

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM  
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE E TOXICIDADE DE FLUIDOS  
DIELÉTRICOS DE TRANSFORMADORES EM SOLO E MEIO AQUÁTICO**

KARINA SANDERSON

**Toledo – PR - Brasil**

**Dezembro de 2017**

**KARINA SANDERSON**

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE E TOXICIDADE DE FLUIDOS  
DIELÉTRICOS DE TRANSFORMADORES EM SOLO E MEIO AQUÁTICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Monitoramento e Controle Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes

**Co-orientador:** Prof. Dra. Daniela Estelita Goes Trigueros

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luiz Antônio Zanão Junior

**Toledo – PR - Brasil**

**Dezembro de 2017**

**A197a Sanderson, Karina**

**Avaliação da biodegradabilidade e toxicidade de fluidos dielétricos de transformadores em solo e meio aquático. - Toledo, UNIOESTE. 2017.**

**160 p.il : grafs, tabs.**

**Inclui bibliografia**

**Tese (doutorado) Engenharia Química, área de Concentração em Monitoramento e Controle Ambiental. – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2017.**

**Orientador: Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes**

**Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Daniela Estelita Goes Trigueros; Prof. Dr. Luis Antônio Zanão Junior.**

**1. Flúido dielétrico vegetal. 2. Biodegradabilidade. 3. Solo - Toxicidade. 4. Solo - Degradação. I. Título.**

**CDD 628.5**

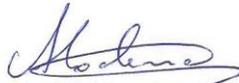
**631.8**

**Bibliotecária responsável: Hebe Negrão de Jimenez CRB 101/9**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Karina Sanderson à Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 13 de dezembro de 2017.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes  
Orientador(a)



Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba  
Membro Interno



Prof. Dr. Márcia Regina Fagundes Klen  
Membro Interno



Dr. Adilson Ricker Schuelter  
Membro Externo



Prof. Dr. Maurício Guy de Andrade  
Membro Externo

**A meu pai, Rubilar Sanderson (*in memorian*)  
por tudo que fez em vida para me  
proporcionar educação.**

**À minha mãe, Marlene Elvanger Sanderson,  
minha eterna protetora.**

**A meu esposo Thiago André Adame, meu  
companheiro e amigo.**

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e seu dom e poder da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes pelo apoio e amizade, me auxiliando não somente na vida acadêmica, mas em vários outros aspectos.

Ao amigo Adilson Schuelter pela paciência, solicitude e disposição em ajudar durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A Cleusa e a Ana pela colaboração e esclarecimento de dúvidas.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), pela infraestrutura e apoio.

A todos os responsáveis e ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Ao Centro Universitário Fundação Assis Gurgacz, pelo apoio e cessão do espaço e equipamentos utilizados.

A todos os funcionários do Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) em especial a Msc. Cornélio Primieri.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em especial a Prof. Dr. Luiz Antônio Zanão Júnio.

À minha família pelo incentivo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Transformadores Elétricos.....	4
2.2. Fluidos Dielétricos para Transformadores .....	4
2.2.1. Fluido dielétrico mineral .....	7
2.2.2. Fluido dielétrico vegetal .....	9
2.2.3. Antioxidantes.....	11
2.2.4. Impactos ambientais do fluido dielétrico vegetal e mineral .....	13
2.3. Biodegradação .....	15
2.3.1. Fatores que influenciam o processo de biodegradação .....	16
2.3.2. Métodos de avaliação da biodegradabilidade .....	17
2.3.3. Fundamento do teste de biodegradabilidade imediata: Método OECD 301 B: CO2 Evolution Test .....	19
2.4. Ecotoxicologia .....	22
2.4.1. Potencial tóxico dos fluidos dielétricos .....	22
2.4.2. Toxicológicos com organismos aquáticos .....	23
2.4.3. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos.....	24
2.4.3.1. Toxicidade aguda.....	24
2.4.3.2. Toxicidade crônica .....	25
2.4.4. Sistemas de Exposição .....	26
2.4.5. Critérios para seleção de organismos aquáticos .....	26
2.4.6. Sensibilidade e cartas controle de organismos testes .....	28
2.4.7. Expressão dos Resultados dos Testes de Toxicidade .....	29
2.4.8. Toxicidade aguda com organismo <i>Danio rerio</i> .....	31
2.4.9. Toxicidade aguda com organismo <i>Artemia salina</i> .....	33
2.4.10. Toxicológicos que utilizam plantas .....	35
2.4.10.1. Influência da qualidade do solo no desenvolvimento das plantas.....	36
2.4.10.2. Toxicidade em solo contaminado utilizando a soja ( <i>Glycine max L.</i> ) como bioindicador.....	38
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
3.1. Fluidos Dielétricos.....	41
3.2. Avaliação da Biodegradabilidade Imediata .....	41
3.2.1. Análise elementar do teor de carbono .....	42

3.2.1.1.	<i>Procedimento analítico</i> .....	42
3.2.2.	Preparo do inóculo.....	43
3.2.2.1.	<i>Preparo das soluções</i> .....	43
3.2.2.2.	<i>Procedimento analítico</i> .....	43
3.2.3.	Acompanhamento dos Testes de Biodegradabilidade Imediata: Método OECD 301 B: CO2 Evolution Test .....	44
3.3.	Ensaio toxicológicos com organismos aquáticos.....	46
3.3.1.	Preparo da fração solúvel em água (FSA).....	46
3.3.2.	Ensaio de toxicidade aguda com organismos <i>Danio rerio</i> .....	47
3.3.2.1.	<i>Local de realização dos testes</i> .....	47
3.3.2.2.	<i>Preparo da água de diluição</i> .....	48
3.3.2.3.	<i>Análises físico-químicas da água de diluição</i> .....	48
3.3.2.4.	<i>Aclimação do organismo teste</i> .....	48
3.3.2.5.	<i>Ensaio preliminares com o Danio rerio</i> .....	49
3.3.2.6.	<i>Teste de sensibilidade com o Danio rerio</i> .....	50
3.3.2.7.	<i>Ensaio definitivos com Danio rerio</i> .....	50
3.3.2.8.	<i>Análise cromatográfica da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos</i> 52	
3.3.3.	Ensaio de toxicidade aguda com organismo <i>Artemia salina</i> .....	53
3.3.3.1.	<i>Local de realização dos testes</i> .....	53
3.3.3.2.	<i>Preparo da água de diluição: solução salina</i> .....	54
3.3.3.3.	<i>Análises físico-químicas da água de diluição</i> .....	54
3.3.3.4.	<i>Eclosão dos cistos de Artemia salina</i> .....	54
3.3.3.5.	<i>Ensaio preliminares com a Artemia salina</i> .....	55
3.3.3.6.	<i>Teste de sensibilidade com a Artemia salina</i> .....	56
3.3.3.7.	<i>Ensaio definitivos com a Artemia salina</i> .....	56
3.3.4.	Expressão dos Resultados dos Testes de Toxicidade .....	58
3.3.5.	Método estatístico utilizado.....	58
3.4.	Ensaio de toxicidade em solo contaminado com fluidos dielétricos utilizando a soja ( <i>Glycine max L.</i> ) como bioindicador.....	58
3.4.1.	Área experimental e caracterização do solo .....	58
3.4.2.	Espécie em estudo .....	59
3.4.3.	Estrutura e condução dos experimentos .....	59
3.4.4.	Análise dos atributos químicos do solo .....	61
3.4.5.	Análise de Teor de Óleos e Graxas (TOG).....	62
3.4.6.	Avaliações fitotécnicas .....	63

