.

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

COSTAN, G. et. al. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. **Environmental toxicology and water quality. An International Journal**, n. 8, p. 115-140. 1993.

CRANOR EARL (E.U.). Pat. n.. 2478069, v. 132, n. 48, 30 nov .2004. Disponível em: < <http://www.wikipatents.com/ca/2478069.html>>. Acesso em: 03 mar. 2010.

CRUZ, A.C.S. da. et. al. Estimation of the critical effect level for pollution prevention base don oyster embryonic development toxicity test: the search for reliability. **Environmental International**. v. 33, p. 589-595, 2007.

DALLAGNOLO, R.; ANDRADE, H.A. Comprimento do espadarte (*Xiphias gladius*) capturado pela frota de espinhel de superfície no sudeste do Atlântico Braz. **J. Aquat. Sci. Technol.**, v. 10, n.1, p. 51-55, 2006.

DAVIS, J.C.; HOOS, R.A.W. Use of sodium pentachlorophenate and dehydroabiatic acid as reference toxicants for salminal bioassays. **J. Fish Res. Board. Can.**, v. 32, p. 411-416, 1975.

DEWAR, M. J. S. J. A molecular orbital theory of organic chemistry: VI.¹ aromatic substitution and addition. **Am. Chem Soc.** v.74, p. 3357-3363, 1952.

DUTTA, T. K.; HARAYAMA, S. Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 34, n. 8, p. 1500-1505, 2000.

EJLERTSSON, J.; ALNERVIK, M. Jonsson, S.; SVESSON, B. H. Influence of water solubility, side-chain degradability, and side-chain structure on the degradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions. **Environmental Science & Technology** , v. 31, n. 10, p. 2761-2764, 1997.

ELSISI, A.E.; CARTER, D.E.; SPIES, I.G. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v.12, n. 1, p. 70-77, 1989.

ENVIRONMENT CANADA. Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. **Report** EPS 1/RM12, august. 1990.

ERMOSHKIN, A.A.; NECKERS, D.C.; FEDOROV, A.V. Photopolymerization without Light. Polymerization of Acrylates Using Oxalate Esters and Hydrogen Peroxide. **Macromolecules**, v. 39, p. 5669-5674, 2006.

EUROPEAN UNION COUNCIL. Decision n. 2455/2001/EC. Establishing the list of priority substances in the field of water policy amending Directive 2000/60/EC. **Off. J. Eur. Commun.** L 331 1, 2001.

FARDY, M.; YANG, P. Lilliputian light sticks. **Nature.**, v. 451, p.408-409, 24 jan. 2008.

FERNÍCOLA N. de; OLIVEIRA S. de S. (Coord.). Poluentes Orgânicos Persistentes POPs. **Caderno de Referências Ambiental - CRA**, v.13, 2002.

FERNANDES, R.M. **Modelação de derrames de hidrocarbonetos**. 2001. Dissertação (Graduação em Engenharia do Ambiente). 2001.

FERNÁNDEZ, M.R. et. al. **Desarrollo de la metodología para la determinación de ftalatos em objectos de puricultura y juguetes plásticos**. Disponível em: <<http://www.inti.gov.ar/citip/citip-057.htm>>. Acesso em: 18 set. 2005.

FINLAYSON-PITTS, B. J.; PITTS Jr., J.N.; **Atmospheric chemistry: fundamentals and experimental techniques**. New York: Wiley:, 1986.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. London: Cambridge University Press, 1971.

FONTENELE, E.G.P. et. al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 54, n.1, p. 6-16, 2010.

FOX, M. A.; OLIVE, S. Photooxidation of anthracene on atmospheric particulate matter. **Science**, v. 205, 4406, p. 582-583, 1979.

FREITAS, M.A.P. de. **Zona costeira e meio ambiente: aspectos jurídicos**. 2004. 194 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Jurídicas e Sociais, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2004.

FROMME, H. et. al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Res.**, v. 36, n.6, p. 1429-1438, 2002.

GARCÍA-CAMPAÑA, A.M. et. al. Detection in the liquid phase applying chemiluminescence. **Biomed. Chromatogr.** v.14, p.166-172, 2000.

GENTHNER, B. R.S. et. al. Arch. **Environ. Contam. Toxicol.**, v.32, p. 99-105, 1997.

GESAMP- Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. **Reports and Studies GESAMP, 50**, London, 1993. 180 p.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990.

GRAMENTZ, D. Involvement of Loggerhead Turtle with the plastic, metal and Hydrocarbon Pollution in the Central Mediterran. **Marine Pollution Bulletin**, v. 19, n.1, p. 11-13, 1988.

CALIFÓRNIA. **Graphpad Software**: instant guide to choosing and interpreting statistical tests. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 2010.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HANHELA, P.J.; PAUL, D.B. Synthesis and evaluation of fluorescent materials for colour control of peroxyoxalate chemiluminescence.: I. the phenylethynylation of anthraquinone. **Aust. J. Chem.**, v. 34, p.1669-1685. 1981a.

_____. Synthesis and evaluation of fluorescent materials for colour control of peroxyoxalate chemiluminescence.: II. violet and blue emitters. **Aust. J. Chem.**, v. 34, p.1687-1700. 1981b.

_____. Synthesis and evaluation of fluorescent materials for colour control of peroxyoxalate chemiluminescence: III. yellow and red fluorescent emitters. **Aust. J. Chem.**, v. 34, p. 1701-1717, 1981c.

HARDING, L. E. Measures of marine environmental quality. **Marine Pollution Bulletin**, v. 25 n. 1-4, p. 23-27, 1992.

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de biotoxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais.** 2004. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, 2004.

HARRIS, J.C. Rate of Aqueous Photolysis, In: LYMAN, W.J., REEHL, W. F., ROSENBLATT, D.H. (Eds.). **Handbook of Chemical Property Estimation Methods.**, New York: McGraw-Hill, 1982. chapt. 8.

HARRIS, C.A.; SUMPTER, J.P. The Endocrine Disrupting Potential of Phthalates. In: METZLER, M.; HEIDELBERG, Springer-Verlag Berlin. (Ed.). **The handbook of environmental chemistry: endocrine disruptors**, 2001. v.3, par.t 1 chapt. 9, p. 169-201.

HAZIN, H.G. et. al. Effect of light-sticks and electrolume attractors on surface-longline catches of swordfish (*Xiphias gladius*, Linnaeus, 1959) in the southwest equatorial Atlantic. **Fish. Res.** v.72, p. 271-277, 2005.

HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology.** 3. ed., New Jersey: John Wiley & Sons, chapt. 1, 2004.

HOFMANN, O. et al.. Thin-film organic photodiodes as integrated detectors for microscale chemiluminescence assays. **Sensor Actuator B- Chem.** v. 106, p. 878-884, 2005.

HUTCHINS, S.R.; WARD, C. H. J. A predictive laboratory study of trace organic contamination of groundwater: preliminary results. **Hydrology.** v. 67, n. 1-4, p.223-233, 1984.

IBANEZ, J.G. Redox chemistry and the aquatic environment examples and microscale experiments. **Chemical Education International**, v. 6, n. 1, 2005.

IVAR DO SUL, J.A. **Lixo marinho na área de desova de tartarugas marinhas do litoral norte da Bahia: conseqüências para o meio ambiente e moradores locais.** 2005. 53 f. Monografia (Graduação em Oceanologia), - Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática, Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade do Rio Grande (FURG), 2005.

_____. et. al. **Skin irritation and histopathologic alterations in rats exposed to *lightstick* contents, UV radiation and seawater.** **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2020-2024, 2009.

JOHNSON, B. T. et. al. Dynamics of phthalic acid esters in aquatic organisms, **Adv. Environ. Sci. Technol.** v.8, p. 283-300, 1977.

JUNIOR, O.P.de A.; BRITO, N. M. Introdução. In: JUNIOR, O.P.de A. ; VIEIRA, E. M.; COELHO, R. dos S. (Orgs.). **Poluentes orgânicos.** São Carlos, SP: Editora. RiMa, 2006. 160 p. v. 1

KARUKSTIS, K.K.; HECKE, G.A.V. **Chemistry connections: the chemical basis of everyday phenomena**. 2. ed. Elsevier Science (USA), p. 140, 2003.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **J. Chromat. A**. v. 880, p. 35-62, 2000.

KAWANO, M. Toxicological studies on phthalate esters: 1. inhalation effects of dibutyl phthalate (DBP) on rats. **Jpn J Hyg**, v.35, p. 684-692, 1980.

KELLY, T. J.et. al. Concentrations and transformations of hazardous air pollutants. **Environ. Sci. Technol.**, v.28, n. 8, p. 379-387, 1994.

KENNISH, J. M. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. Florida: Ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. 524 p.

KIM, S.B.; HONG, S.C. **Appl. Catal., B** , v. 35, p. 305, 2002.

KIM, H.S. et. al. Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. **J. Toxicol Environ Health A**. v. 67 n. 23-24, p. 2045-2060, 2004.

KIRA, S.; KATSUSE, T.; NOGAMI, Y.; ITO, T. Measurement of benzo(a)pyrene in sea water and in mussels in the Seto Inland Sea, Japan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 65, p. 631-637, 2000.

KLEINSASSER, N. H. et. al . Mutagensensitivitat von Patienten mit Larynx-bzw. Oropharynxkarzinomen. **Laryngol-Rhinol-Otol.**, v.78, p. 379-384, 1999.

_____. Phthalates demonstrate genotoxicity on human mucosa of the upper aerodigestive tract. **Environ. Mol. Mutagen**. v. 35, p. 9-12, 2000.

_____. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. **Mutat Res**. v. 467, n. 1, p. 21-30, 2000.

_____. Genotoxicity of di-butyl-phthalate and di-iso-butyl-phthalate in human lymphocytes and mucosal cells. **Teratogenesis Carcinog. Mutagen**. v. 21, p. 189-196., 2001.

_____. Mono (2-ethylhexyl) phthalate exhibits genotoxic effects in human lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract in the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 148, p. 83-90. 2004.

KLUWE , W.M. Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. **Environmental Health Perspectives**, v.45, p. 3-9. 1982.

KOCH, H.M.et. al. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates – determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. **Environmental Research.**, v.93, p. 177-185, 2003.

KOZIEL, J.; NOAH, J.; PAWLISZYN, J. Field sampling and determination of formaldehyde in indoor air with solid-phase microextraction and on-fiber derivatization. **Environ. Sci. Technol.** v. 35, p. 1481-1486, 2001.

KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 2290-2292, 1991.

KÜHN, R.; PATTARD, M. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. **Water. Res.**, v.24, n.1, p. 31-38, 1990.

KRUIJF, H. A. M. de (Eds.). **Manual on aquatic ecotoxicology**. Dordrecht: Publishers, 1988. cap. 4.

LAHTI, P.M. ; MODARELLI, D.A. ; ROSSITTO, F.C. ; INCELI, A.L. ; ICHIMURA, A.S. ; IVATURY, S. Aryl Oxalate derivatives as convenient precursors for generation of aryloxy radicals. **J. Org. Chem.** v. 61, p. 1730-1738, 1996.

LAMPARELLI, M.L. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. **Relatório Técnico CETESB**, São Paulo, 2001. 178 p.

LATINI, G.; VERROTTI, A.; DE FELICE, C. DI-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: a review. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.** v. 4, n.1, mar., p. 37-40. 2004.

LIAO, W.; WANG, P. Microwave-assisted photocatalytic degradation of dimethyl phthalate using a microwave discharged electrodeless lamp. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 5, p. 866-872, 2009.

LIDE, D.R., **Handbook of chemistry and physics**. 79. ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 1999. 1 CD-ROM.

LINDÉN, E. et. al. The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid (*Nitocra spinipes*). **Chemosphere**, v.8, n.11/12, p. 843-851, 1979.

LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. **J. Chromatogr. B**, v. 689, p. 221-237, 1997.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water. **J. Chromatogr. A**, v. 885, p. 3-16, 2000.

LIU, Y. et. al. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *haliotis diversicolor supertexta*. **Ecotoxicology.**, v.18, p. 293-303, 2009.

LOMBARDI, A. T.; FERNANDEZ, M. Ecotoxicologia. In: BAPTISTA NETO, José Antônio, WALLNER-KERSANACH, Mônica, PATCHINEELAM, Soraya Maia (Orgs.). **Poluição marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2008. cap. 14, p. 369-394.

LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v.19, n. 5, p. 497-506, 1996.

LOPES, C.F.; MILANELLI, J.C.C.; JOHNSCHER-FORNASARO, G. Biomonitoramento de costões rochosos sujeitos a impacto por óleo. In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3, 1994, Serra Negra, São Paulo. **Anais do III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira**. Serra Negra, São Paulo: ACIESP, 1994. p. 293-300.

LOUIE, P.K.K.; SIN, D. W.M. A preliminary investigation of persistent organic pollutants in ambient air in Hong Kong. **Chemosphere**, v. 52, p. 1397-1403, 2003.

LOUREIRO, I.R. **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**. 2002. Tese (Doutorado) - Centro Técnico e Científico da PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2002.

LYMAN, W.J. Transport and transformation processes. In: RAND, Gary M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. 2. ed. Washington, DC: Taylor & Francis,. 1995. p. 449-492.

MABEY, W.R. et. al. Aquatic fate process data for organic priority pollutants, U.S. **Environmental Protection Agency Report**, EPA 440/4-81-014, 1982.