3.4.6.1.	<i>Produtividade</i> .....	63
3.4.7.	Análises Estatísticas .....	64
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>65</b>
4.1.	Avaliação da biodegradabilidade imediata.....	65
4.2.	Avaliação da toxicidade aguda com organismos aquáticos.....	69
4.2.1.	Toxicidade aguda com o organismo <i>Danio rerio</i> .....	69
4.2.1.1.	<i>Análises físico-químicas da água de diluição durante o teste</i> .....	69
4.2.1.2.	<i>Teste de sensibilidade com o Danio rerio</i> .....	70
4.2.1.3.	<i>Toxicidade aguda com o organismo Danio rerio: Fluido dielétrico Lubrax e W3</i> .....	71
4.2.1.4.	<i>Toxicidade aguda com o organismo Danio rerio: Fração Solúvel em Água (FSA) do fluido dielétrico Lubrax e W3</i> .....	74
4.2.2.	Toxicidade aguda com o organismo <i>Artemia salina</i> .....	76
4.2.2.1.	<i>Análises físico-químicas da água de diluição durante o teste</i> .....	76
4.2.2.2.	<i>Teste de sensibilidade com a Artemia salina</i> .....	77
4.2.2.3.	<i>Toxicidade aguda com o organismo Artemia salina: Fluido dielétrico Lubrax e W3</i> .....	78
4.2.2.4.	<i>Toxicidade aguda com o organismo Artemia salina: Fração Solúvel em Água (FSA) de fluido dielétrico Lubrax e W3</i> .....	81
4.2.3.	Análise cromatográfica da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos e comparação quanto ao potencial tóxico nos testes com <i>Danio rerio</i> e <i>Artemia salina</i> .....	83
	Wi: área relativa; Si: referência de solubilidade para o componente puro (Anexo 03); Wi.Si: quantidade de componente na mistura. ....	85
	Wi: área relativa; Si: referência de solubilidade para o componente puro (Anexo 03); Wi.Si: quantidade de componente na mistura. ....	86
4.3.	Toxicidade em solo contaminado com fluidos dielétricos utilizando a soja ( <i>Glycine max L.</i> ) como bioindicador .....	88
4.3.1.	Análise dos atributos químicos do solo .....	88
4.3.2.	Determinação do teor de óleos e graxas (TOG) .....	91
4.3.3.	Avaliações fitotécnicas .....	96
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>116</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>118</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>140</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> - Ilustração esquemática dos hidrocarbonetos constituintes do óleo mineral: (a) hidrocarbonetos parafínicos, (b) naftênicos (c) aromáticos.....	7
<b>Figura 2.2</b> - Ilustração esquemática de um triacilglicerol, componente do óleo vegetal ...	10
<b>Figura 2.3</b> - Antioxidantes sintéticos.....	12
<b>Figura 2.4</b> - Desenho esquemático do teste de biodegradabilidade pela medida do CO <sub>2</sub> ..	20
<b>Figura 2.5</b> - Forma de apresentação dos resultados do teste de biodegradabilidade.....	21
<b>Figura 2.6</b> - Exemplo de carta controle da sensibilidade dos organismos <i>M. juniae</i> utilizando a substância de referência dodecil sulfato de sódio.....	28
<b>Figura 2.7</b> - Representação de uma curva dose-resposta típica obtida e testes de toxicidade. ....	30
<b>Figura 2.8</b> - <i>Danio rerio</i> ( <i>Cyprinidae</i> ).....	32
<b>Figura 2.9</b> - Ciclo vital da <i>Artemia sp</i> .....	34
<b>Figura 3.1</b> - Resumo das etapas dos experimentos de toxicidade aguda com o <i>Danio rerio</i> .....	47
<b>Figura 3.2</b> - Resumo das etapas dos experimentos de toxicidade aguda com a <i>Artemia salina</i> .....	53
<b>Figura 3.3</b> - Sistema para eclosão dos cistos de <i>Artemia salina</i> .....	55
<b>Figura 4.1</b> - Percentagem de CO <sub>2</sub> liberado nas soluções: □ padrão de benzoato de sódio, ● substância teste dielétrica: (a) crambe, (b) W3, (c) W6 e (d) W9, ▲ inibição em função do período de incubação em dias.....	65
<b>Figura 4.2</b> - Percentagem de CO <sub>2</sub> liberado nas soluções: □ padrão de benzoato de sódio, ● substância teste dielétrica Lubrax, ▲ inibição em função do período de incubação em dias. ....	67
<b>Figura 4.3</b> - Percentagem de CO <sub>2</sub> liberado nas soluções das substâncias testes dielétricas óleo: □ crambe, ● W3, x W6, ▲ W9 e ⊖ Lubrax em função do período de incubação em dias.....	68
<b>Figura 4.4</b> - Carta controle da sensibilidade do organismo <i>Danio rerio</i> utilizando a substância de referência cloreto de potássio (KCl). ....	70
<b>Figura 4.5</b> - Porcentagem de mortalidade do organismo <i>Danio rerio</i> em função da concentração em g L <sup>-1</sup> dos fluidos dielétricos (a) Lubrax e (b) W3.....	73
<b>Figura 4.6</b> - Porcentagem de mortalidade do organismo <i>Danio rerio</i> em função das concentrações da FSA do fluido dielétrico Lubrax .....	75
<b>Figura 4.7</b> - Carta controle da sensibilidade do organismo <i>Artemia salina</i> utilizando a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS).....	78
<b>Figura 4.8</b> - Porcentagem de mortalidade do organismo <i>Artemia salina</i> em função da concentração em g L <sup>-1</sup> dos fluidos dielétricos (a) Lubrax (b) W3.....	80
<b>Figura 4.9</b> - Porcentagem de mortalidade do organismo <i>Artemia salina</i> em função das concentrações da FSA do fluido dielétrico Lubrax .....	82
<b>Figura 4.10</b> - Cromatograma da fração solúvel em água do fluido dielétrico (a) W3 e (b) Lubrax utilizado nos experimentos de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	84

<b>Figura 4.11</b> - Percentagem de remoção de óleos e graxas no solo de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita .....	92
<b>Figura 4.12</b> - Resultados das frações de óleos residuais (FOR) dos solos contaminados com (a) W3 e (b) Lubrax com sete concentrações iniciais nos anos de colheita .....	93
<b>Figura 4.13</b> - Dados das frações de óleo residual (FOR) unificados para os solos contaminados pelos fluidos dielétricos W3 e Lubrax, incluindo seus ajustes parabólicos. 94	
<b>Figura 4.14</b> - Previsão empírica sobre o número de anos de colheita (NAC) necessários para uma redução significativa das frações de óleo residual (FOR) para solos contaminados W3 e Lubrax .....	95
<b>Figura 4.15</b> - Emergência da soja de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita .....	98
<b>Figura 4.16</b> - Comportamento da emergência ao longo dos primeiros três anos de colheita para os fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax.....	99
<b>Figura 4.17</b> - Perfil da previsão dos dados de emergência unificados em termos de número de anos de colheita (NAC).....	100
<b>Figura 4.18</b> - Altura da planta e diâmetro do caule da soja de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) e (c) W3 e (b) e (d) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita .....	102
<b>Figura 4.19</b> - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro ano de colheita .....	103
<b>Figura 4.20</b> - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 no segundo ano de colheita.....	104
<b>Figura 4.21</b> - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico Lubrax no segundo ano de colheita .....	105
<b>Figura 4.22</b> - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 no terceiro ano de colheita .....	106
<b>Figura 4.23</b> - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico Lubrax no terceiro ano de colheita .....	106
<b>Figura 4.24</b> - Comprimento de raízes e produção de matéria seca radicular de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) e (c) W3 e (b) e (d) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita .....	108
<b>Figura 4.25</b> - Número de vagens por planta, número de grãos por planta e massa de mil grãos de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a), (c) e (e) W3 e (b), (d) e (f) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita.....	112
<b>Figura 4.26</b> - Produtividade (em mg/planta) de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita .....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Característica do fluido dielétrico mineral novo .....	8
<b>Tabela 2.2</b> - Característica do fluido dielétrico vegetal novo.....	10
<b>Tabela 2.3</b> - Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos.....	25
<b>Tabela 2.4</b> - Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade .....	29
<b>Tabela 2.5</b> - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	32
<b>Tabela 2.6</b> - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com a <i>Artemia salina</i> ..	35
<b>Tabela 3.1</b> - Condições operacionais do equipamento Elemental Analyzer .....	42
<b>Tabela 3.2</b> - Tratamentos utilizados no experimento de biodegradabilidade com suas respectivas composições.....	44
<b>Tabela 3.3</b> - Faixas de trabalho do equipamento .....	48
<b>Tabela 3.4</b> - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	52
<b>Tabela 3.5</b> - Faixas de trabalho do equipamento .....	54
<b>Tabela 3.6</b> - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> .....	57
<b>Tabela 4.1</b> - Análise teor de carbono total.....	65
<b>Tabela 4.2</b> - Resultados das análises físico-químicas durante os experimentos com <i>Danio rerio</i> .....	70
<b>Tabela 4.3</b> - Mortalidade acumulativa do <i>Danio rerio</i> durante o período de exposição ao fluido dielétrico Lubrax .....	71
<b>Tabela 4.4</b> - Mortalidade acumulativa do <i>Danio rerio</i> durante o período de exposição ao fluido dielétrico W3.....	72
<b>Tabela 4.5</b> - Mortalidade acumulativa do <i>Danio rerio</i> durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico Lubrax.....	74
<b>Tabela 4.6</b> - Mortalidade acumulativa do <i>Danio rerio</i> durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico W3 .....	76
<b>Tabela 4.7</b> - Resultados das análises físico-químicas durante os experimentos com <i>Artemia salina</i> .....	77
<b>Tabela 4.8</b> - Mortalidade acumulativa da <i>Artemia salina</i> durante o período de exposição ao fluido dielétrico Lubrax .....	78
<b>Tabela 4.9</b> - Mortalidade acumulativa da <i>Artemia salina</i> durante o período de exposição ao fluido dielétrico W3.....	79
<b>Tabela 4.10</b> - Mortalidade acumulativa da <i>Artemia salina</i> durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico lubrax .....	81
<b>Tabela 4.11</b> - Mortalidade acumulativa da <i>Artemia salina</i> durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico W3 .....	82
<b>Tabela 4.12</b> - Resumo da análise cromatográfica da fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 utilizado nos experimentos de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	85
<b>Tabela 4.13</b> - Resumo da análise cromatográfica da fração solúvel em água do fluido dielétrico Lubrax utilizado nos experimentos de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	86
<b>Tabela 4.14</b> - Estatística descritiva (média) dos atributos pH, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), capacidade de trocas catiônicas (CTC), saturação por bases (V%) e carbono (C) do solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax .....	90

<b>Tabela 4.15</b> - Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de plantio do teor de óleos e graxas (TOG) presente nas amostras de solos contaminados com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax. ....	91
<b>Tabela 4.16</b> - Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de colheita da emergência (GE), altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), comprimento radicular (CR) e produção de matéria seca das raízes (MSR) da soja em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e mineral Lubrax. ....	97
<b>Tabela 4.17</b> - Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de colheita do número de vagem por planta (VP), número de grãos por planta (GP) e massa de mil grãos (M1000) da soja em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax. ....	110

## NOMENCLATURA

%	porcentagem
*Al	saturação por alumínio
*S	soma de bases
*T	capacidade de troca de cátions
*V	saturação por base
°C	graus celsius
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFNOR	Association Française de Normalisation
Al	alumínio
ANP	Agência Nacional do Petróleo
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
APHA	American Public Health Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	adenosina trifosfato
AWWA	American Water Works Association
BaCO <sub>3</sub>	carbonato de bário
Ba(OH) <sub>2</sub>	hidróxido de bário
BHA	butil-hidroxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
BTEX	benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros de xileno
C	carbono
Ca	cálcio
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	cloreto de cálcio dihidratado
CaCl <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	tetracloro de cálcio dihidratado
CaCO <sub>3</sub> /L	carbonato de cálcio por litro
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média
CENO	Concentração de Efeito não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CH <sub>4</sub>	metano
CHN	Carbono Hidrogênio Nitrogênio
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média
cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
COD	carbono orgânico dissolvido
COPEL	Companhia Paranaense de Energia
cSt	centistokes
CTC	capacidade de trocas catiônicas
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DBPC	di-terc-butyl-p-cresol

DSS	dodecil sulfato de sódio
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Média
DOC	Dissolved Organic Carbon
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fe	ferro
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	cloreto de ferro (III) hexahidratado
FeSO <sub>4</sub>	sulfato de ferro (II)
FESB	Fundação Municipal de Ensino Superior de Bragança Paulista
FOR	Frações de óleo residual
FSA	Fração Solúvel em Água
g	grama
g/3L	grama por três litros
g/L	grama por litro
mg/planta	miligrama por planta
h	horas
H	hidrogênio
H <sub>2</sub> O	água
ha	hectare
HCl	ácido clorídrico
He	Hélio
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
ISO	International Organization for Standardization
K	potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato dipotásico
KCl	cloreto de potássio
kg	quilo
kg.m <sup>-3</sup>	quilo por metro cúbico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato monopotásico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potássico dibásico
K <sub>ow</sub>	coeficiente de partição octanol:água
kV	quilovolt
kVA	Kilovoltampere
L	litros
LANARV	Laboratório de Análises de Referencia Vegetal
LI	limite inferior
LS	limite superior
Lvef	latossolo vermelho eutroférico
M	molar
m.N.m <sup>-1</sup>	meganewtom por metro
mg	miligrama
Mg	magnésio
mg carbono L <sup>-1</sup>	miligrama de carbono por litro
mg de CaCO <sub>3</sub> /L	miligrama de carbonato de cálcio por litro

mg KOH (g óleo) <sup>-1</sup>	miligrama de hidróxido de potássio por grama de óleo
mg.kg <sup>-1</sup>	miligrama por quilo
mg.L <sup>-1</sup>	miligrama por litro
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	cloreto de magnésio hexahidratado
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnésio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sulfato de magnésio heptahidratado
MITI	Ministry of International Trade and Industry
mL	mililitros
mL.min <sup>-1</sup>	mililitros por minuto
mm	milímetro
MnSO <sub>4</sub>	sulfato de manganês
m/v	massa por volume
MVA	Megavolt Ampére
N	normal
N <sub>2</sub>	nitrogênio
NaCl	cloreto de sódio
NaNO <sub>3</sub>	nitrato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sódio
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	fosfato de sódio dihidratado
NAC	Número de anos de colheita
NBR	Norma Brasileira
NH <sub>3</sub>	amônia
NH <sub>4</sub> Cl	cloreto de amônio
NO <sup>3-</sup>	nitrato
nm	nanômetro
O <sub>2</sub>	oxigênio
OD	oxigênio dissolvido
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMI	óleo mineral isolante
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVI	óleo vegetal isolante
P	fósforo
PCA	Plate Count Agar
PG	propil galato
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
ppt	partes por trilhão
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	sulfato
TBHQ	terc-butil-hidroquinona
TCD	Detector de Condutividade Térmica
ThCO <sub>2</sub>	teor de gás carbônico
ThOD	teor de oxigênio dissolvido

TOG	teor de óleos e graxas
UFC/mL	unidade formadora de colônia por mililitro
USEPA	United States Environmental Protection Agency
V	volt
ZnSO <sub>4</sub>	sulfato de zinco
μS/cm	micro Siemens por centímetro

SANDERSON, KARINA. **Avaliação da biodegradabilidade e toxicidade de fluidos dielétricos de transformadores em solo e meio aquático.** Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR, 2017.

## RESUMO

As concessionárias de energia, constantemente, contaminam o meio ambiente com fluidos dielétricos, devido a falhas e vazamentos de transformadores de potência. Desta forma, estes fluidos devem ser estudados, pois podem implicar na vulnerabilidade da fauna e da flora. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos deletérios do fluido dielétrico vegetal e mineral, através de ensaios de biodegradabilidade, toxicidade aguda, ensaios dos atributos químicos e degradação (óleos e graxas) do solo e das avaliações das características fitotécnicas da soja. Nos ensaios da biodegradabilidade imediata foram estudados os fluidos dielétricos vegetais de crambe, W3, W6 e W9 e um à base de óleo mineral (Lubrax). Para os ensaios de toxicidade aguda com *Danio rerio* e *Artemia salina* e para os ensaios de toxicidade em solo utilizando a soja (*Glycine max L.*), foram usados o fluido dielétrico W3 e o Lubrax. A análise da biodegradabilidade foi avaliada pela ação de microrganismos que transformaram a amostra em CO<sub>2</sub>, sendo medido por titulometria. Para os estudos da toxicidade aguda foram realizados dois experimentos distintos, onde os organismos foram expostos às diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax e onde foram expostos à FSA dos fluidos. A FSA do W3 e Lubrax utilizado no ensaio com o *Danio rerio* foram submetida a análise de cromatografia gasosa. Os ensaios de toxicidade aguda com o *Danio rerio* e a *Artemia salina* foram realizados com o intuito de se conhecer a faixa aproximada de toxicidade dos fluidos, levando em consideração a menor diluição que causou letalidade em 50% dos organismos (CL<sub>50</sub>). As análises dos atributos químicos do solo foram: pH, P, K, Ca, Mg, CTC e V. O teor de óleos e graxas dos fluidos dielétricos foi quantificado pelo método de extração em aparelho tipo *Soxhlet*. Para as avaliações fitotécnicas da soja analisou-se a emergência, altura de planta, diâmetro do caule, comprimento radicular, matéria seca radicular, número de vagens e de grãos e a massa de mil grãos. Os fluidos dielétricos vegetais são biodegradáveis num período de 14 dias, enquanto o óleo mineral é difícil de ser biodegradado. No estudo da toxicidade aguda o W3 apresentou uma CL<sub>50</sub> menor do que o Lubrax, causando maior mortalidade nos organismos. A CL<sub>50</sub> para o *Danio rerio* foi de 2,46 gL<sup>-1</sup> (Lubrax) e de 0,318 gL<sup>-1</sup> (W3). Para a *Artemia salina* a CL<sub>50</sub> foi de 4,63 gL<sup>-1</sup> (Lubrax) e 0,641 gL<sup>-1</sup> (W3). Em relação aos ensaios com a FSA, o Lubrax causou maior efeito tóxico aos organismos. O W3 não apresentou efeito tóxico a 50% dos organismos. Os valores da CL<sub>50</sub> para o Lubrax foi de 4,89% para o *Danio rerio* e 7,67% *Artemia salina*. A análise cromatográfica da FSA dos fluidos não foi conclusiva, apenas sugere que a toxicidade pode estar relacionada com a solubilidade de todas as substâncias presentes no Lubrax e não apenas com a solubilidade dos n-alcenos. Os atributos químicos do solo não sofreram alterações significativas, apenas o carbono apresentou variação crescente em relação às concentrações dos fluidos. Houve redução do TOG durante os anos agrícolas e os solos em presença do W3 apresentaram maior degradação do que os em solos com Lubrax. O aumento da concentração dos fluidos dielétricos ocasionou redução nas características fitotécnicas da soja. As plantas em solo contaminadas com W3 apresentaram melhor desenvolvimento em relação às plantas que estavam no solo contaminado com Lubrax.

**Palavras-chave:** fluido dielétrico vegetal, fluido dielétrico mineral, biodegradabilidade imediata, toxicidade aguda, atributos químicos do solo, degradação, características fitotécnicas.

SANDERSON, KARINA. **Evaluation of the biodegradability and toxicity of transformer dielectric fluids in soil and aquatic environment.** Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR, 2017.

### ABSTRACT

Power distribution companies constantly contaminate the environment with dielectric fluids due to power transformer failures and leaks. In this way, these fluids should be studied, as they may entail the vulnerability of the fauna and flora. In this sense, the objective of this work was to investigate the deleterious effects of vegetal and mineral dielectric fluids, through biodegradability, acute toxicity, chemical attributes and soil degradation (oils and greases) tests as well as soybean phytotechnical characteristics evaluation. In the tests of the immediate biodegradability, vegetal dielectric fluids of crambe, W3, W6 and W9 and one based on mineral oil (Lubrax) were studied. For the acute toxicity tests with *Danio rerio* and *Artemia salina* and the soil toxicity tests using soybean (*Glycine max* L.), the W3 and Lubrax dielectric fluid were used. The biodegradability analysis was evaluated by the action of microorganisms that transformed the sample into CO<sub>2</sub>, being measured by titulometry. For the acute toxicity studies, two distinct experiments were performed, where the organisms were exposed to different concentrations of the W3 and Lubrax dielectric fluids and to the FSA of the fluids. The FSA of W3 and Lubrax used in the *Danio rerio* assay were subjected to gas chromatography analysis. The acute toxicity tests with *Danio rerio* and *Artemia salina* were carried out in order to know the approximate range of fluid toxicity, taking into account the lower dilution that caused lethality in 50% of organisms (LC<sub>50</sub>). The soil chemical attributes analyzed were: pH, P, K, Ca, Mg, CTC and V. The content of oils and greases of the dielectric fluids was quantified by the Soxhlet type extraction method. For the phytotechnical evaluations, emergence, plant height, stem diameter, root length, root dry matter, number of pods and grains, and the mass of one thousand grains were analyzed. Vegetable dielectric fluids are biodegradable over a period of 14 days, while mineral oil is difficult to biodegrade. In the acute toxicity study, W3 had a lower LC<sub>50</sub> than Lubrax, causing higher mortality in the organisms. The LC<sub>50</sub> for the *Danio rerio* was 2.46 gL<sup>-1</sup> (Lubrax) and 0.318 gL<sup>-1</sup> (W3). For *Artemia salina* the LC<sub>50</sub> was 4.63 gL<sup>-1</sup> (Lubrax) and 0.641 gL<sup>-1</sup> (W3). In relation to the FSA tests, the Lubrax one caused a greater toxic effect on the organisms, while the W3 had no toxic effect on 50% of organisms. The LC<sub>50</sub> values for Lubrax were 4.89% for the *Danio rerio* and 7.67% for *Artemia salina*. Chromatographic analysis of FSA of the fluids was not conclusive, it only suggests that the toxicity may be related to the solubility of all the substances present in Lubrax and not only to the solubility of n-alkanes. The chemical attributes of the soil did not change significantly, only the carbon presented increasing variation in relation to the concentrations of the fluids. There was a reduction of the TOG during the agricultural years and the soils in the presence of W3 presented greater degradation than those with Lubrax. The increase in the concentration of the dielectric fluids caused a reduction in the phytotechnical characteristics of the soybean. Plants from soil contaminated with W3 showed better development compared to plants that were in soil contaminated with Lubrax.