MACKAY, D.; SHIU, W.Y.; J. Aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons **Chem. Eng.**, v. 22, p.399-402, 1977.

MACINNES, J.R.; CALABRESE, A. Response of embryos of the american oyster, *Crassostrea virginica*, to heavy metals at different temperatures. In: EUROPEAN MARINE BIOLOGY SYMPOSIUM, 12. 1977, Oxford, **Anais do 12º Simpósio Europeu de Biologia Marinha**. Oxford: Pergamon Press, 1978. p. 195-202.

_____. Combined effects of salinity, temperature and copper on embryos and early larvae of the American oyster *C. virginica*. **Archs Environ. Contamin. Toxicol.**, v.8, p.553-562, 1979.

MAIN, K.M. et. al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. **Environ Health Perspect.** v.114, n. 2, p. 270-276, 2006.

MARIN, M.L. et. al. Analysis of potentially toxic phthalate plasticizers used in toy manufacturing. **Bull. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 60, n.1, p. 68-73, 1998.

MARCOVALDI, M. A.; MARCOVALDI, G. G. Marine turtle of Brazil: the history and structure of Projeto Tamar-Ibama. **Biological Conservation**, v. 91, p. 35-41, 1999.

MARQUES JÚNIOR, A. N.; MORAES, R. B. C de; MAURAT M. C. Poluição Marinha. In: PEREIRA, Renato Crespo; GOMES, Abílio Soares (Ogs). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p.311-334, .2002. cap. 14.

MARTIN, M. et al. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytillus edulis* embryos and cancer magister larvae. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 12, p. 305-308, 1981.

MARTINS, L. K. P. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. **Environmental Research**, v. 99, p. 387-396, 2005.

MAYBODI, A. S.; AKHOONDI, R.; CHAICHI, M. J. Studies of new peroxyoxalate-H₂O₂ chemiluminescence system using quinoxaline derivatives as green fluorophores. **J. Fluoresc.**, v. 20, p. 671-679, 2010.

MAYER, F. L. Jr.; SANDERS, H.O. Toxicology of phthalic acid esters in aquatic organisms. **Environ. Health. Perspect.**, v.3, p. 153-157, 1973.

MCELROY, A. E.; FARRINGTON, J. W.; TEAL, J. M. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: VARANASI, U. (Ed.). **Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment.**, Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 1-39.

McKIM, J. M. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity. **J. Fish Res Board Can**, v. 34, p. 1148-1154, 1977.

_____. Early life stage toxicity tests. In: RAND, G. M., PETROCELLI, S.R. (Eds.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: Hemis phere Publ. p. 58-95, 1985.

MELO, S.L.R. **Testes de toxicidade in situ**: adequação e aplicação de metodologia em estuários. 1999. 277 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1999.

MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P.A.P. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 139-145, 2010a.

_____. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, 2010 b.

MEINERTZ, J.R.; GRESETH, S.L.; GAIKOWSKI, M. P.; SCHMIDT, L.J. Chronic toxicity of hydrogen peroxide to daphnia magna in a continuous exposure, flow-through test system. **Science of the total environment.**, v. 392, p. 225-232, 2008.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, v. 60, p. 101-139, 1989.

MICHEL, X.; et. al. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. **Marine Environmental Research**, v. 38, n. 257 -273, 1994.

MILANELLI, J. C.C. **Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento em um costão rochoso da Praia de Barequeçaba, São Sebastião, SP**: volume 1. 1994. 103 f. Dissertação. (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 1994.

MILARÉ, E.; MAGRI, R.V.R. Cubatão: um modelo de desenvolvimento não sustentável. **São Paulo em Perspectiva**, v. 6, n.1-2, p. 99-105, 1992.

MILOFSKY, R.E.; BIRKS, J.W. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 113, n. 26, p. 9715-9723, 1991.

MIRANDA FILHO, K. C.; MONTONE, R. C.; FILLMANN, G. Compostos organoclorados. In: BAPTISTA NETO, José Antônio, WALLNER-KERSANACH, Mônica; PATCHINEELAM, Soraya Maia (Orgs.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2008. cap. 5, p. 97-160.

MOHAN, A.G.; TURRO, N. J. A Facile and effective chemiluminescence demonstration experiment. **J. of Chem. Educ.** v. 51, p. 528-528, 1974.

MOREIRA, J. C.; BAREK, J.; Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. **Química Nova**, v. 18, p. 362, 1995.

MORITA, M.; NAKAMURA, H.; MIMURA, S. Phthalic Acid Esters in Water. **Water Res.**, v. 8, p. 781, 1974.

MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. Ed. RiMa, 2008. cap. 2, p. 15-38.

MURUGANANDHAM, M.; SWAMINATHAN, M. Photochemical oxidation of reactive azo dye with UV-H₂O₂ process. **Dyes and Pigments**, v. 62, p. 269-275, 2004.

NANJING SINOGLow INDUSTRIAL CO., LTDA. **Test report number: CA-08-00497**. Modern Testing Services Co., Ltda. China. 4 p. 2008.

NASCIMENTO, I. A. Testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E.C.P.M.; NIPPER, M. (Eds.). **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, 2002. p. 73-81.

NASCIMENTO, I. A. et. al. Standardization, application and validation bioassay methods with embryos of *Crassostrea rhizophorae*, the mangrove oyster for evaluation of tropical estuarine and marine waters. In: INTERNATIONAL WORKSHOP, dez, 1989, Salvador. **Anais do Workshop Internacional sobre Biomonitoramento**. Salvador : Mark (U.K.) : UFBA, 1989. p.15.

_____. Integration varying response of diferente organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. State of Brazilian aquatic ecosystem. **Aquat Ecosyst Health Manag**. Ontario, Canada, v. 3, n. 4, p. 485-497, 2000.

NASCIMENTO, I.A.; LUNETTA, J. E. Ciclo sexual da ostra de mangue e sua importância para o cultivo. **Bol. Fisiol. Animal.**, v.2, p. 63-98, 1978.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. Ed. RiMa, 2008. cap. 17, p. 413-432.

NATUSCH, D. F.S.; WALLACE, J.R.; Urban aerosol toxicity: the influence of particle size. **Science**, v. 186, n. 4165, p. 695-699, 1974.

NEFF, J. M. Use of biochemical measurements to detect pollutant mediated damage to fish. In: CORDELL, R. D.; PURDY, R.; BAHNER, R. C. (Eds.). **Aquatic toxicology and hazard assessment**: ASTM STP 854, 1984, p. 155-183.

NEILSON, A.H. PAHs and related compounds: biology. In: The handbook of environmental chemistry: volume 3: anthropogenic compounds. J.Springer, 1998. 386 p.

NERY, A.L.P.; BAADER, W.J. Quimiluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na decomposição de 1,2-dioxetanos. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, 2001. p. 626-636.

NETZEVA, T.; WORTH, A. Classification of phthalates According to their (Q)SAR Predicted acute toxicity to fish: a case study. **European Commission**, Italy, p. 1-43. 2007.

NORBERG-KING, T. J. An evaluation of the fathead minnow seven-day sub-chronic test for estimating chronic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8(11) p. 1075-1089. 1989.

NRC - National Research Council. Oil in the sea: inputs, fates and effects. **National Academy Press**, Washington, 1985. 601 p.

_____. Oil in the Sea III: inputs, fates and effects. **National Academy of Sciences**, Washington, 2003. 265 p.

O'CONNOR, O.A.; RIVERA, M.D.; YOUNG, L.Y. Toxicity and biodegradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.8, p.569-574, 1989.

OMNIGLOW CORPORATION. **Dados de segurança dos bastões de luz química**. MSDS N° 5797-02. 2003. p. 1-3.

PAIXÃO, J.F. Estimating the gasoline components and oyster (*Crassostrea rhizophorae*): an approach to minimize environmental pollution risk. **Environmental Research**, v. 103. p.365-374, 2007.

PEDERSEN, A.D. et al. Survey of fluorescent substances in consumer products. **Danish Technological Institute**. n. 40, 2003. 41 p.

PEREIRA, S. A. et. al. Sensibilidade de quatro organismos-teste (*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis chuii*, *Crassostrea rhizophorae* e *Echinometra lucunter*) ao dodecil sulfato de sódio: elaboração das cartas-controle. **Diálogos e Ciência**. Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências, Ano 8, n. 24, 2010.

PINHO, G.L.L.; IHARA, P.M.; FILLMANN, G. Does light-stick content pose any threat to marine organisms? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p.155–157, 2009.

PITTS, Jr., J. N. et. al. Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: Facile formation of mutagenic nitro derivatives. **Science**, 202, p. 515-519. 1978.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS: evaluation of sources and effects. **National Academy of Science**, Washington, 1983.

POZO, K. et. al. Concentración de compuestos organoclorados em organismos de la cuenca Del rio Laja, Chile central. In: **Toxicología y química ambiental: contribuciones para um desarrollo sustentable** Argentina: Jorge Herkovits: SETAC LA, 2003. p. 51-53.

PRATT, J. M.; COLER, R. A. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. **Water Research**, v.10, p. 1019-1025, 1976.

PRÓSPERI, V.A.; ARAÚJO, M.M.S. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Litthechinus variegatus* Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E.C.P.M.; NIPPER, M. (Eds.). **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda., p. 99-110, 2002.

PRÓSPERI, V.A.; NASCIMENTO, I.A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. Ed. RiMa, 2008. cap. 12, p. 269-292.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAND, G.M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L.S. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2. ed., Washington: Taylor & Francis, 1995. cap. 1.

RAUHUT, M. M. Chemiluminescence from concerted peroxide decomposition reactions. **Acc. Chem. Res.** v. 2, p. 80-87. 1969.

RIBEIRO, R. Conservação: como impedir os navios de lançarem dejetos no mar? **National Geographic Brasil**. Disponível em: <http://nationalgeografic.abril.uol.br/edicoes/0503/diario_da_terra/0503_01.html>. Acesso em: 20 out. 2005.

RIBEIRO, C.C. **Avaliação e identificação da toxicidade aguda e crônica do light-stick, sinalizador utilizado em pesca de espinhel, através de ensaios com diferentes organismos marinhos**. 2010. Monografia - Centro Universitário Monte Serrat, Santos, 2010.

RIBEIRO, C.C.; HANS, M.F.P. Chronic toxicity test with sea urchin *Echinometra lucunter* and *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea), exposed to light-stick-flag paternoster used for longline surface fishing. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, p. 71-75, 2010. (special issue IVSBO).

RIBO, J.M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria. **Environ. Toxicol. Water Qual.** cap. 12, p. 283-294, 1997.

RIOS, E.C. **Coastal Brazilian Seashells**. Rio Grande: Furg Museu Oceanográfico do Rio Grande, 1970, 255 p.

ROCHA FILHO, R.C.; GONZALES, E.R.; AVACA, I. A. Isotermas de adsorção: aplicação a interfaces eletrodo-solução. **Quím. Nova**, v. 3, p. 29-34, 1980.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

RODRIGUES, A. Parâmetros de qualidade da água: os compostos fenólicos: impacto ambiental, efeitos no homem e teores permitidos. **Jornal águas Livres**. Tecnologia H₂O, abr. 04, p. 4, 2004.

ROEX, E.W.M. et. al. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. **Env. Tox. Chem.**, n.19, v.3, p. 685-693, 2000.

RONCO, A.; BAÉZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Elementos básicos requeridos para la implementación de pruebas en análisis rutinarios. In: MORALES, G. C., (Ed.). **Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004. cap. 3, p. 31-46.

SALAZAR, V. et. al. effect of oral dibutyl phthalate on reproductive parameters of long evans rats and pré-pubertal development of their offspring. **Toxicology**, v. 205, p. 131-137. 2004.

SANTOS, A. N. et. al. A ocupação urbana na orla da costa das baleias, estado da Bahia: suscetibilidade a danos econômicos em função da dinâmica costeira. **Geociências**, São Paulo, v.26, n.2, p.173-180, 2007.

SANTOS, I.R.; FRIEDRICH, A.C.; BARRETO, E.P. Overseas garbage pollution on beaches of northeast Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 50, p.782-786, 2005.

SANTOS, I.R., BAPTISTA NETO, J.A., WALLNER-KERSANACH, M. Resíduos Sólidos. In: BAPTISTA NETO, J.A.; WALLNER-KERSANACH, M. PATCHNEELAM, S.M. (Orgs.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 309-334.

SCHMID, P. ; SCHLATTER, C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. **Xenobiotica**, v. 15, n. 3, p. 251-256, 1985.

SCHOUTEN, M.J., PEEREBOOM, C.J.W.; BRINKMAN, U. A. Th., "Liquid Chromatographic Analysis of Phthalate Esters in Dutch River Water". **Int. J. Environ. Anal Chem.**, v.7, p.13-23, 1979.

SCOTT, R.C. et. al. In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. **Environ Health Perspect**, v. 74, p. 223-227, 1987.

SELKIRK, J. K. Modifiers of chemical carcinogenesis. In: Slaga, T. J., (Ed.) **Carcinogenesis: a comprehensive survey**. Raven Press: New York, 1980. v.5.

SHAW, I. C.; CHADWICK, J. **Principles of environmental toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis: 1998.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de dados de segurança**: de acordo com regulamento (CE): n. 1967/2006. Versão 4.0. Data de revisão: 2010.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de dados de segurança**: de acordo com regulamento (CE): n. 1967/2006. Versão 4.0. Data de revisão: 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T., C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 299 p.