**Key words:** vegetable dielectric fluid, mineral dielectric fluid, immediate biodegradability, acute toxicity, soil chemical attributes, degradation, phytotechnical characteristics.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a instável oferta de produtos derivados de petróleo aliada à crescente preocupação da sociedade com a preservação do meio ambiente despertou o interesse de empresas de diferentes setores pela importância das informações ecológicas, particularmente as relacionadas com a avaliação da biodegradabilidade, ecotoxicidade, fitotoxicidade e bioacumulação de substâncias químicas nos ecossistemas aquáticos e terrestres, tornando possível analisar os efeitos desses produtos ao ambiente (DARWIN *et al.*, 2011; ARAZOE *et al.*, 2011; N'CHO *et al.*, 2011; AL-AMIN *et al.*, 2013).

Entre essas empresas encontram-se as do setor elétrico, que constantemente estão sujeitas à possibilidade de contaminação do meio ambiente com fluidos dielétricos, devido a explosões, falhas e vazamentos de transformadores de potência que, quando ocorrem, despejam os fluidos no meio ambiente (HEATHCOTE, 2011; RISTIC & MIJAILOVIC, 2012; FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Os transformadores de potência e distribuição são equipamentos de extrema importância nos sistemas de conversão e distribuição de energia elétrica. Eles utilizam fluido dielétrico para promover o isolamento elétrico entre suas partes energizadas e a refrigeração dessas partes por meio de troca de calor (VELASQUEZ *et al.*, 2011; CHATTERJEE *et al.*, 2012; RISTIC & MIJAILOVIC, 2012; CHATTERJEE *et al.*, 2013; SULEIMAN & MUHAMAD, 2014).

O fluido dielétrico mineral é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos (cadeia aberta), naftênicos (cadeia fechada), aromáticos e por compostos orgânicos contendo heteroátomos (nitrogênio, oxigênio, enxofre). No caso de falha ou vazamento do transformador, os compostos de hidrocarbonetos podem causar contaminação hídrica, da flora e fauna (BRUZZONITI *et al.*, 2012; JALBERT *et al.*, 2012; AZIS *et al.*, 2014; OKABE *et al.*, 2013; FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Visando minimizar danos ambientais em possíveis acidentes as grandes companhias mundiais do setor elétrico passaram a utilizar os ésteres naturais, obtidos a partir de óleos vegetais extraídos de sementes, como alternativa aos óleos minerais em transformadores. Estes fluidos dielétricos vegetais são provenientes de uma cultura renovável e biodegradável e seu arranjo molecular químico compreende

predominantemente os triacilgliceróis (WANG & WANG, 2012; ZHONGDONG *et al*, 2012, KANO *et al.*, 2012, AZIS, 2012; FERNÁNDEZ *et al*, 2013).

O fluido dielétrico vegetal vem substituindo o mineral não apenas por ser conhecido como fluido ecologicamente correto, existem outras vantagens que o fazem ser mais adequados, como: alto ponto de fulgor, boa rigidez dielétrica, ampliação da vida útil do equipamento, o tornando um fluido viável para o arrefecimento e isolamento elétrico de transformadores de potência, sendo tão eficaz quanto o óleo mineral isolante (LIAO *et al*, 2011; DANG *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; ABDELMALIK, 2012; LIU & WANG, 2013; ROZGA, 2013; RAMLI *et al.*, 2014).

A vida útil do transformador de potência é fortemente influenciada pela degradação do sistema de isolamento interno, especialmente pela degradação do papel *kraft* isolante. Ensaios de envelhecimento do papel *kraft* e demais componentes internos de transformadores demonstraram menor degradação com ésteres naturais isolantes em comparação com o óleo mineral isolante, aumentando assim a vida útil dos mesmos. (ZHANG *et al.*, 2011; FOFANA *et al.*, 2011; CIURIUC *et al.*, 2013; WANG & LI, 2014; HUANG *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2012). A característica não corrosiva apresentada pelo óleo vegetal é um aspecto bastante positivo, haja vista que as reações de corrosão produzem sulfeto de cobre, que tem elevada condutividade e, ao se dispersar sobre o papel isolante do transformador, reduz sua rigidez dielétrica (CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011).

Por sua vez, uma desvantagem dos óleos vegetais é que apresentam menor estabilidade à oxidação em comparação com óleos minerais (JOVALEKIC *et al*, 2011; FERNÁNDEZ *et al*, 2013, AL-AMIN *et al.*, 2013). No entanto, a mistura de diferentes óleos vegetais diminuiu os compostos de hidroxilo, aumentando a sua estabilidade à oxidação (KHAYAM *et al.*, 2012; KAMAL *et al.*, 2013).

Apesar de todos os avanços obtidos até o momento para mostrar que o fluido dielétrico vegetal possui características físico-químicas mais adequadas que o mineral e por ser recente sua introdução no setor elétrico, ainda não há parâmetros de avaliação comparativa para a toxicidade desses fluidos dielétricos. Desta forma, este trabalho tem por objetivos investigar os efeitos deletérios do fluido dielétrico vegetal e mineral, por meio de avaliação da biodegradabilidade, toxicidade aguda sob organismos biosensores, análise da toxicidade dos óleos nos atributos químicos e degradação (óleos e graxas) do solo e nas

avalições das características fitotécnicas da soja. Para a avaliação da biodegradabilidade utilizaram-se os fluidos dielétricos vegetais de crambe, soja, canola e girassol. Para os demais testes empregou-se o óleo vegetal, pois é o mais utilizado como fluido dielétrico devido ao seu baixo custo e alta eficiência. A espécie escolhida para os ensaios de toxicidade em solo contaminado com fluidos dielétricos foi a soja (*Glycine max L.*), pois é a principal cultura agrícola do país, tendo como um dos maiores estados produtores o estado do Paraná.

A apresentação da tese está dividida em cinco capítulos. No primeiro capítulo, será apresentado de forma resumida, o propósito de se estudar os efeitos da toxicidade dos fluidos dielétricos, bem como a biodegradabilidade dos mesmos, os objetivos deste trabalho e a forma como foi organizado.

No segundo capítulo, é apresentada uma revisão bibliográfica, abordando os transformadores elétricos, fluidos dielétricos para transformadores, biodegradabilidade e ecotoxicologia.

No terceiro capítulo, são apresentadas condições experimentais de cada ensaio de toxicidade e biodegradabilidade, as metodologias utilizadas para a realização do trabalho e os *softwares* utilizados para análise dos dados.

No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos, juntamente com as discussões sobre a biodegradabilidade de diferentes fluidos dielétricos vegetais em comparação com a biodegradabilidade do mineral, a toxicidade aguda a partir do ensaio com o *Danio rerio* e com a *Artemia salina* em concentrações crescentes desses fluidos e os efeitos de toxicidade dos óleos nos atributos químicos e degradação (óleos e graxas) do solo e nas avaliações das características fitotécnicas da soja.

E no quinto capítulo, são apresentadas as principais conclusões e considerações do trabalho.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.Transformadores Elétricos**

Os transformadores elétricos são um dos principais investimentos de capital em uma rede de sistema de energia e um dos principais fatores que afetam a confiabilidade do sistema. As interrupções dos transformadores devido a falhas inesperadas são catastróficas em muitos casos (CHATTERJEE *et al.*, 2013; AHMED *et al.*, 2010). Os transformadores podem ser classificados aplicando diferentes critérios: Transformadores de Distribuição; Transformadores Industriais; Transformadores Secos e Transformadores de Potência (FERNANDÉZ *et al.*, 2013). A vida útil dos transformadores está diretamente ligada à qualidade dos seus componentes isolantes, principalmente a do papel de enrolamento e do fluido isolante (LUZ JÚNIOR *et al.*, 2005). Em geral, transformadores são projetados para durar cerca de 25 anos. Porém, com técnicas de operação e manutenção adequada incluindo o recondicionamento de isolamento e filtragem em tempo apropriado, pode-se estender a vida útil de um transformador para mais de até 60 anos (CHATTERJEE *et al.*, 2013).

### **2.2.Fluidos Dielétricos para Transformadores**

A função de um fluido dielétrico em transformadores é garantir isolamento elétrico entre suas partes energizadas e a de permitir a refrigeração interna destas partes por meio da transferência de calor, substituindo ainda o possível ar existente entre aquelas partes proporcionando alta rigidez dielétrica e baixa condutividade entre si (ARANTES, 2005). Temperaturas elevadas podem danificar o isolamento, ocasionando falhas com custos elevados. A capacidade de refrigeração determina a quantidade de energia que pode ser manuseado de forma confiável por um transformador (BASHI *et al.*, 2006). Para o fluido ser considerado fluido dielétrico ele tem de cumprir uma série de requisitos operacionais, tais como: alto poder dielétrico e propriedades térmicas, baixa viscosidade, estabilidade química e térmica, alto ponto de fulgor, compatibilidade com os materiais usados na construção de transformadores e artefatos elétricos, miscibilidade com outros líquidos, ser isento de ácidos, álcalis e enxofre corrosivo, resiste à oxidação e à formação de borras, ter baixo ponto de fluidez, aceitabilidade ambiental e baixo custo (MCSHANE *et al.*, 1999; FOFANA *et al.*, 2002).

Desde o final do século XIX, óleos de várias frações do petróleo têm sido utilizados em equipamentos elétricos como transformadores, disjuntores, reatores, religadores, etc. e sempre se apresentaram como uma boa opção para estes tipos de equipamentos (HORNING *et al.*, 2004). O óleo mineral, proveniente do refino de petróleo, tem sido usado predominantemente como meio de isolamento e de resfriamento na indústria de transformador por mais de 100 anos devido as suas excelentes propriedades dielétricas e baixo custo (FOFANA *et al.*, 2002; CLAIBORNE & CHERRY, 2006; LIU *et al.*, 2009). Porém ele é incapaz de cumprir as leis ambientais por ser um óleo de baixa biodegradabilidade. Além disso, o fluido dielétrico mineral é obtido a partir de reservas de petróleo bruto, uma fonte limitada (OOMMEN, 2002).

Devido à necessidade de se obter fluidos biodegradáveis e com alto ponto de combustão, fontes alternativas ao fluido dielétrico mineral tem sido procuradas e ofertadas. Fluidos sintéticos de hidrocarbono, silicone e éster sintético foram introduzidos na segunda metade do século XX, porém, seu uso ficou concentrado aos transformadores de distribuição. Os ésteres sintéticos possuem características biodegradáveis, mas não renovável, logo não tiveram seu uso consolidado no setor elétrico brasileiro devido ao seu elevado custo (UHREN, 2007). A crescente demanda para a melhoria na segurança contra incêndios, disponibilidade de material de origem e sustentabilidade ambiental têm estimulado a pesquisa e desenvolvimento de fluidos alternativos. Nos anos 90 uma nova classe de fluidos dielétricos obtidos a partir do óleo vegetal foi desenvolvida para uso em transformadores, denominados de fluidos ecologicamente corretos, devido principalmente a sua característica biodegradável e renovável (UHREN, 2007). A indústria de transmissão de energia elétrica e distribuição mostrou interesse em utilizar os ésteres naturais, obtidos a partir de óleos vegetais extraídos de sementes, como alternativa aos óleos minerais em transformadores, pois estes fluidos preenchem todos os requisitos de um fluido dielétrico de alta temperatura, com a vantagem de serem provenientes de matérias primas renováveis (WANG & WANG, 2012; ZHONGDONG *et al.*, 2012, KANO *et al.*, 2012).

O óleo vegetal mais utilizado como fluido dielétrico é o de soja, devido ao seu baixo custo e alta eficiência, sendo capaz de substituir o óleo mineral. STOCCO (2009) avaliou o potencial de aplicação de óleo vegetal de soja como fluido dielétrico em transformadores de distribuição da rede elétrica, usando como metodologia a caracterização química e físico-química do óleo, ensaio de envelhecimento acelerado em escala laboratorial, aditivação com aditivos antioxidantes disponíveis no mercado e ensaio

elétrico de campo. Os resultados de caracterização, realizados com base na norma ABNT NBR 15422 (2015), indicaram o óleo de soja como sendo compatível com os parâmetros estipulados nesta norma. MILDEMBERGER (2014) avaliou a degradação de quatro sistemas papel/óleo dielétrico (papel *Kraft* convencional e termoestabilizado / óleo de soja e óleo mineral dielétrico) usados em transformadores de potência. Os resultados mostraram-se satisfatório para o óleo de soja testado. Os autores SILVA (2013a) e FRANCH (2010) tiveram como objetivo avaliar a compatibilidade de fluidos dielétricos vegetais de soja com materiais internos de transformadores de distribuição, como papel isolante, tinta, aço silício e elastômeros, para avaliar o efeito do material teste nas propriedades físico-químicas desses óleos. Adicionalmente, foi avaliado o fluido dielétrico mineral a título de comparação com os diferentes fluidos dielétricos vegetais de soja testados. Os materiais estudados apresentaram desempenho semelhante na presença de ambos os óleos (mineral e vegetal). Autores como ZHANG *et al.* (2010), DARWIN *et al.* (2011), ARAZOE *et al.* (2011) e N'CHO *et al.* (2011), têm comparado as principais propriedades do fluido dielétrico de soja com óleo mineral para avaliar a sua utilização como fluido dielétrico. Propriedades do óleo de soja como segurança ambiental, alto ponto de fulgor e compatibilidade com materiais internos do equipamento também foram avaliados por MCSHANE *et al.* (2006).

Também existem pesquisas e desenvolvimentos de fluido dielétrico vegetal com outras oleaginosas. ABEYSUNDARA *et al.* (2001), estudaram o óleo de coco como um fluido dielétrico em transformadores e eles demonstraram que o óleo de coco possui propriedades fluido dielétricas semelhante ao do óleo mineral podendo ser usado como fluido dielétrico em componentes de alta tensão. HAMMER *et al.* (2002) e ZOU *et al.* (2008) avaliaram as propriedades básicas dielétricas do óleo de colza. ABDULLAHI & BASHI (2004), ABDELMALIKA *et al.* (2011) e KIASATINA *et al.* (2011), estudaram a utilização do óleo de palma e os resultados experimentais demonstraram que estes óleos vegetais podem ser utilizados como fluido dielétrico.

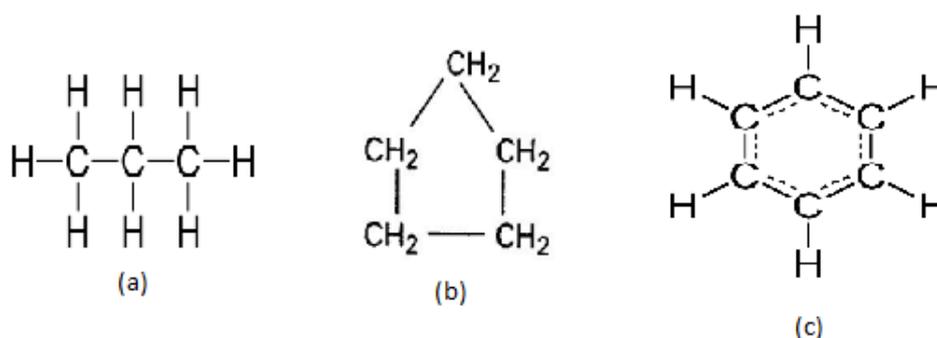
As propriedades dielétricas do óleo de canola e palma foram avaliadas e comparadas com os de óleo mineral por AL-AMMAR (2010). Os resultados mostraram que estes óleos apresentam valores de tensão de ruptura dielétrica melhor do que o do óleo mineral. Essa tensão denota a tensão elétrica que um fluido de isolamento pode suportar sem falhar. SILVA *et al.* (2012) estudaram as propriedades físico-químicas e dielétricas dos óleos de algodão, babaçu, soja, girassol e milho para uso como isolante em

transformadores. As propriedades avaliadas foram densidade, viscosidade, acidez, tensão de ruptura, fator de perda, teor de água e corrosividade. Os resultados obtidos encontram-se dentro do limite recomendado pela NBR 15422 (ABNT, 2015a).

A verificação da viabilidade técnica da aplicação de óleo vegetal de andiroba (*Carapa guianensis*) como fluido dielétrico em transformadores de distribuição de energia foi avaliada por PINTO (2014). As propriedades analisadas foram cor, fulgor, fluidez, densidade, viscosidade, acidez, fator de perda e rigidez dielétrica, índice de neutralização, teor de água, corrosividade e gases dissolvidos. Os dados encontrados foram comparados aos parâmetros estabelecidos pela NBR 15422 (ABNT, 2015a). Os resultados obtidos mostraram que o óleo vegetal estudado apresenta características físico-químicas dentro dos limites estabelecidos pela norma.

### 2.2.1. Fluido dielétrico mineral

O óleo mineral é composto de combustíveis fósseis (petróleo bruto) e é obtido por meio da destilação fracionada de petróleo em pressão atmosférica, entre as frações 300°C a 400°C. Este óleo mineral é classificado conforme os métodos de refino a que são submetidos, que podem ser purificação ácido/alcalina, extração seletiva de solventes, desparafinação, purificação por contato através de adsorventes e hidrogenação sob pressão (PUKEL *et al.*, 2009; EBERHARDT *et al.*, 2010). Este destilado é constituído por uma mistura de, em grande parte hidrocarbonetos parafínicos (Figura 2.1 (a)), naftênicos (Figura 2.1 (b)), aromáticos (Figura 2.1 (c)) e, em proporção menor, por compostos orgânicos contendo heteroátomos (nitrogênio, oxigênio, enxofre) (EBERHARDT *et al.*, 2010).



**Figura 2.1** - Ilustração esquemática dos hidrocarbonetos constituintes do óleo mineral: (a) hidrocarbonetos parafínicos, (b) naftênicos (c) aromáticos

Fonte: EBERHARDT *et al.*, 2010

Para fins de utilização como dielétrico, o óleo mineral refinado recebe aditivos antioxidantes específicos (antioxidantes fenólicos) e devem atender às especificações constantes na Resolução 36 da ANP, de 05.12.2008 (ANP, 2008), para óleo naftênico e parafínico. A Tabela 2.1 ilustra alguns dos ensaios e os valores limites contidos nesta resolução.