SINGER, M. M. et. al. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 1007-1016, 2000.

SMITH, A. **Echinoid palaeobiology**. London: George Allen & Unwin, 1984.199p.

SOLBERG, T.S. et. al. Flothrough biotest system for continuous exposure of aquatic organism to oil hydrocarbons. **Sarsia**, v.72, p. 387-390, 1987.

SONNENFELD W.J; ZOLLER W.H; MAY W.E. Dynamic coupled-column liquid chromatographic determination of ambient temperature vapor pressures of polynuclear aromatic hydrocarbons. **Anal. Chem.**, v. 55, n.2, p. 275-280, 1983.

SOUTHERN, P.F.; WATERS, W.A.; The Thermal decomposition of some meso-substituted anthracene photo-oxides. **J. Chem. Soc.**, p 4340-4346, 1960.

SOUZA, M.L.de et. al. Aplicação de espectroscopias raman e infravermelho na identificação e quantificação de plastificantes em filmes comerciais de PVC esticável. **Quím. Nova**, v. 32, n. 6, São Paulo, 2009.

SPACIE, A.; McCARTY, L. S.; RAND, G. M. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. **In: Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.** 2. ed. G. M.Rand (Ed.) Washington: Taylor & Francis:, 1995. cap. 16. p. 493-521.

SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish: II utilizing and applying bioassays results. **Water Research**, v.4, p. 3-32. 1970.

STAPLES, C.A. et. al. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*, **Elsevier Science Ltd.**, v. 35, n. 4, p. 667-749, 1997.

STEVANI C. V.; BAADER W. J. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. **Quím. Nova**, São Paulo, v.22, n.5, 1999.

STEVANI C. V.; SILVA,S.M.; BAADER W. J. Studies on the excitation step in peroxyoxalate chemiluminescence. **Eur. J.Org. Chem.**, 2000, p. 4037-4046.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*,v. 29, p. 1715, 1996.

STUART, A.E.; BROOKS, C.J.W.; PRESCOTT, R.J. Repellent and antifeedant activity of salicylic acid and related compounds against the biting midge, *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). **Entomol. Soc. Am.**, v.37. p. 222-227, 2000.

SULLIVAN, K. F.; ATLAS, E. L.; GIAM, C. S. Adsorption of phthalic acid ester from seawater. **Environ. Sci. Technol.**, v. 16, p. 428-432, 1982.

TALENTO, B. Lixo estrangeiro polui o litoral. **O Estado de S. Paulo**, São Paulo, 24 jul. 2005. Disponível em: <http://txt.estado.com.br/editorias/2005/07/24/ger_001.html>. Acesso em: 20 out. 2005.

TANNER, R.; FAJER, R. Determination of nitro-polynuclear aromatics in ambient aerosol samples.**Intern. J. Environ. Anal. Chem.** v. 14, 231 p. 1983.

TARKPEA, M.; HANSSON, M.; SAMUELSSON, B. Comparison of the microtox test with the 96-hr LC50 test for the harpacticoid nitocra spinipes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 11, p. 127-143, 1986.

TEVINI, M. **UV-B radiation and ozone depletion: affects on humans, plants, microorganisms, and materials.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 348 p.

THOMPSON, R. B.; McBEE, S. E. S. Peroxyoxalate chemiluminescence in microemulsions. **Langmuir.**, v. 4, n. 1, p. 106-110, 1988.

THURÈN, A. Determination of phthalates in aquatic environments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 36, p. 33-40, 1986.

TOMITA, I.; NAKAMURA, Y.; YAGI, Y. Phthalic acid ester in various foodstuffs and biological materials. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.1, p. 275-287, 1977.

TURISMO PEDAGÓGICO. **Diário Turismo**, 2009. Disponível em: <<http://www.diarioturismo.com.br/costa-dos-coqueiros.php>>. Acesso em: 03 mar. 2010.

ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Investigation on electrochemical behavior of peroxidase enzyme in the presence of hydrogen peroxide and 5-aminosalicylic acid. **Eclética Química.** v. 33, n.1, p. 57-62, 2008.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, Division of water Quality Monitoring and Assessment Surface Water Section, Ohio Environmental Protection Agency. **Biological criteria for the protection of aquatic life.** Ohio, USA: Columbus, 1988.

_____. **National primary drinking water regulations federal register**, part 12, 40 CFR, part 141, 1991. 395 p.

_____. **Sediment classification methods compendium.** Washington, D.C.: Environmental Protection Agency / Sediment Oversight Technical Committee. 1992.

_____. **Bioremediation, innovative pollution treatment technology.** Washington, DC. EPA/640/K-93/002, 1993. 20 p.

_____. Priority Pollutants. Disponível em: < <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/methods/pollutants.cfm> Last updated on Friday October 01, 2010. Acesso em: 24/02/2011.

VALERIO, F.; LAZZAROTTO, A. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 23, 135 p., 1985.

VAN WEZEL, A. P., VAN VLAARDINGEN, P. POSTHUMUS, R.; CROMMENTUIJN, G.H.; SIJM, D.T.H. Environmental risk limits for two phthalates, with special emphasis on endocrine disruptive properties. **Environmental Research**, v. 46, p. 305-321, 2000.

VELOSO, M.C.C. **Compostos orgânicos voláteis e ácidos graxos em peixes marinhos.** 2005. 181 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

VIEIRA H. P.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

- WANG, J.L.; ZHAO, X.; WU, W.Z. Biodegradation of phthalic acid ester (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge. **Process Biochem.** 39, p. 1837-1841, 2004.
- WEINBERG, N.L.; WEINBERG, H.R. Electrochemical oxidation of organic compounds. **Chem. Rev.** v. 68, 1968, p. 449-523.
- WESTMAN, E. W. Ecology, impact assessment, and environmental planning. **A Wiley – Interscience Publication John Wiley e Sons**, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 1985. 532 p.
- WHO - World Health Organization), IPCS - International Programme on Chemical Safety. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Geneva: WHO, 1988.
- WILLIAMS, D.T.; BLANCHFIELD, B.J. The retention, distribution, excretion and metabolism of dibutyl phthalate-7-¹⁴C in the rat. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, n.5, p. 854-858, 1975.
- WILSON, W.B. et. al. The toxicity of phthalates to the marine dinoflagellate *Gymnodinium breve*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 20, n. 2, p. 149-154, 1978.
- WINDOM, M. L. Contamination of the marine environment from land-based sources. **Marine Pollution Bulletin**, v. 25, p. 32-36, 1992.
- WINTERS, K. et. al. Water-soluble components of four fuel oils: chemical characterization and effects on growth of microalgae. **Marine Biology**, v. 36. p. 269-276, 1976.
- WOFFORD, H.W.; WILSEY, C. D.; NEFF, G. S.; GIAM, C. S.; NEFF, J. M. Bioaccumulation and metabolism of phthalate esters by oysters, brown shrimp and sheepshead minnows. **Ecotoxicology and Environmental Safety**., v.5, p. 202-210. 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemical aspects, guidelines for drinking water quality**. 3. ed. Geneva, 2003. cap. 8,
- XU, X.R.; LI, X.Y. Adsorption behavior of dibutyl phthalate on marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**., v. 57, p. 403-408, 2008.
- YAN, H.; YE, C.; YIN, C. Kinetics of phthalate ester biodegradation by *Chlorella pyrenoidosa*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.14, n.6, p. 931-938, 1995.
- YANG, X.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1925-1930, 1994.
- YANG, Z.; ZHANG, X.; CAI, Z. Toxic effects of several phthalate esters on the embryos and larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. **Chinese Journal of Oceanology & Limnology**., v. 27, p. 395-399, 2009.

YOSHIOKA, Y.; OSE, Y.; SATO, T. Testing for the toxicity of chemical with *Tetrahymena pyriformis*. **Sci. Total Environ.**, v. 43, n. 1/2, p. 149-157, 1985.

ZAGATO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A ; BERTOLETTI, E.(Eds.) **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. Ed. RiMa, 2008. cap. 1, p. 1-13.

ZANN, L.P.; KAILOLA, P. **The State of the marine environment report for Australia**: technical annex. I. The Mar. Environ. Great Barrier Reef Marine Park Authority, Australia, 1995.

ZILA TECHNICAL, INC. **Material Safety data sheet (MSDS)**. 13 p. 2005.

ANEXOS

Anexo1 - Características da programação otimizada para o protocolo usando extração em fase sólida (SPE).

Cromatógrafo Varian GC / MS 3900

Detector: Saturno 2100T (Sistema hifenado)

Extração com cartucho C18 usando diclorometano como solvente

Coluna capilar VF-5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano): 30m x 0,25mm (ID) x 0,25 μ m

Filamento nº 1

Temperatura do injetor = 250°C

Temperatura do forno da coluna= 120°C

Modo de Injeção = Split

Fluxo total= 22,3mL/min

Fluxo constante da coluna = 1,2mL/min

Velocidade linear= 39,4cm/seg

Razão de Split = 10

Tempo inicial de aquisição= 3min

Tempo da corrida: 31,17

Programação da temperatura : 120°C (1min) – 25°C /min – 160°C (3min) – 1°C/min – 180°C (1min) – 20°C/min – 230°C (1min)

Axial modulation voltage= 4,0 volts

Temperatura “trap” = 190°C

Temperatura “transf Line” = 280°C

Anexo 2- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por *Headspace*.

Sistema GC / MS (Shimadzu GCMS –QP2010)

Detector: QP 2010

Extração por Headspace

Coluna Elite 5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano): 30m x 0,25mm (ID) x 0,25um (Perkin Elmer)

Filamento nº 1

Temperatura do forno da coluna= 45 °C

Temperatura do injetor = 250°C

Modo de Injeção = Split

Fluxo total= 14,0mL/min

Fluxo da coluna = 1,0mL/min

Velocidade linear= 36,2cm/seg

Razão de Split = 10

Tempo inicial de aquisição = 3min

Tempo da corrida: 39,00min

Fluxo de purga = 3,0mL/min

Programa da razão de split: 0min – 10 (razão de split)

Programação da temperatura : 45°C (4min) – 5°C /min – 100°C (0,5min) – 20°C/min – 200°C (2min) – 10°C/min – 270°C (10min)

Temperatura da fonte de ions: 200 °C

Temperatura da interface: 250 °C

Modo de aquisição: Scan (40,00 – 500,00 m/z)

Anexo 3A- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por LLE do conteúdo de bastões de luz química coletados.

Cromatógrafo Varian GC / MS 3900

Detector: Saturno 2100T (Sistema hifenado)

Extração com cartucho C18 usando diclorometano como solvente

Coluna capilar VF-5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano): 30m x 0,25mm (ID) x 0,25 μ m

Filamento nº 1

Temperatura do injetor = 250°C

Temperatura do forno da coluna= 120°C

Modo de Injeção = Split

Fluxo total= 22,3mL/min

Fluxo constante da coluna = 1,2mL/min

Velocidade linear= 39,4cm/seg

Razão de Split = 10

Tempo inicial de aquisição = 3min

Tempo da corrida: 31,17

Programação da temperatura 120°C(1min) – 15°C /min – 160°C (3min) – 1°C/min – 180°C (1min) – 20°C/min – 230°C (1min)

Axial modulation voltage= 4,0 volts

Temperatura “trap” = 190°C

Temperatura “transf Line” = 280°C

Anexo 3B- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por LLE do conteúdo dos bastões novos de luz química.

Sistema GC / MS (Shimadzu GCMS –QP2010)

Detector: QP 2010

Coluna Elite 5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano): 30m x 0,25mm (ID) x 0,25um (Perkin Elmer)

Filamento nº 1

Temperatura do injetor = 250°C

Temperatura do forno da coluna= 120 °C

Modo de injeção= Split

Fluxo total= 14,0 mL/min

Fluxo da coluna = 1,0 mL/min

Velocidade linear= 37,5cm/seg

Fluxo de purga = 3,0mL/min

Razão de Split = 10

Tempo de estabilização= 1min

Tempo inicial de aquisição = 3min

Tempo da corrida: 34,50min

Programação da temperatura 120°C(1min) – 15°C /min – 160°C (3min) – 3°C/min – 230°C – 10°C/min – 270°C (1min)

Temperatura da fonte de ions: 250 °C

Temperatura da interface: 260 °C

Modo de aquisição: Scan (40,00 – 450,00 m/z)

Anexo 4- Características da programação otimizada para o protocolo usando extração por SPME-ID.

Sistema GC / MS (Shimadzu GCMS –QP2010)

Detector: QP 2010 (Kyoto, Japão)

Extração por SPME-ID

Coluna RTX[®] JMS (Crosbond[®] 100% dimetil polisiloxano): 30m x 0,25mm (ID) x 0,25µm

Fibra: PDMS – 100µm (Polidimetil siloxano)

Temperatura do injetor = 260°C

Temperatura do forno da coluna= 100 °C

Modo de Injeção = Split

Fluxo total= 24,0mL/min

Fluxo da coluna = 1,0mL/min

Velocidade linear= 37,2cm/seg

Razão de Split = 20

Tempo inicial de aquisição = 4min

Tempo da corrida: 10min

Temperatura de extração: 50°C /Tempo de extração: 15 min./Agitação: 250 rpm

Tempo de dessorção: 5 min /Temperatura de dessorção: 260°C

Volume da amostra: 10mL

Modo de extração: Inserção direta

Programação da temperatura : 100°C (1min) – 25°C /min – 160°C (0min) – 10°C/min – 280°C (0min)

Fluxo de purga = 3,0mL/min

Temperatura da fonte de ions: 250 °C /Temperatura da interface: 260 °C/Corte do solvente: 4 min

Modo ACQ: Scan (50 a 400u.m.a.)