**Tabela 2.1 - Característica do fluido dielétrico mineral novo**

Características	Unidade	Métodos de ensaio	Valor específico	
			Naftênico	Parafínico
Aspecto visual	-	Visual	O óleo deve estar claro, límpido e isento de materiais em suspensão.	
Cor	-	ABNT NBR 14483	1,0 máx.	
Massa específica a 20 <sup>o</sup> C	kg.m <sup>-3</sup>	ABNT NBR 7148	861 - 900	860 máx.
Viscosidade cinemática				
20 <sup>o</sup> C	cSt	ABNT NBR 10441	25 máx.	
40 <sup>o</sup> C			12 máx.	
100 <sup>o</sup> C			3 máx.	
Ponto de fulgor	<sup>o</sup> C	ABNT NBR 11341	140 mín.	
Ponto de fluidez	<sup>o</sup> C	ABNT NBR 11349	-39 máx.	-12 máx.
Rigidez dielétrica				
Eletrodo de disco	kV	ABNT NBR 6869	30 mín.	
Eletrodo de calota		ABNT NBR IEC 60156	42 mín.	
Rigidez dielétrica a impulso	kV	ASTM D 3300	145 mín.	
Fator de perdas dielétricas				
25 <sup>o</sup> C	%	ABNT NBR 12133	0,05 máx.	
90 <sup>o</sup> C			0,4 máx.	
100 <sup>o</sup> C			0,5 máx.	
Enxofre corrosivo	-	ABNT NBR 10505	Não corrosivo	
Índice de neutralização	mg KOH (g óleo) <sup>-1</sup>	ABNT NBR 12248	0,03 máx.	
Teor de água	mg.kg <sup>-1</sup>	ABNT NBR 10710 B	35	
Bifenila policlorada (PCB)	mg.kg <sup>-1</sup>	ABNT NBR 13882 B	Não detectável	
Cloretos e sulfatos	-	ABNT NBR 5779	Ausente	
Tensão interfacial a 25 <sup>o</sup> C	m.N.m <sup>-1</sup>	ABNT NBR 6234	40 mín.	
Aditivo inibidor de oxidação DBPC				
Óleo não inibidor	% massa	ABNT NBR 12134 A	Não detectável	
Óleo inibidor			0,33 máx.	
Estabilidade à oxidação (óleo)		ABNT NBR 10504		

**Tabela 2.1** - Característica do fluido dielétrico mineral novo (continuação)

inibido)			0,40 máx.
Índice de neutralização	mg KOH (g óleo) <sup>-1</sup>		0,10 máx.
Borra	% massa		20 máx.
Fator de perdas dielétricas a 90 <sup>o</sup> C	%		

Fonte: Adaptado da Resolução 36 da ANP de 2008

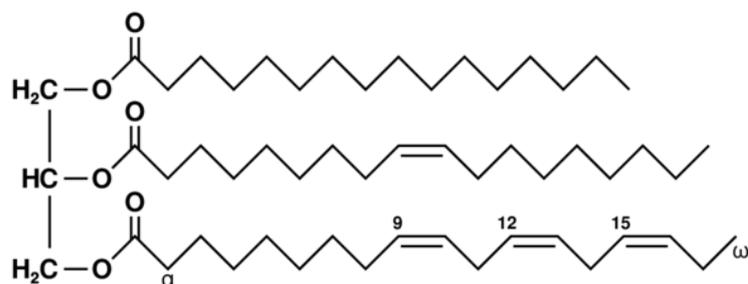
Segundo GRANATO *et al.* (2002), a maioria dos óleos minerais dielétricos encontrados no mercado possui antioxidantes sintéticos, sendo o di-terc-butil-p-cresol (DBPC), o mais comumente utilizado. Devido aos avanços das técnicas de refino e aos novos projetos para os equipamentos em que são utilizados, o desempenho destes materiais foi melhorado ao longo dos anos (MILASCH, 1998). A tecnologia petrolífera é uma das mais avançadas do mundo, o que garante uma evolução contínua da qualidade de seus derivados (VARTANIAN, 1991). O tempo de utilização (vida útil) do fluido dielétrico mineral depende principalmente de dois fatores: da sua qualidade inicial (óleo novo) e as condições de uso, ou seja, o nível de carga assumido pelo transformador (HUANG *et al.*, 2014).

### 2.2.2. Fluido dielétrico vegetal

Os óleos vegetais são obtidos a partir dos grãos, por processos de descortificação, descascamento, trituração, laminação, cozimento, prensagem mecânica ou extração por solvente. Ao final deste processo, tem-se o óleo bruto que possui uma cor escura e contém constituintes sólidos, tais como proteínas e fibras. O procedimento para refinar o óleo vegetal bruto é composto por diferentes etapas: degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização (LI *et al.*, 2006).

O óleo vegetal é formado por moléculas de acilgliceróis, originárias da condensação entre ácidos graxos e o glicerol (triálcool), formando ésteres de ácidos graxos. Os compostos são classificados em mono, di ou triacilgliceróis, dependendo se uma duas ou três moléculas de ácido graxo se associa(m) covalentemente ao glicerol, respectivamente, formando ésteres de ácido graxo. Os triacilgliceróis podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si, dependendo da origem da matéria prima, saturados ou insaturados (PENA *et al.*, 2011). O triacilglicerol é um éster (Figura 2.2), proveniente da reação de condensação entre as três hidroxilas do glicerol com ácidos graxos (MORETTO & FETT, 1998). Trata-se de uma molécula com uma fração polar

(éster) e outra apolar (cadeia hidrocarbônica ou unidades acila). Ou seja, a composição química do óleo vegetal é diferente da composição química do óleo mineral.



**Figura 2.2** - Ilustração esquemática de um triacilglicerol, componente do óleo vegetal

Fonte: PENA *et al.*, 2011.

Para que o óleo vegetal refinado seja considerado como fluido dielétrico, devem ser adicionados antioxidantes específicos (antioxidantes fenólicos) e alguns ensaios se fazem necessários para garantir a qualidade do produto, possibilitando uma maior estabilidade no interior de um equipamento elétrico. A norma que regulariza esses ensaios é denominada NBR 15422 - “Óleo Vegetal Dielétrico para Equipamentos Elétricos” (ABNT, 2015a).

A Tabela 2.2 ilustra alguns dos ensaios e os valores limites contidos nesta norma.

**Tabela 2.2** - Característica do fluido dielétrico vegetal novo

Características	Unidade	Métodos de ensaio	Valor específico
Aspecto visual	-	Visual	O óleo deve estar claro, límpido e isento de materiais em suspensão.
Cor	-	ABNT NBR 14483	1,0 máx.
Densidade relativa a 20/4 <sup>o</sup> C	-	ABNT NBR 7148	0,96 máx.
Viscosidade cinemática 20 <sup>o</sup> C 40 <sup>o</sup> C 100 <sup>o</sup> C	cSt	ABNT NBR 10441	150 máx. 50 máx. 15 máx.
Ponto de fulgor	<sup>o</sup> C	ABNT NBR 11341	275 mín.
Ponto de combustão	<sup>o</sup> C	ABNT NBR 11341	300 mín.
Ponto de fluidez/névoa	<sup>o</sup> C	ABNT NBR 11349	-10 máx.
Rigidez dielétrica Eletrodo de disco Eletrodo de calota	kV	ABNT NBR 6869 ABNT NBR IEC 60156	30 mín. 42 mín.
Rigidez dielétrica a impulso	kV	ASTM D 3300	130 mín.
Fator de perdas dielétricas	%	ABNT NBR 12133	

**Tabela 2.2** - - Característica do fluido dielétrico vegetal novo (continuação)

25 <sup>0</sup> C			0,20 máx.
90 <sup>0</sup> C			3,6 máx.
100 <sup>0</sup> C			4,0 máx.
Enxofre corrosivo	-	ABNT NBR 10505	Não corrosivo
Índice de neutralização	mg KOH (g óleo) <sup>-1</sup>	ABNT NBR 14248	0,06 máx.
Teor de água	mg.kg <sup>-1</sup>	ABNT NBR 10710 B	200
Bifenila policlorada (PCB)	mg.kg <sup>-1</sup>	ABNT NBR 13882	Não detectável

Fonte: adaptado da ABNT, 2015a - NBR 15422

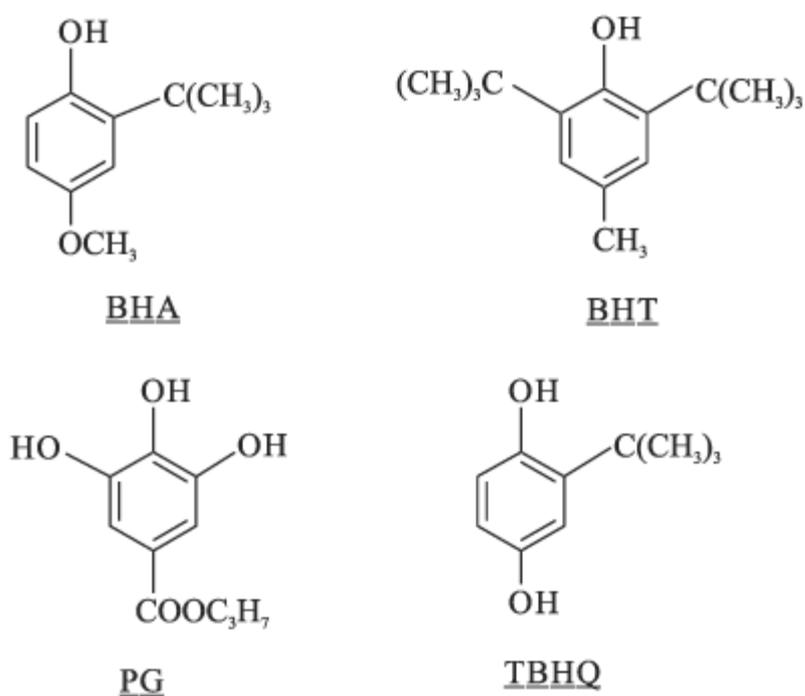
O óleo vegetal dielétrico é o resultado de um enorme esforço de investigação que foi iniciado em meados de 1990 para desenvolver um fluido dielétrico totalmente biodegradável. Devido ao baixo custo e alta eficiência o óleo vegetal mais utilizado é o de soja, porém existem estudos com outras oleaginosas. Este provou ser capaz de substituir o óleo mineral, ésteres sintéticos e óleos de silicone. Os resultados incentivaram o desenvolvimento de um óleo comercial chamado Envirotemp FR3, que foi o primeiro óleo vegetal para transformador comercializado (MCSHANE *et al.*, 2006). No Estado do Paraná, a Companhia Paranaense de Energia – COPEL - iniciou a utilização de óleo vegetal dielétrico a base soja em 2004, substituindo o óleo mineral de alguns disjuntores e transformadores de distribuição, na classe de tensão 13,8 kV e 34,5 kV (GOMES JR, 2010). Com base em dados obtidos a partir de ensaios laboratoriais e de campo o óleo vegetal pode ser incorporado com sucesso em sistemas de isolamento de transformadores (MCSHANE, 2002).