Início: 4min Término: 5min

Intervalo: 0,50sec / Scan Speed: 769

Modo ACQ: SIM(íons do DMP monitorados 163/77/194)

Início: 5,01min Término: 6,5min Intervalo: 0,20sec

Modo ACQ: Scan (50 a 400u.m.a.)

Início: 6,51min Término: 9,20min

Intervalo: 0,50sec / Scan Speed: 769

Modo ACQ: SIM (íons do DBP monitorados 149/41/76)

Início: 9,21min Término: 9,80min Intervalo: 0,20sec

Modo ACQ: Scan (50 a 400u.m.a.)

Início: 9,81min Término: 10,0min

Intervalo: 0,50sec / Scan Speed: 769

Anexo 5

Cromatograma e espectros de massa dos compostos encontrados nos sinalizadores (A) e os extraídos da biblioteca eletrônica NIST 147 (B), de acordo com a melhor nota de comparação de similaridades.

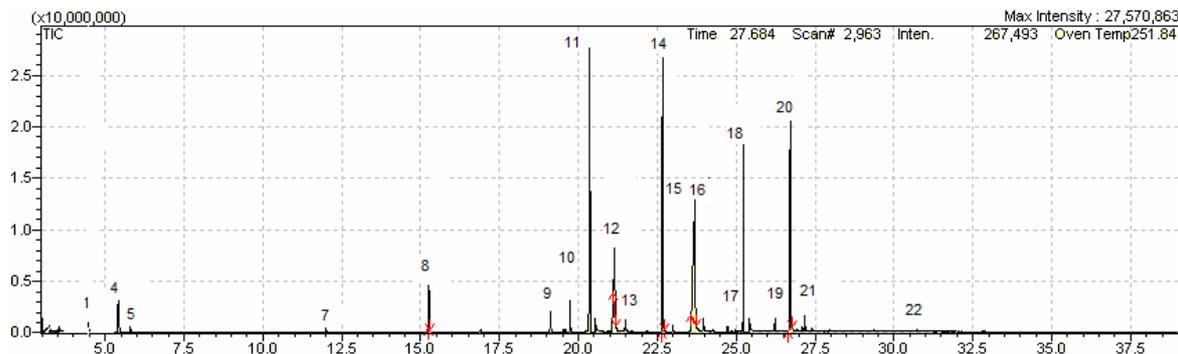


Figura 1- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por HS em sistema GC nas condições descritas no anexo 2 .

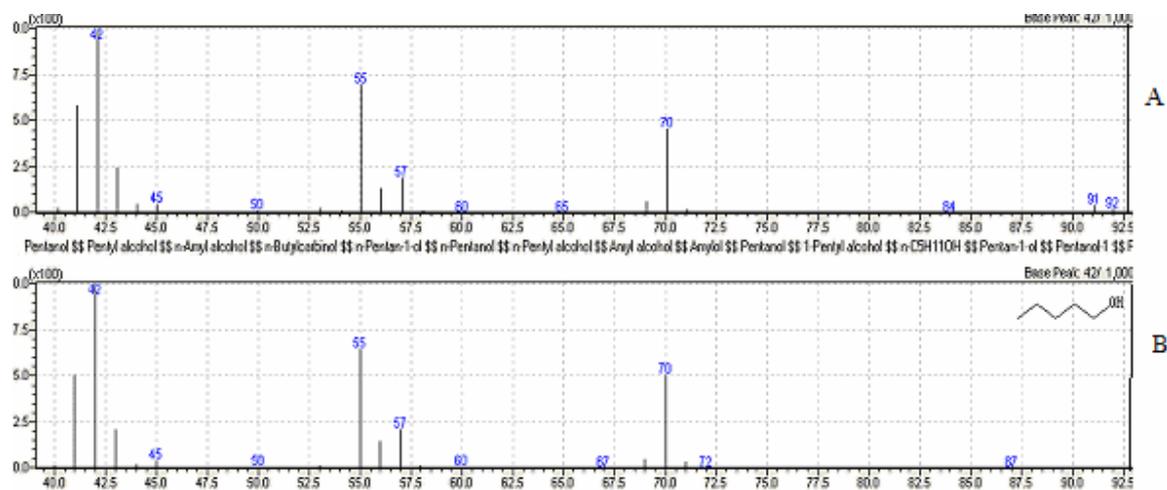


Figura 2- Espectro da substância (1) identificada: 1- Pentanol ($C_5H_{12}O$), CAS 71-41-0.

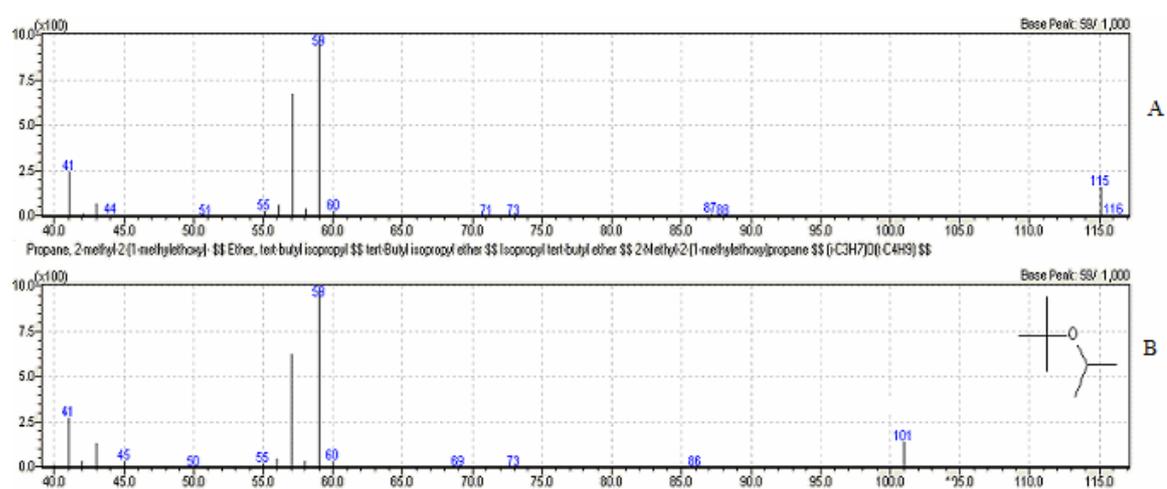


Figura 3 - Espectro da substância (4) identificada: tert-butil isopropil éter ($C_7H_{16}O$), CAS 17348-59-3.

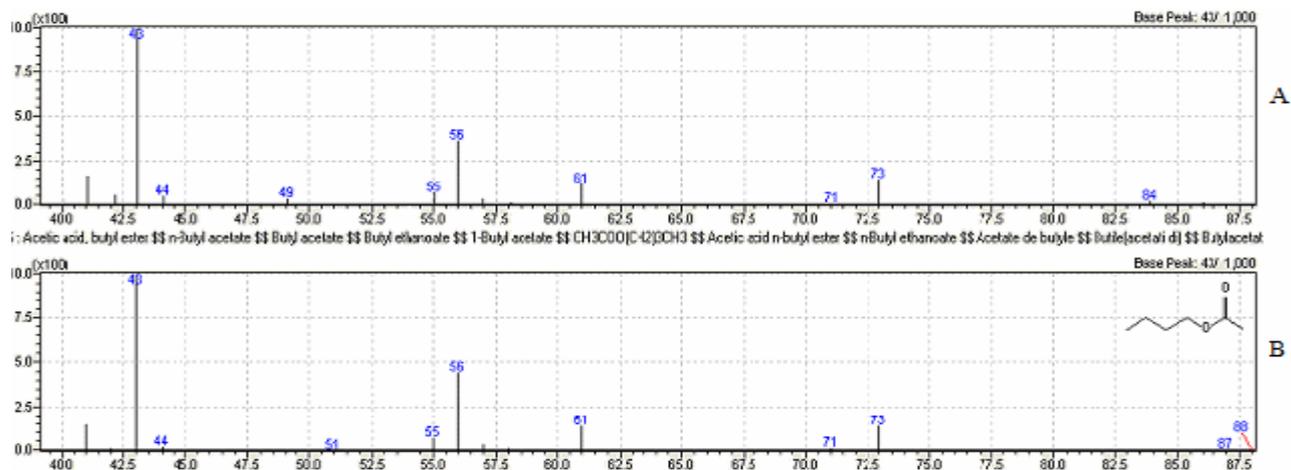


Figura 4 - Espectro da substância (5) identificada: Acetato de butila ($C_6H_{12}O_2$), CAS 123-86-4.

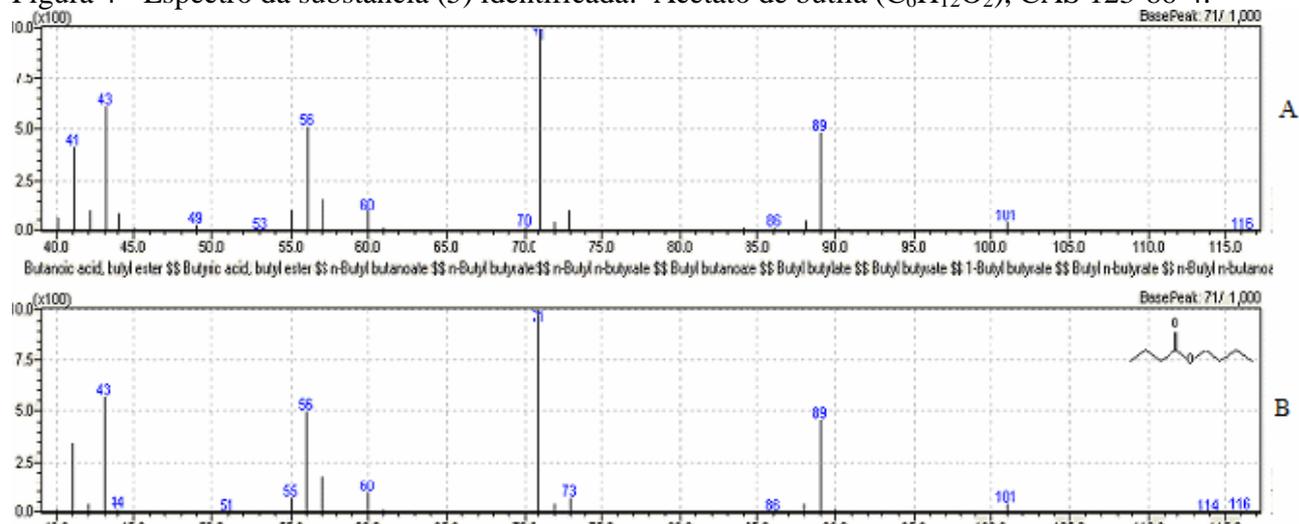


Figura 5- Espectro da substância (7) identificada: Butanoato de butila ($C_8H_{16}O_2$), CAS 109-21-7.

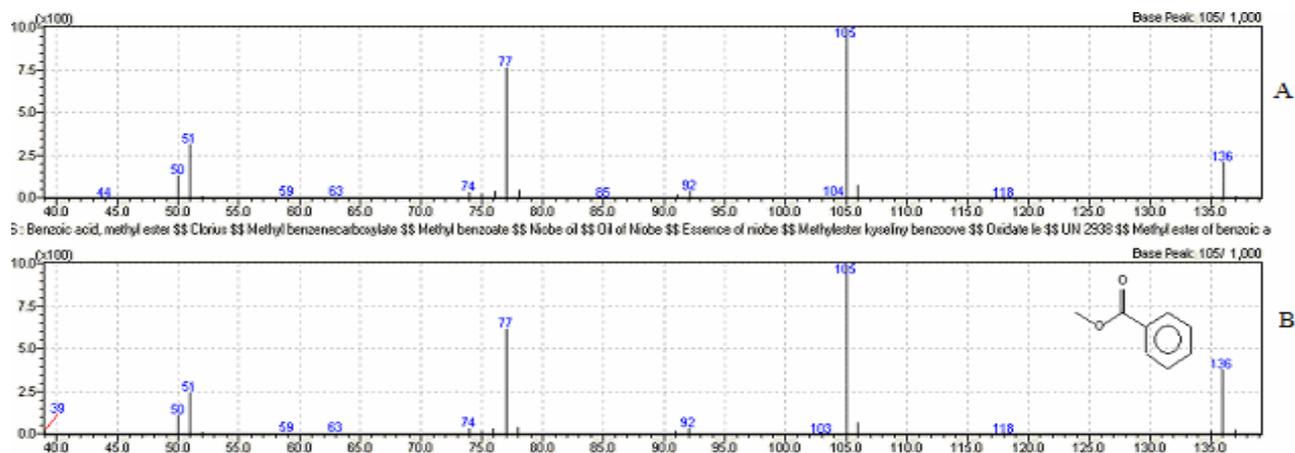


Figura 6 - Espectro da substância (8) identificada: Ácido benzóico, metil éster ($C_8H_8O_2$), CAS 202-259-7.