### 2.2.3. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação em lipídios ou em outras moléculas, evitando o início ou bloqueando a propagação das reações de oxidação. Podem ser classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigênio singlete, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes contendo um grupamento fenólico sintético são utilizados na aditivagem dos fluidos dielétricos e denominam-se antioxidantes primários (ASSIS, 2014).

Os antioxidantes primários são substâncias fenólicas sintéticas que atuam como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto

na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Agem através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo desta forma a reação em cadeia. A eficácia dos antioxidantes fenólicos está ligada à presença de grupos volumosos na molécula de fenol pelo seu efeito estérico e estabilizante nas estruturas de ressonância dos radicais (RAVELLI, 2011). Os mais conhecidos deste grupo são os polifenóis, como butil-hidroxianisol (BHA), di-terc-butil-p-cresol (DBPC), também chamado de butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) (Figura 2.3). A estrutura destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre regenerando a molécula lipídica interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres, fazendo com que os antioxidantes se transformem em radicais livres. Estes radicais se estabilizam sem promover ou propagar as reações de oxidação (CRUZ, 2014).



**Figura 2.3** - Antioxidantes sintéticos

(Fonte: Ramalho; Jorge, 2006)

Ao fluido dielétrico mineral é adicionado inibidor sintético como o di-terc-butil-p-cresol (DBPC), em teores que podem chegar a no máximo 0,33% (m/m), de acordo com a Resolução 36 da ANP, de 05/12/2008 (ANP, 2008). Estes inibidores de oxidação auxiliam a estender a vida útil dos óleos minerais sem interferir nas características dielétricas. O DBPC não reage em condições ambientes com ácidos, aldeídos, glicóis ou ésteres e tem

alto grau de estabilidade quando exposto a luz, calor e ar, e a ação de radicais livres, sendo, portanto antioxidante eficaz. O TBHQ é utilizado principalmente como antioxidante para os fluidos dielétricos vegetais e tem como vantagem não se complexar com íons de cobre e ferro, como o galato. É considerado resistente ao calor, proporcionando uma excelente estabilidade para os produtos em que é utilizado (GALVAN et al., 2014).

#### **2.2.4. Impactos ambientais do fluido dielétrico vegetal e mineral**

Os transformadores são considerados pelas companhias de energia elétrica como os equipamentos mais críticos, devido a grande quantidade de óleo e elementos submetidos a altas tensões elétricas. Explosões ou incêndios podem ocorrer nas redes de abastecimento e, com isso, gerar repercussões consideráveis, tanto para as companhias de energia elétrica como para a comunidade em geral (SULEIMAN & MUHAMAD, 2014). O número de ocorrências de furto de transformadores e religadores na área rural têm aumentado de forma considerável, o objeto de interesse do furto são as bobinas do núcleo do equipamento, sendo confeccionado com o metal cobre, material muito valorizado no mercado de reciclagem. No entanto, durante a ocorrência, algumas vezes o fluido dielétrico que se encontra no interior do equipamento é derramado no chão no próprio local da ocorrência do furto podendo alterar as propriedades físicas das águas superficiais, subterrâneas e do solo, impossibilitando a sua aeração (SANTOS, 2013).

Do ponto de vista ambiental, no caso de acidentes como incêndios, vazamentos ou derramamentos, o fluido dielétrico mineral pode trazer impactos ambientais significativos e, conseqüentemente, consideráveis impactos econômicos para as empresas usuárias desse fluido (IMAD-U-KHAN *et al.*, 2007). Os impactos ambientais oriundos desses acidentes podem ser refletidos no solo, no ar e nos recursos hídricos superficiais e subterrâneos do local impactado e de seus arredores. As agências regulatórias ambientais do governo impõem altas penalidades às empresas quando da notificação de acidentes desta natureza. Além deste desembolso financeiro, as empresas precisam adotar medidas para remediar os sistemas impactados, que geralmente, são baseadas em processos bastante onerosos (WILHELM *et al.*, 2009).

Existem vários sistemas para a remediação de áreas impactadas por petróleo ou derivados do petróleo. Contudo, o tratamento a ser adotado deve considerar as condições singulares e intrínsecas da área contaminada. Além disso, é necessário atender à legislação

ambiental vigente e ponderar o custo e benefício do processo de tratamento escolhido, muitas vezes a associação de diversas tecnologias de tratamento faz-se necessária, resultando em processos caros e demorados, principalmente, pela complexidade das instalações (TRIGUEROS, 2008; FURTADO, 2006). A remediação de áreas degradadas, tais como solos e corpos de água, exigem a adoção de tecnologias para remover a poluição e minimizar o impacto ambiental de compostos tóxicos liberados nas áreas contaminadas (TRIGUEROS *et al.*, 2010). Algumas alternativas de remediação são baseadas em tecnologias como: bombeamento e tratamento (*pump-and-treat*), aeração *in situ* (*air sparging*), lavagem de solo e reinjeção (recarga artificial); barreiras de contenção física pouco permeável, biorremediação *in situ*, processos de oxidação química, processos térmicos, barreiras físicas permeáveis, processo de encapsulamento e solidificação, dentre outros (SANTOS, 2013; TRIGUEROS, 2008; FURTADO, 2006; NOBRE & NOBRE, 2003; RISER-ROBERTS, 1998).

Incentivado por questões ambientais, na década de noventa, empresas realizaram muitas pesquisas no intuito de desenvolver um fluido dielétrico vegetal apropriado para uso em equipamentos elétricos que diminuíssem os impactos ambientais no caso de acidentes como incêndios, vazamentos ou derramamentos. Os óleos vegetais são produtos naturais, provenientes de fontes renováveis. São considerados renováveis porque o gás carbônico (CO<sub>2</sub>) liberado na sua combustão ou degradação é reciclado por absorção durante o próprio crescimento das oleaginosas no processo conhecido como fotossíntese (FRANCH, 2010). O fluido dielétrico vegetal apresenta alto ponto de combustão, tornando-os menos inflamáveis que o fluido dielétrico mineral e contribuindo para a redução do risco a incêndios. As principais vantagens da utilização deste tipo de fluido é o baixo custo para a instalação e manutenção, menor risco de incêndio, baixa densidade e a sua biodegradabilidade (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Por ser biodegradável, o fluido dielétrico vegetal é facilmente degradado pelos microrganismos no meio ambiente (WILHELM *et al.*, 2009), enquanto que os óleos minerais são mais resistentes à biodegradação (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013). A formulação dos óleos vegetais não possui nenhuma toxicidade humana e a sua taxa de biodegradação é maior do que o de óleo mineral (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Assim, é esperado que o processo de remediação dos sistemas impactados com estes fluidos seja mais simples e mais barato em relação ao do fluido dielétrico mineral (CLAIBORNE & CHERRY, 2006).

### **2.3. Biodegradação**

O termo degradação refere-se ao processo através do qual uma substância química de estrutura complexa é convertida em moléculas mais simples. A degradação é considerada um processo chave na atenuação natural de contaminantes, devido a sua capacidade de reduzir a massa dos contaminantes e, transformar os contaminantes tóxicos em subprodutos não tóxicos, minimizando os riscos à saúde pública e ao meio ambiente, englobando degradação abiótica e degradação biótica (TRIGUEROS, 2008). A degradação abiótica para compostos orgânicos se dá através de transformações químicas como: hidrólise, fotólise e dissociação. Para compostos inorgânicos os mecanismos que se destacam são a complexação, oxidação/redução e polimerização. A degradação biótica ou biodegradação ocorre através da ação de microrganismos presentes no ambiente, os quais utilizam tais substâncias diretamente como substrato, a fim de obter a energia necessária ao crescimento e metabolismo. A degradação de compostos xenobióticos por microrganismos pode ser aeróbia, com o uso de oxigênio como aceptor de elétrons, produzindo gás carbônico e água, ou anaeróbia, tendo como substratos eletrofílicos sulfatos e nitratos, produzindo metano e água. Normalmente, os processos aeróbicos são mais rápidos, devido ao predomínio de microrganismos aeróbios com crescimento acelerado (BURATINI, 2008; TRIGUEROS, 2008).

A biodegradação de contaminantes orgânicos ocorre inicialmente por processos aeróbios, onde as populações nativas de microrganismos, capazes de biodegradar esses contaminantes, encontram-se num ambiente com oxigênio disponível (FERNANDES, 2002). Esse processo é caracterizado pela oxidação de um composto orgânico, por uma população de microrganismos, levando à formação de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, resíduos solúveis não biodegradáveis e novas células resultantes do crescimento de microrganismos. Por meio desta oxidação os microrganismos usam os compostos orgânicos como fonte de energia e de crescimento, através da assimilação de parte do carbono do substrato para a produção de novas células (FERRO, 2013).

Já os microrganismos anaeróbios começam a se sobressair nas atividades de biodegradação, utilizando como receptores de elétrons o nitrato, o íon férrico, o sulfato e o dióxido de carbono com menores transferências de energia, respectivamente (CHAPELLE, 2001). O processo baseia-se na hidrólise de partículas complexas, com vista a tornar polímeros orgânicos insolúveis (proteínas, lípidos e hidratos de carbono), de estrutura

química mais complexa, em monómeros (aminoácidos, ácidos gordos e açúcares), que ficarão disponíveis para outras bactérias. Deste processo resultam CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> e uma quantidade reduzida de células bacterianas (MATSINHE, 2011).

De acordo com EPIFÂNIO (2003), a avaliação da biodegradabilidade e da toxicidade são parâmetros que determinam o comportamento das substâncias orgânicas no ambiente natural e nos sistemas de tratamento podendo ser divididas em: 1 - Substâncias biologicamente degradáveis e não tóxicas; 2- Substâncias biologicamente degradáveis e tóxicas; 3 - Substâncias não degradáveis biologicamente e não tóxicas e; 4 - Substâncias não degradáveis biologicamente e tóxicas.