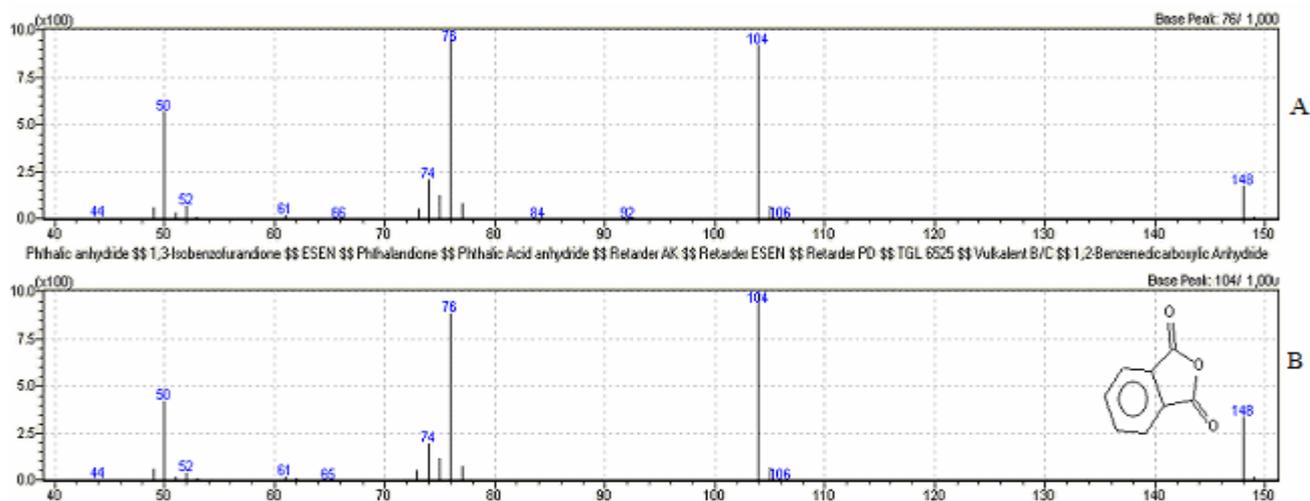


Figura 7 - Substância (9) identificada: Anidrido ftálico ($C_8H_4O_3$), CAS 85-44-9.

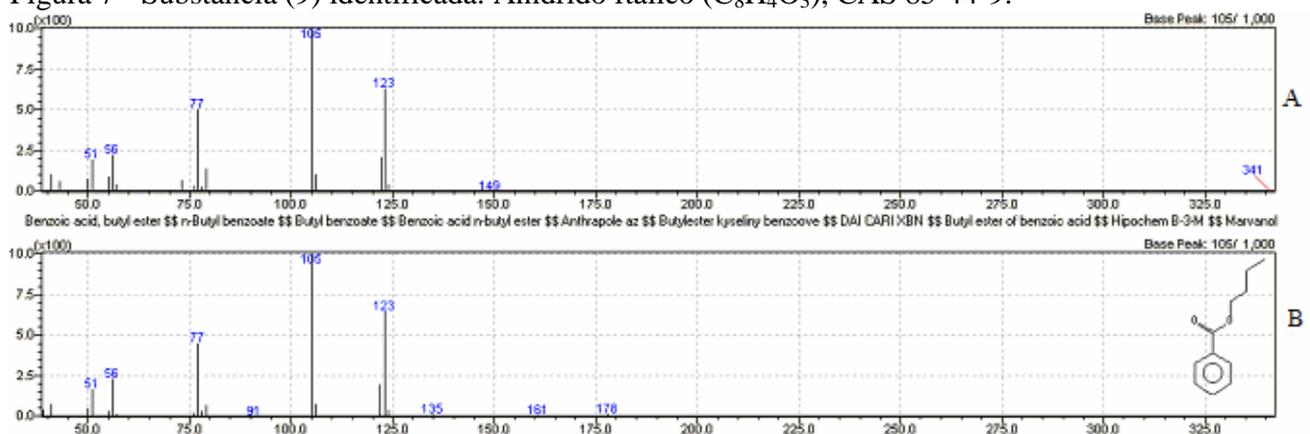


Figura 8 - Substância (10) identificada: Ácido benzóico, butil éster ($C_{11}H_{14}O_2$), CAS 136-60-7.

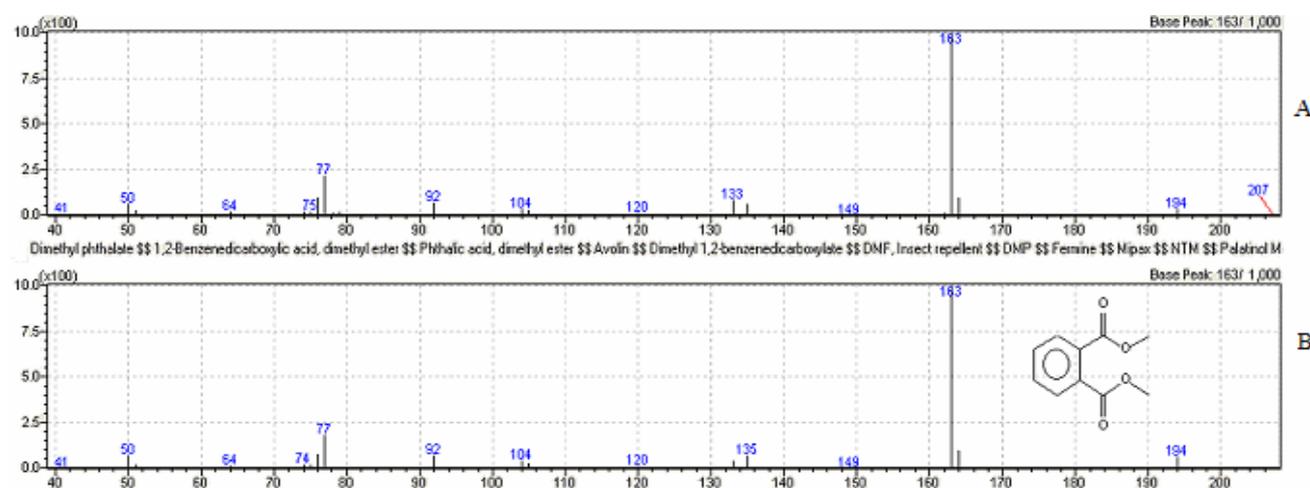


Figura 9 - Espectro da substância (11) identificada: Dimetil ftalato ($C_{10}H_{10}O_4$), CAS 131-11-3.

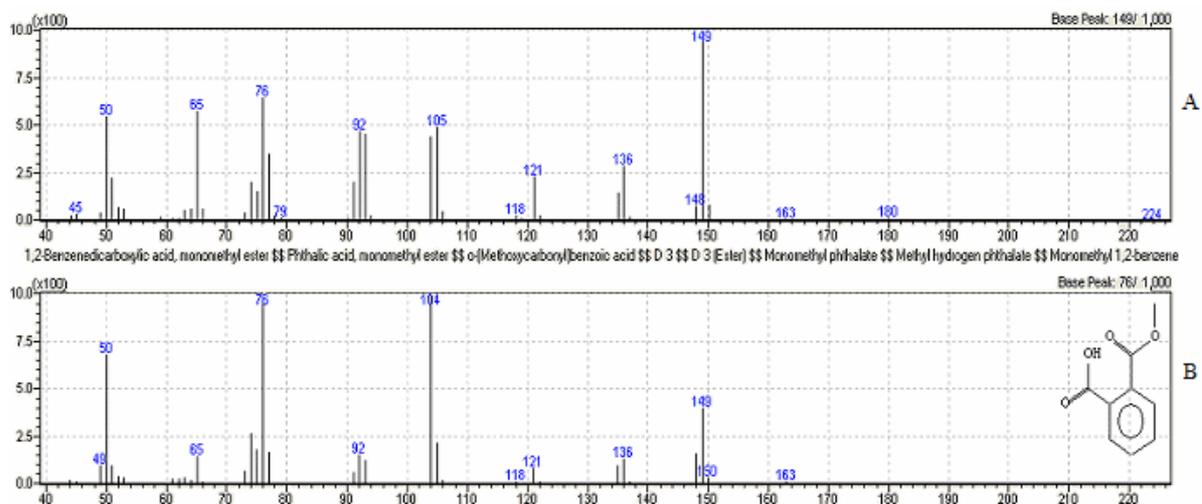


Figura 10 - Espectro da substância (12) identificada: Monometil ftalato ($C_9H_8O_4$), CAS 4376-18-5.

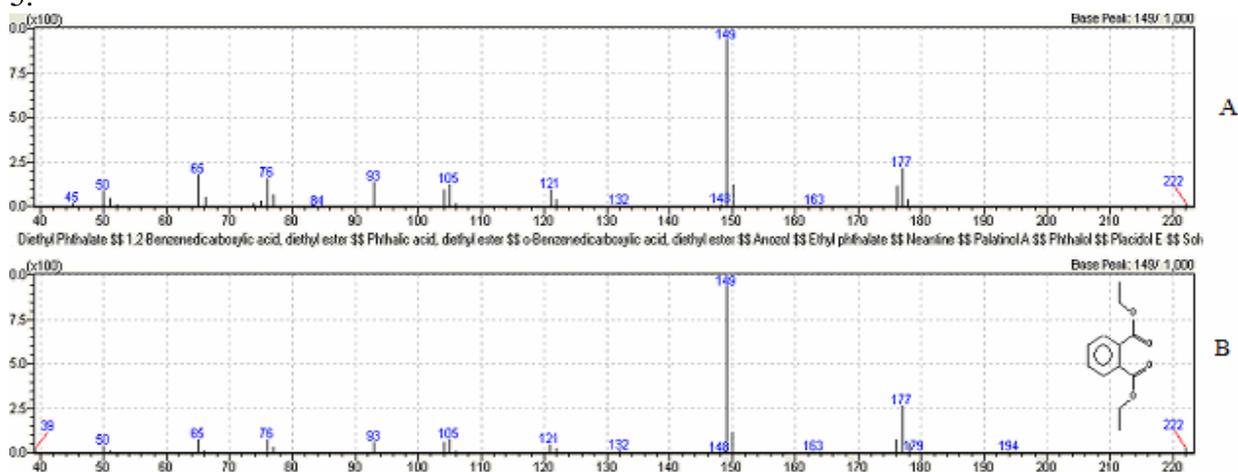


Figura 11 - Espectro da substância (13) identificada: Ftalato de dietila ($C_{12}H_{14}O_4$), CAS 84-66-2.

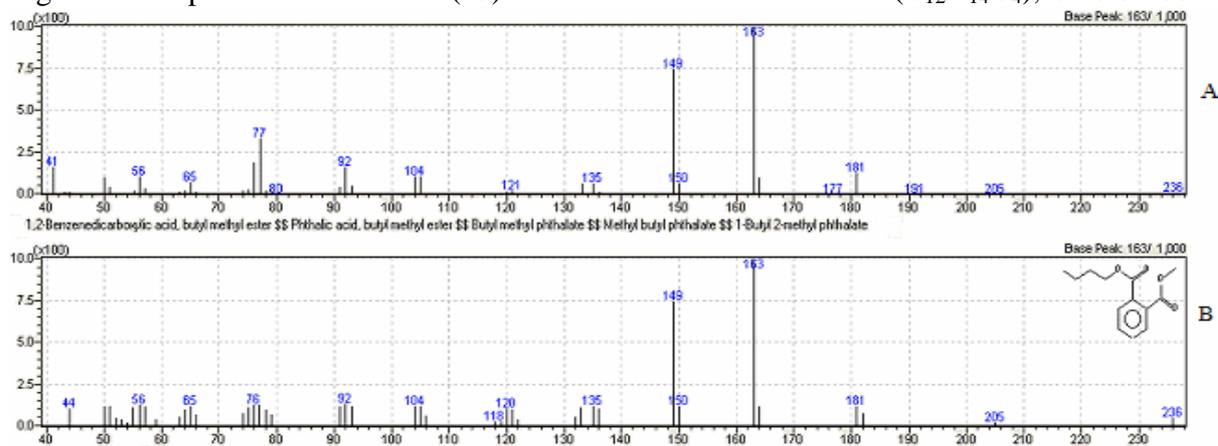


Figura 12 - Espectro da substância (14) identificada: Butil metil ftalato ($C_{13}H_{16}O_4$), CAS 34006-76-3.

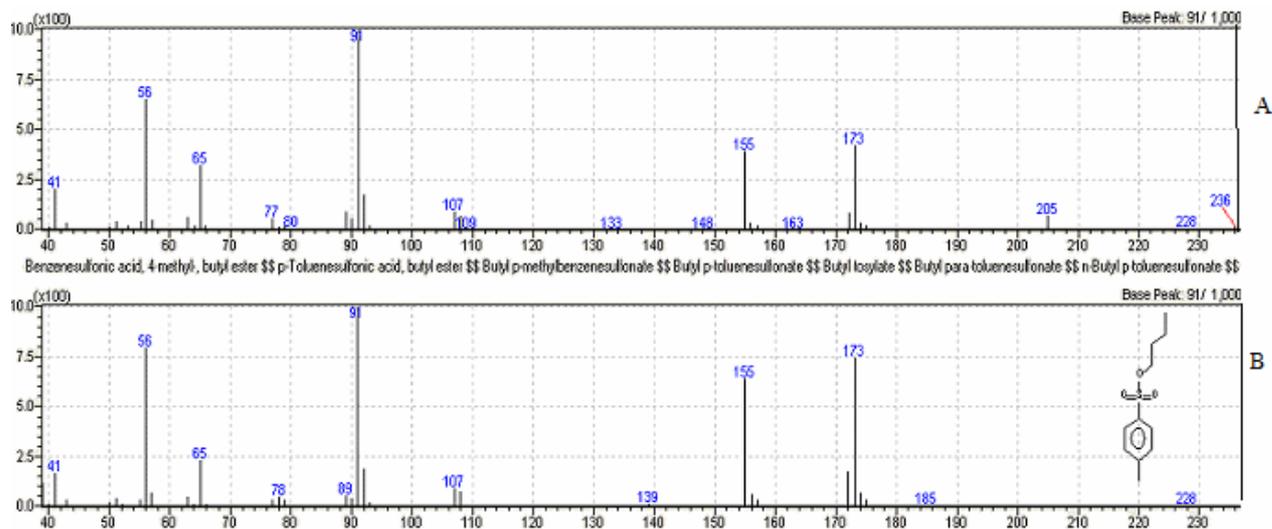


Figura 13 - Espectro da substância (15) identificada: Ácido benzenesulfônico, 4-metil, butil éster ($C_{11}H_{16}O_3S$), CAS 778-28-9.

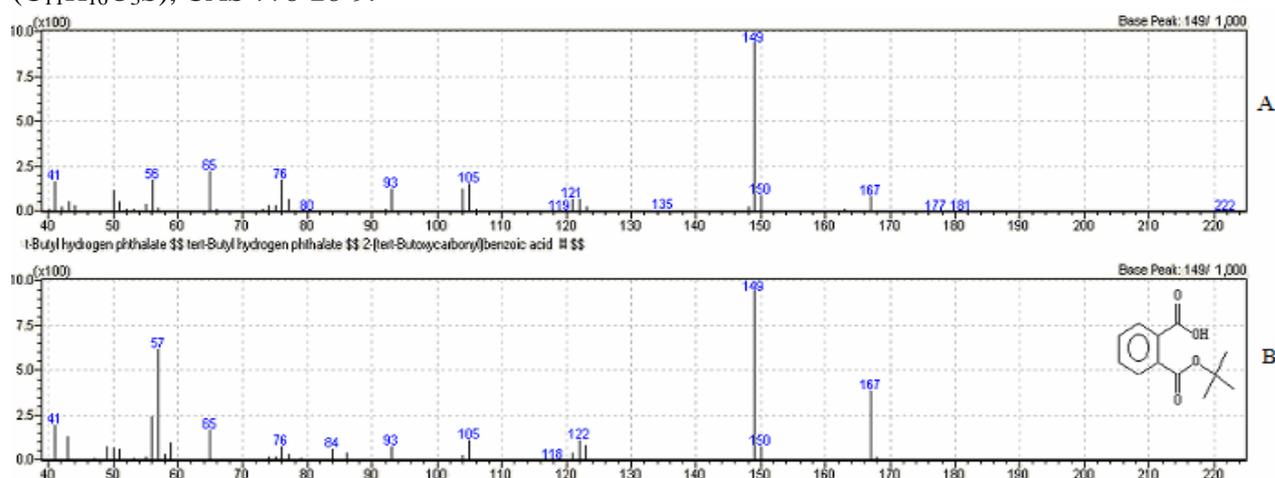


Figura 14 - Espectro da substância (16) identificada: Hidrogenoftalato t-butila ($C_{12}H_{14}O_4$), CAS 33693-84-4.

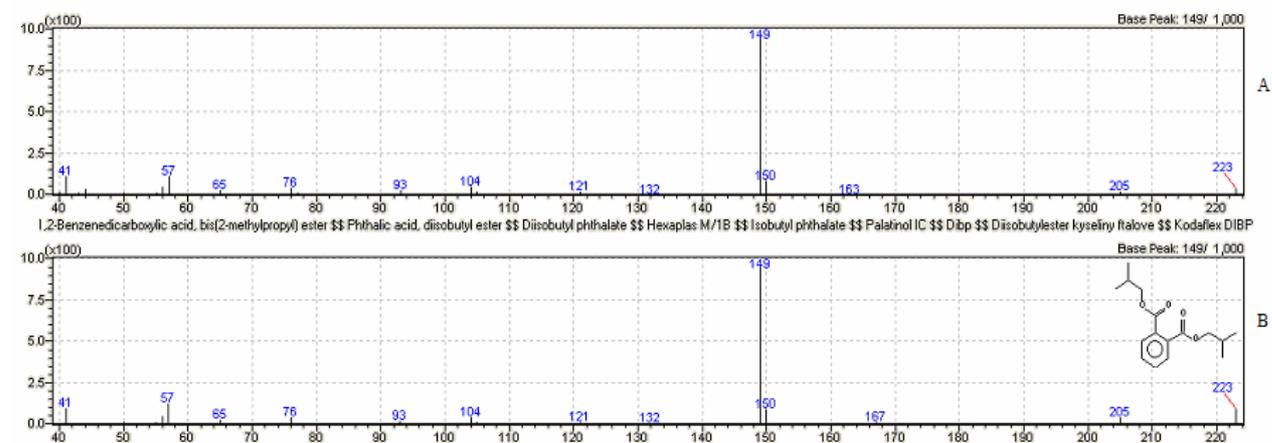


Figura 15 - Espectro da substância (17) identificada: Diisobutil ftalato ($C_{16}H_{22}O_4$), CAS 84-69-5.

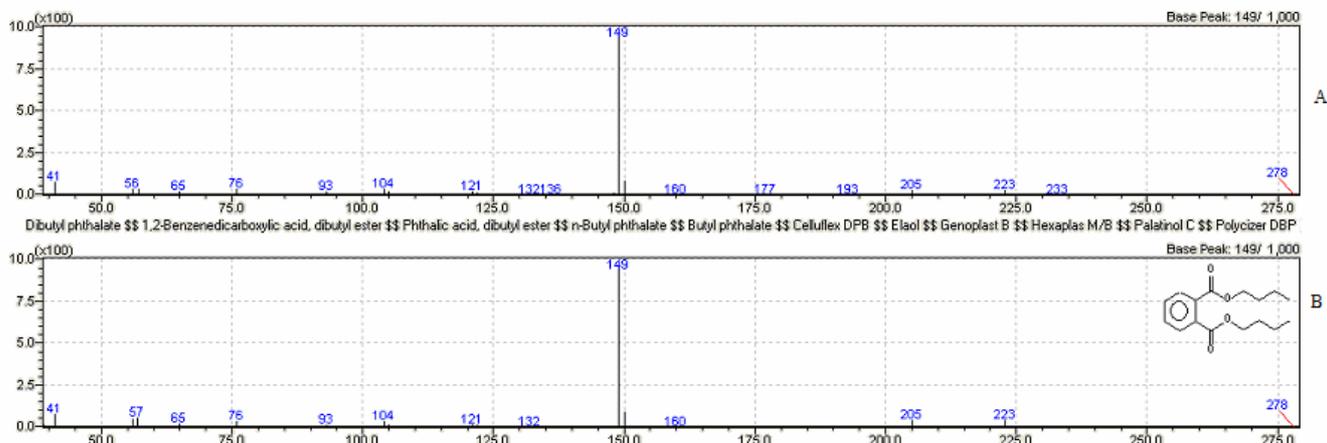


Figura 16 - Espectro da substância (18) identificada: Dibutil ftalato ($C_{16}H_{22}O_4$), CAS 84-74-2.

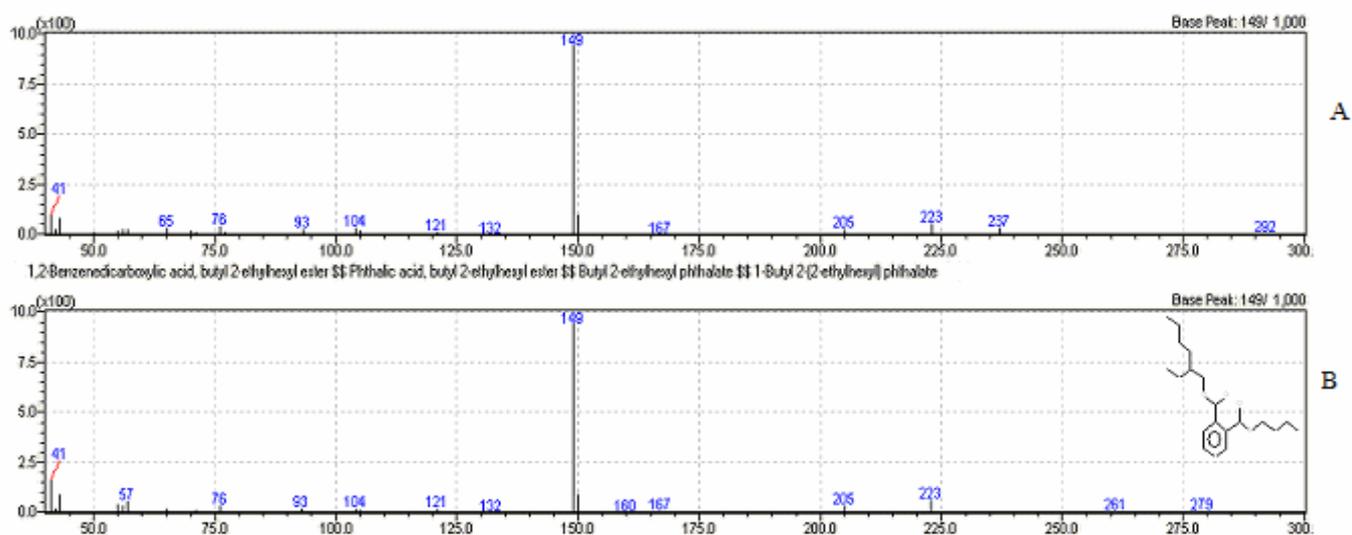


Figura 17 - Espectro da substância (19) identificada Butil 2-etilhexil ftalato ($C_{20}H_{30}O_4$), CAS 85-69-8.

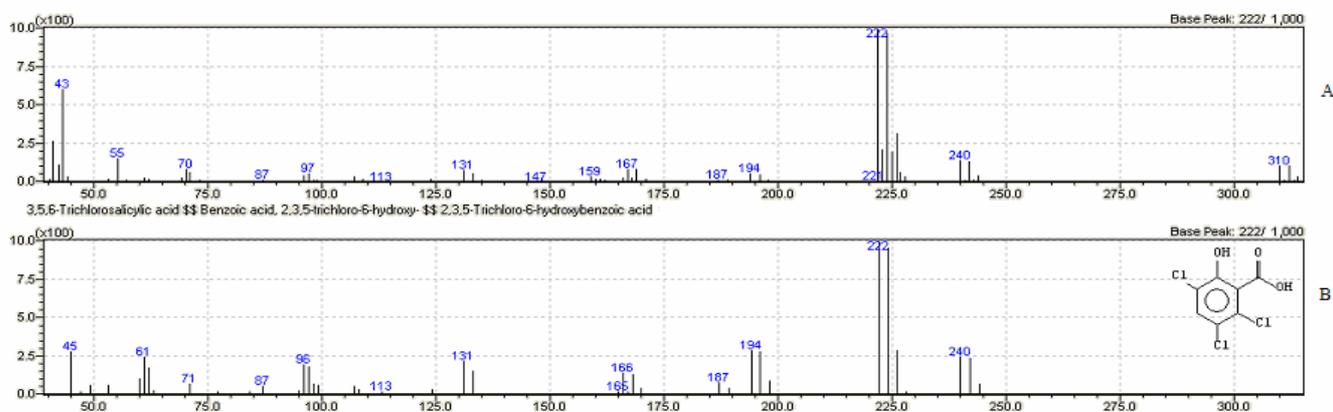


Figura 18 - Espectro da substância (20) identificada: 3,5,6 ácido triclorosalicílico ($C_7H_3Cl_3O_3$), CAS 40932-60-3.

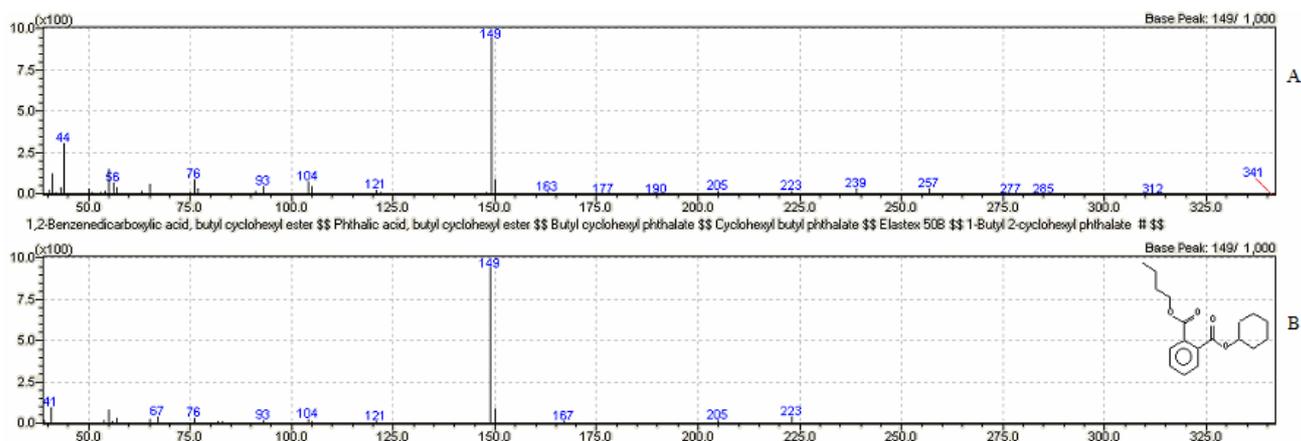


Figura 19 - Espectro da substância (21) identificada: Butil ciclohexil ftalato ($C_{18}H_{24}O_4$), CAS 84-64-0.

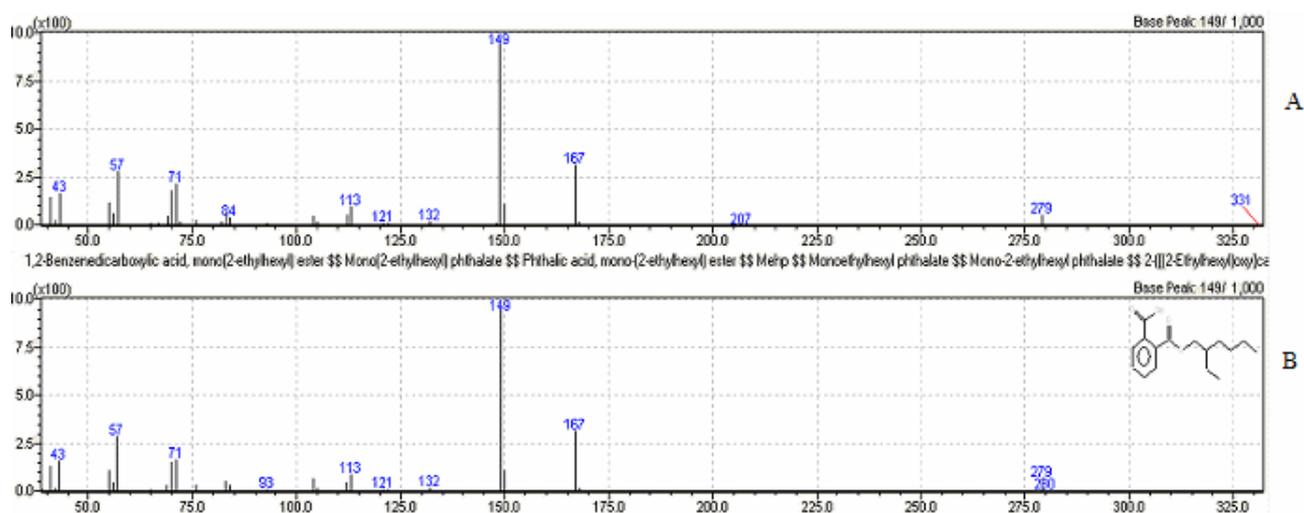


Figura 20 - Espectro da substância (22) identificada: Mono (2-etilhexil) ftalato ($C_{16}H_{22}O_4$), CAS 4376-20-9.

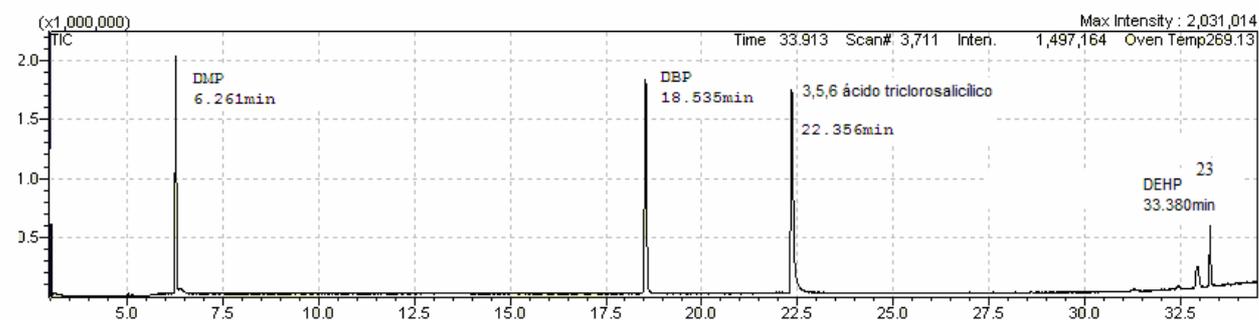


Figura 21- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química novos após extração por LLE nas condições descritas no anexo 3B.

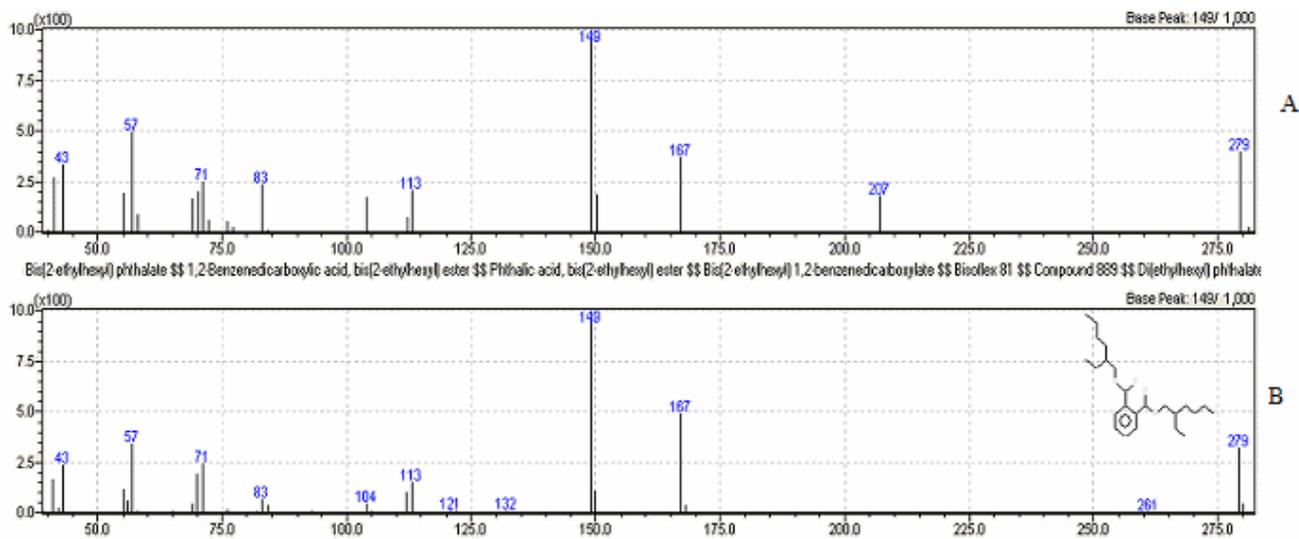


Figura 22 - Espectro da substância (23) identificada: Di (2-etilhexil) ftalato ($C_{24}H_{38}O_4$), CAS 117-81-7.

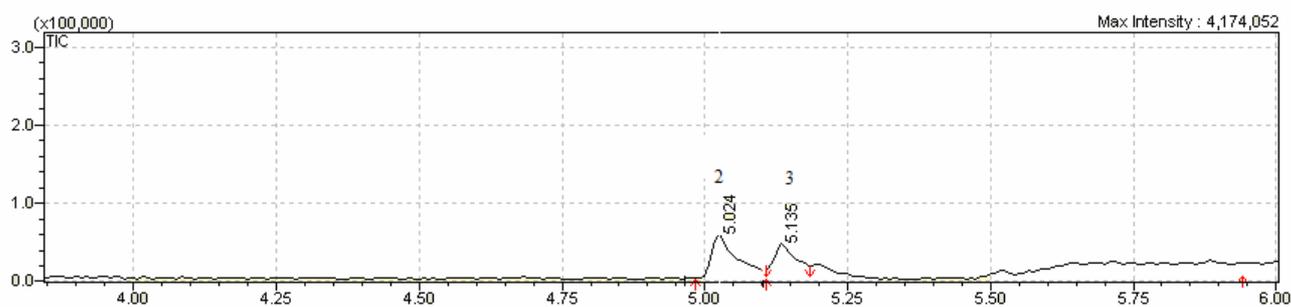


Figura 23- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo dos bastões de luz química após extração por LLE em sistema GC nas condições descritas no anexo 3A.

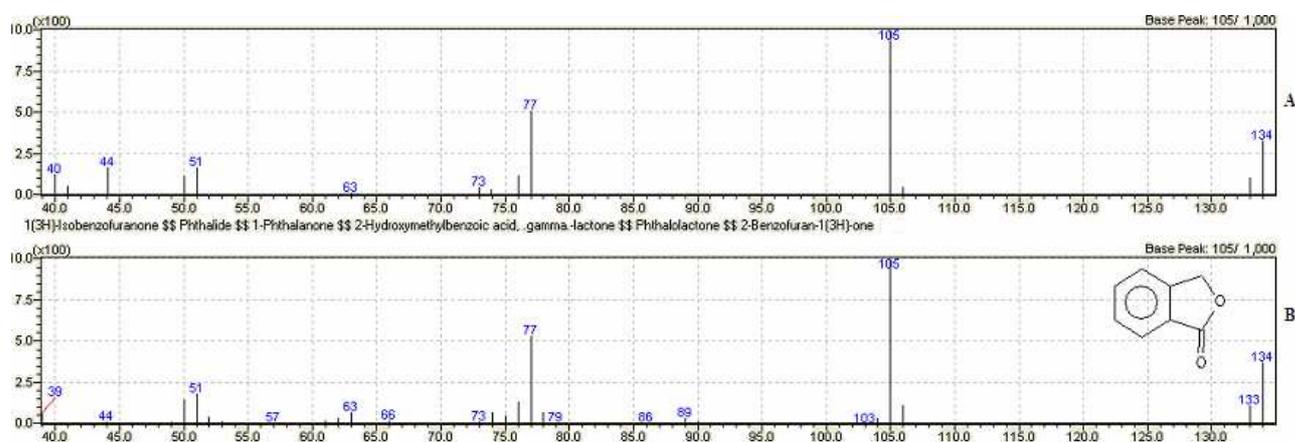


Figura 24 - Substância (2) identificada: 1[3H] Isobenzofuranona ($C_8H_6O_2$), CAS 87-41-2.

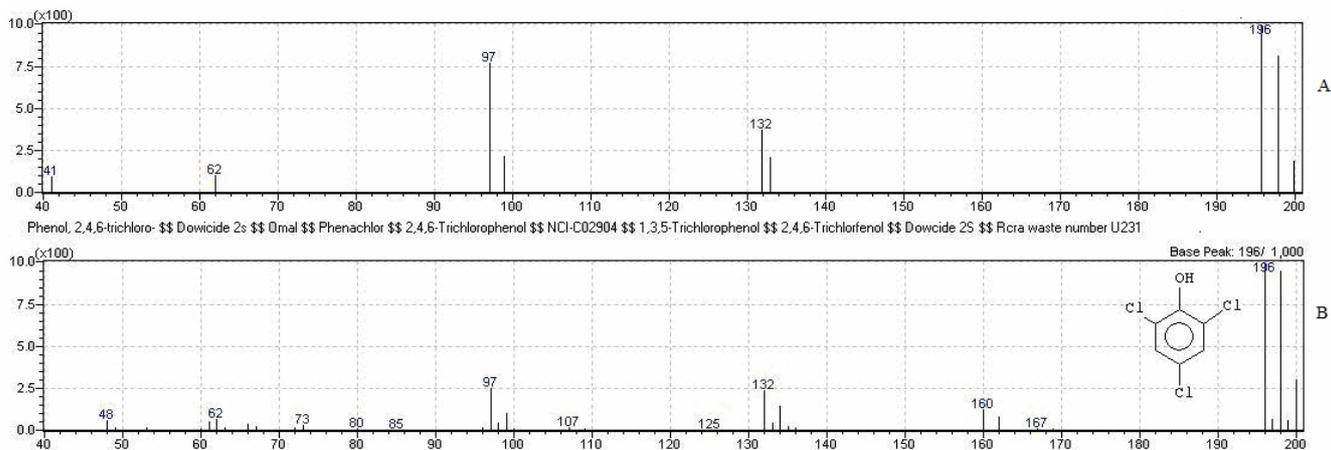


Figura 25 - Substância (3) identificada: 2,4,6- triclorofenol ($C_6H_3Cl_3O$), CAS 88-06-2.

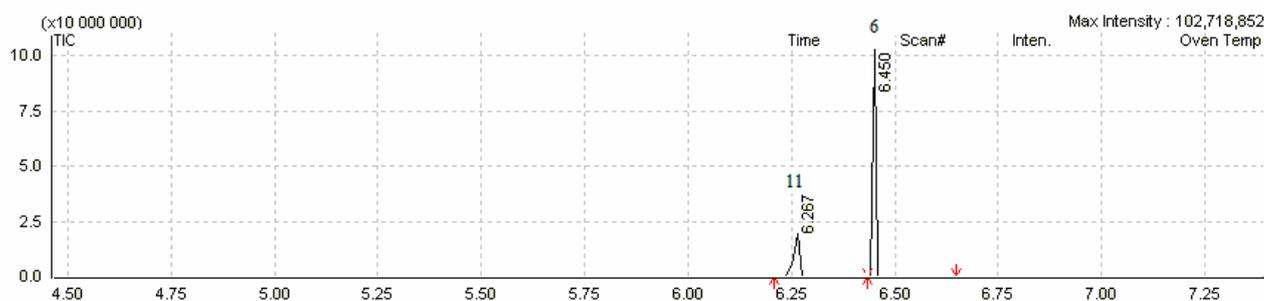


Figura 26- Cromatograma obtido na análise da FSA do conteúdo do compartimento externo dos bastões de luz química após extração por LLE em sistema GC nas condições descritas no anexo 3B.

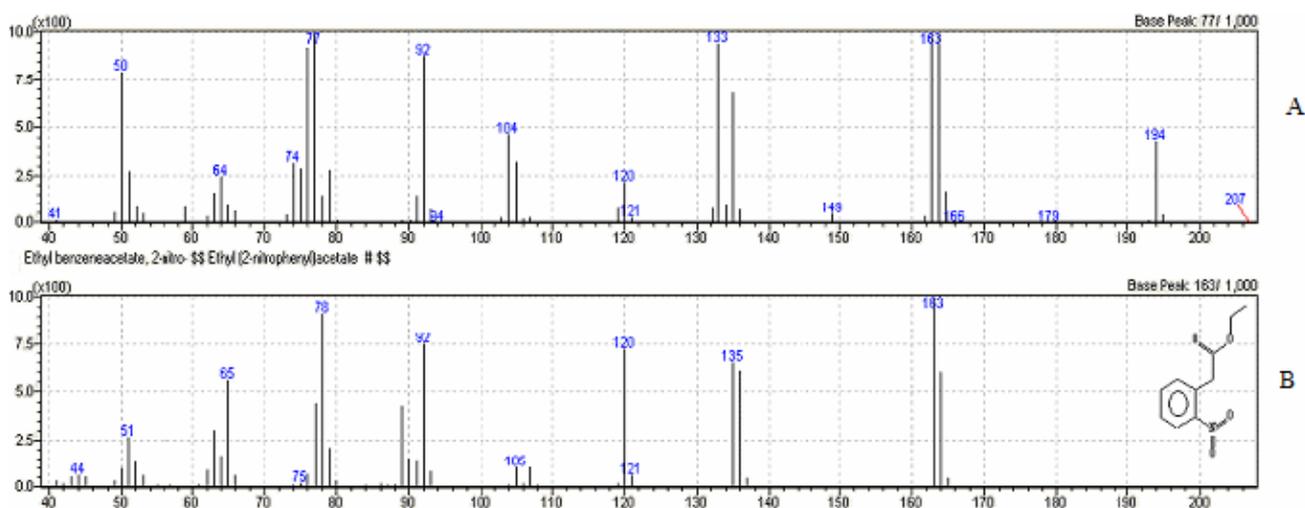


Figura 27 - Substância (6) identificada: 2-etil nitrofenilacetato ($C_{10}H_{11}NO_4$), CAS 31912-02-4.

Anexo 6

Cromatograma obtido na identificação e quantificação do DBP e DMP após extração por DI-SPME em sistema GC com rampa de temperatura nas condições descritas no anexo 4.

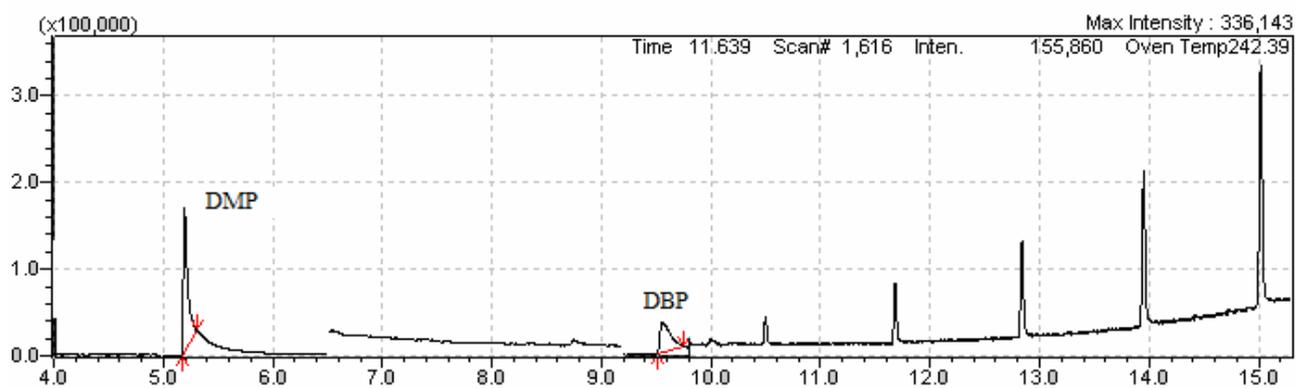
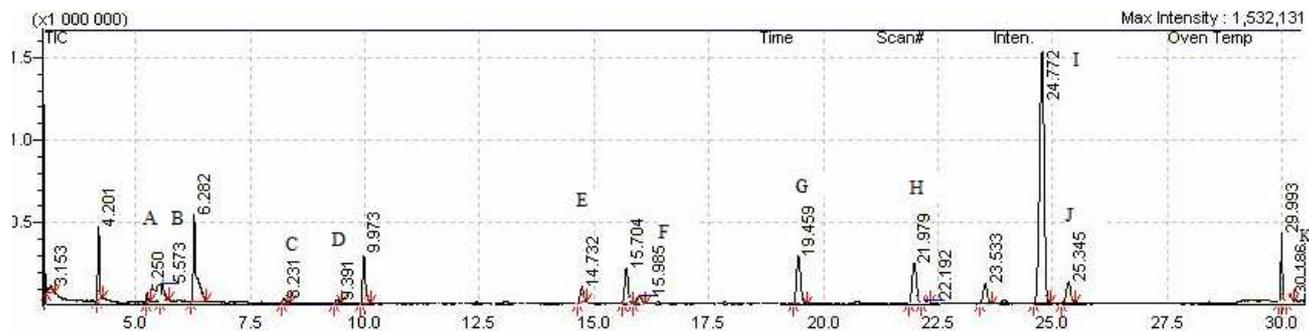


Figura 1 - Cromatograma para identificar e quantificar o DBP e DMP contido na FSA da mistura do conteúdo interno e externo da ampola de bastões de luz química após extração por DI-SPME em sistema GC com rampa de temperatura nas condições descritas no anexo 4.

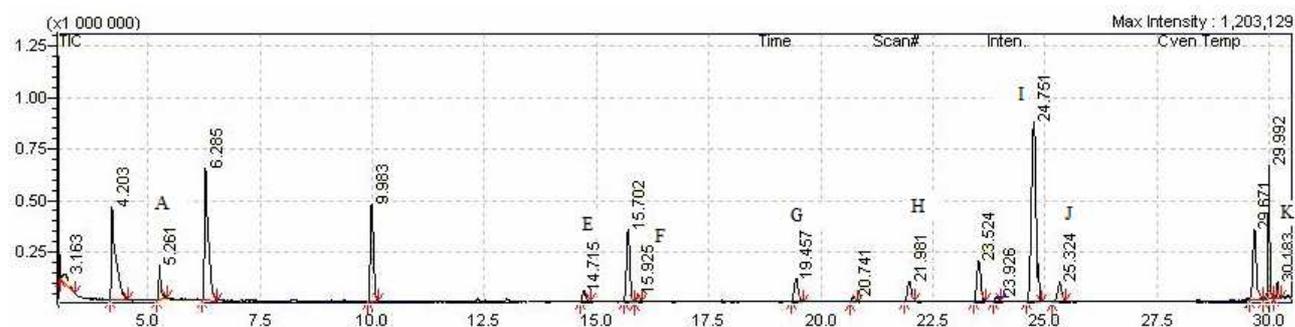
Anexo 7

Cromatogramas e relação de substâncias identificadas por tentativa na FSA do conteúdo da ampola dos bastões de luz química.

30min



13 horas



Substâncias identificadas por tentativa:

- A- ácido benzoico butil éster
- B- 1,4-diisobutil-1,4-dimetilbutil
- C- nitrito de butila
- D- butil 6-cloro-2-tioxo-1,3-benzoxazole-3(2H)-carboxilato
- E- ácido pentadecanoico
- F- 2,3-Dimetil-2,3-difenilbutano
- G- butil 2-etilhexil ftalato
- H-diisobutil ftalato
- I- dibutil ftalato
- J- ácido hexadecanoico
- K- ácido cloroacético 4-pentadecil éster

Figura 1- Cromatogramas e relação de substâncias identificadas por tentativa na FSA do conteúdo da ampola dos bastões de luz química com 30 minutos e 13 horas na etapa de agitação do seu preparo, obtido por GC-MS nas condições descritas no anexo 2.

Anexo 8

Lista de substâncias encontradas nos bastões de luz química de acordo com a biblioteca NIST
147: substância / sinônimo / inglês – português (fórmula)

- 01) 1-Pentanol / Pentyl alcohol / n-Butylcarbinol - 1-Pentanol (C₅H₁₂O)**
- 02) 1[3H]-isobenzofuranone/Phthalide/2-Benzofuran-1[3H]-one- 1[3H] Isobenzofuranona (C₈H₆O₂)**
- 03) Phenol, 2,4,6 – trichloro - 2,4,6-triclorofenol C₆H₃Cl₃O**
- 04) tert-Butyl isopropyl ether / Propane, 2-methyl-2-(1-methylethoxy) / Ether, tert-butyl isopropyl – t-butil isopropil éter (C₇H₁₆O)**
- 05) Acetic acid, butyl ester / n-Butyl acetate / Butyl ethanoate - Acetato de butila (C₆H₁₂O₂)**
- 06) Ethyl 2-nitrophenylacetate – 2-Nitrophenyl acetic acid ethyl ester - 2-etil nitrofenilacetato (C₁₀H₁₁NO₄)**
- 07) Butanoic acid, butyl ester / Butyric acid, butyl ester / Butyl butanoate - Butanoato de butila (C₈H₁₆O₂)**
- 08) Benzoic acid , methyl ester /Methyl benzenecarboxylate / Methyl benzoate / Niobe oil - Ácido benzoico, metil éster (C₈H₈O₂)**
- 09) Phthalic anhydride / 1,3-Isobenzofurandione / 1,2-Benzenedicarboxylic Anhydride - Anidrido ftálico (C₈H₄O₃)**
- 10) Benzoic acid, butyl ester / n-Butyl benzoate / Butyl benzoate - Ácido benzoico, butil éster (C₁₁H₁₄O₂)**
- 11) Dimethyl Phthalate / 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester / Phthalic acid, dimethyl ester - Dimetil ftalato (C₁₀H₁₀O₄)**
- 12) Methyl phthalate/ 1,2 - Benzenedicarboxylic acid , monomethyl ester / Phthalic acid, monomethyl ester/ Methyl hydrogen phthalate - Monometil ftalato(C₉H₈O₄)**
- 13) Diethyl phthalate / 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester/ Phthalic acid, diethyl ester - Dietil ftalato (C₁₂H₁₄O₄)**

- 14) **Butyl methyl phthalate/ 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, butyl methyl ester/ Phthalic acid, butyl methyl ester - Butil metil ftalato** ($C_{13}H_{16}O_4$)
- 15) **p-Toluenesulfonic acid, butyl ester / Benzenesulfonic acid, 4-methyl, butyl ester/ Butyl para-toluenesulfonate - Ácido p-Tolueno sulfónico, butil éster** ($C_{11}H_{16}O_3$)
- 16) **t-Butyl hydrogen phthalate / 2-[tert-Butoxycarbonyl] benzoic acid - hidrogenoftalato t-butila** ($C_{12}H_{14}O_4$)
- 17) **1,2 - Benzenedicarboxylic acid , bis(2-methylpropyl) ester/ Phthalic acid, diisobutyl ester – Diisobutil ftalato** ($C_{16}H_{22}O_4$)
- 18) **Dibutyl phthalate / 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester / Phthalic acid, dibutyl ester - Dibutil ftalato** ($C_{16}H_{22}O_4$)
- 19) **Butyl 2-ethylhexyl phthalate/ Phthalic acid, butyl 2-ethylhexyl ester / 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylhexyl ester - Butil 2 etil hexil ftalato** ($C_{20}H_{30}O_4$)
- 20) **3,5,6- trichlorosalicylic acid / Benzoic acid, 2,3,5-trichloro-6-hydroxy/ 2,3,5-Trichloro-6-hydroxybenzoic acid - 3,5,6 ácido triclorosalicílico** ($C_7H_3Cl_3O_3$)
- 21) **Butyl cyclohexyl phthalate / 1,2 - Benzenedicarboxylic acid , butyl cyclohexyl ester / Phthalic acid, butyl cyclohexyl ester- Butil ciclohexil ftalato** ($C_{18}H_{24}O_4$)
- 22) **Monoethylhexyl phthalate/ 1,2 - Benzenedicarboxylic acid , mono(2-ethylhexyl)ester/ Phthalic acid, mono-(2-ethylhexyl)ester – Mono(2-etilhexil)ftalato** ($C_{16} H_{22} O_4$)
- 23) **Di (2-ethylhexyl) phthalate - Di(2-etilhexil) ftalato** ($C_{24}H_{38}O_4$)