Para os compostos do primeiro grupo não existe qualquer objeção ao seu tratamento biológico. Para os pertencentes ao segundo grupo há a possibilidade de tratamento em sistemas de tratamento biológico, após uma diluição adequada. Todavia, o tratamento de compostos do terceiro, e em especial do quarto grupo, poderá ser limitado ou tornar-se praticamente impossível.

### **2.3.1. Fatores que influenciam o processo de biodegradação**

Muitos contaminantes podem ser metabolizados por microrganismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. Em relação aos hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, muitas áreas contaminadas possuem uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias, certamente, não é metabolizada na mesma velocidade. A velocidade da biodegradação depende do tipo de microrganismos, fatores nutricionais, concentração, participação de catalisadores, condições do ambiente como temperatura, pH, potencial osmótico, aeração e presença de luz (ANDRADE *et al.*, 2010).

Ainda segundo o autor, a velocidade de degradação é comumente depende da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas *on-site* pelos micro-organismos. Logo, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de micro-organismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante.

Segundo FERRO (2013), o processo de biodegradação é mais eficiente, quanto melhor adaptada estiver uma determinada cultura de microrganismos, isto é, quanto maior for o seu crescimento. Entretanto, o crescimento microbiano é influenciado pelas

condições ambientais em que ocorre o processo, cujas características podem ser muito variáveis. A biodegradabilidade pode ser influenciada por três tipos de fatores: físicos, químicos e biológicos.

Os fatores físicos são a temperatura, a solubilidade, o grau de dispersão do composto no meio, o pH e o oxigênio dissolvido. Os fatores químicos que podem influenciar na biodegradação de compostos são tamanhos das moléculas, a estequiometria e o número de substitutos na molécula, que ao contribuírem para as propriedades estruturais do composto a degradar, limitam a extensão e a eficiência do processo de biodegradação. Os fatores biológicos incluem as características da cultura microbiana e a presença de nutrientes ou de substâncias inibidoras da atividade microbiológica (metais, sais, substâncias orgânicas) (EPIFÂNIO, 2003; FERRO, 2013).

### **2.3.2. Métodos de avaliação da biodegradabilidade**

Os testes de biodegradabilidade têm como objetivo avaliar a extensão da oxidação bioquímica dos compostos orgânicos. Estes testes podem ser usados para otimizar o processo industrial, na medida em que permitem determinar se o produto fabricado ou os resíduos gerados durante o processo industrial podem ser degradados, eficientemente, em sistemas de tratamento biológico. (FERRO, 2013). Com o objetivo de prever o comportamento e o impacto ambiental de novas substâncias químicas, foram estabelecidos métodos padronizados para avaliar sua biodegradabilidade. Neste sentido, agências nacionais e internacionais como International Organization for Standardization (ISO), Japanese Ministry of International Trade and Industry (MITI), United States Environmental Protection Agency (USEPA), American Society for Testing and Materials (ASTM) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) atuam no desenvolvimento e/ou revisão de tais metodologias, as quais são incorporadas às legislações para posterior utilização em ações regulatórias (BURATINI, 2008).

Os testes de biodegradabilidade se enquadram em um sistema também conhecido como “hierarquia OECD” constituído por três níveis: testes de biodegradabilidade imediata, testes de biodegradabilidade inerente e testes de simulação. Os testes mais usados do ponto de vista prático são os de biodegradabilidade imediata. Estes são testes mais restritivos, oferecendo limitadas oportunidades para a biodegradação e aclimação do inóculo (BURATINI, 2008; FERRO, 2013).

A biodegradabilidade imediata é a propriedade de uma substância orgânica de ser metabolizada, isto é, oxidada por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente. Dois critérios mínimos são estabelecidos pela OECD 301 (1992) para que um teste seja considerado de biodegradabilidade imediata. São estes: (a) emprego de inóculo não adaptado; (b) nível de remoção de carbono orgânico dissolvido (COD) maior que 70% ou produção de CO<sub>2</sub> maior que 60% do valor teórico, ou ainda, consumo de oxigênio maior que 60%, em tempos de, no máximo, 10 dias (OECD 301, 1992). A norma descreve seis métodos que permitem avaliar a biodegradabilidade imediata, são eles:

- 301 A: DOC Die-Away: Teste em meio aquoso, aeróbio e estático, em condições padrão. Medição da remoção de carbono orgânico dissolvido (COD). Avaliação do teste através dos resultados das concentrações iniciais e finais de COD.

- 301 B: CO<sub>2</sub> Evolution (Modified Sturm Test): Teste em meio aquoso, aeróbio e estático, em condições padrão. Medição do CO<sub>2</sub> produzido biologicamente. Avaliação do teste através dos resultados de CO<sub>2</sub> e o valor teórico (ThCO<sub>2</sub>).

- 301 C: MITI (I) (Ministry of International Trade and Industry, Japan): Versão deste teste, para utilização no Japão (MITI-test I). Utilização de um inóculo especialmente preparado. Requisição obrigatória de análises específicas.

- 301 D: Closed Bottle: Teste em meio aquoso, aeróbio e estático, em condições padrão. Medição da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em garrafas fechadas e completamente cheias. Fornecimento de O<sub>2</sub> a partir do meio de teste e utilização de baixas concentrações de inóculo. Avaliação do teste através dos resultados de DBO e o valor teórico (ThOD) ou a carência química de oxigênio (COD).

- 301 E: Modified OECD Screening: Teste em meio aquoso, aeróbio e estático, em condições padrão, mas com um inóculo com baixa concentração de bactérias. Medição da remoção de carbono orgânico dissolvido (COD). Avaliação do teste através dos resultados das concentrações iniciais e finais de COD.

- 301 F: Manometric Respirometry: Teste em meio aquoso, aeróbio e estático, em condições padrão. Medição da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) num sistema fechado. Avaliação do teste através dos resultados de DBO e o valor teórico (ThOD).

A biodegradabilidade inerente é avaliada pela norma OECD 302B (1992) e 302C (1992) através da conversão de carbono em dióxido de carbono, com utilização de um inóculo específico (lamas ativadas) e onde as concentrações de material de teste são

elevadas. Este teste é utilizado para a determinação da biodegradabilidade de uma solução considerada não facilmente biodegradável. Muitas vezes o teste é usado para materiais que não satisfaçam os requisitos da OECD 301 (1992). Os métodos mais empregados para a determinação de biodegradabilidade inerente são:

- OECD 302B: Zahn-Wellens-Test: Teste em meio aquoso, aeróbio e estático, em condições padrão, mas com elevadas concentrações de material de teste e lamas activadas. Medição da remoção de carbono orgânico dissolvido (COD). Avaliação do teste através dos resultados das concentrações iniciais e finais de COD. Dificuldade em diferenciar entre biodegradação e eliminação abiótica (OECD 302B, 1992)

- OECD 302C: Modified MITI Test (II): Versão do teste respirométrico, para utilização no Japão. Utilização de um inóculo especialmente preparado e em concentrações que melhoram o potencial de biodegradação. Requisição obrigatória de análises específicas. No caso da norma OECD 302 C o tempo de ensaio é mais restrito (7 a 14 dias), limitando por isso o valor-limite de biodegradação do material a 40% em 7 dias ou 65% em 14 dias (OECD 302C, 1992)

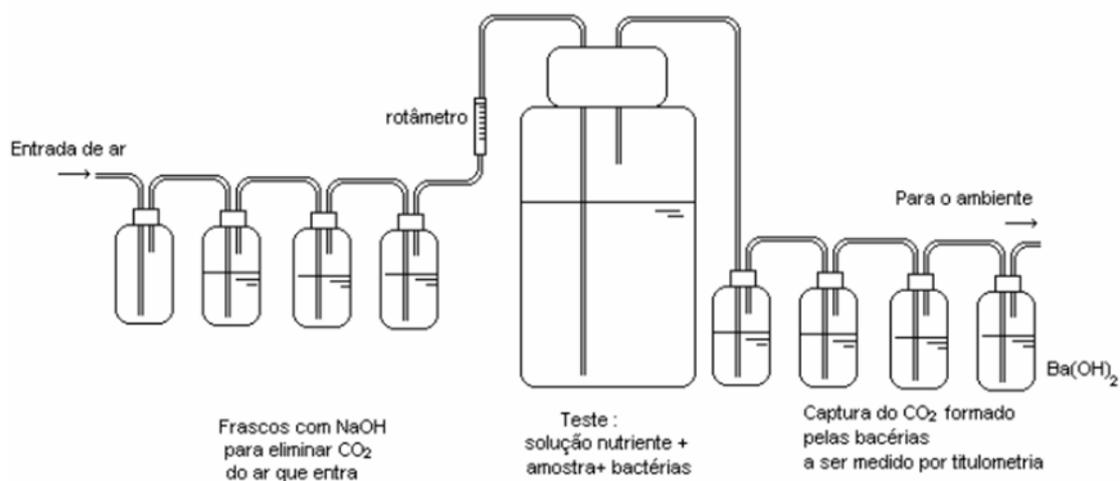
Os testes de simulação são utilizados para obter informações sobre a extensão da biodegradação em condições similares às encontradas no ambiente, pode ser feito testes de campo ou monitoramento ambiental (FERRO, 2013).

Embora os objetivos, condições e princípios de cada teste possam orientar na escolha da metodologia a ser adotada, a diversidade de testes existentes para avaliação da biodegradabilidade possibilita a liberdade quando a seleção do método a ser usado. Assim, torna-se apenas necessário que se proceda à realização de testes de acordo com as normas de qualidade e boas práticas laboratoriais, que se atinja o limite de degradação estabelecido e que a avaliação dos resultados comprove a biodegradabilidade do produto testado. A garantia da reprodutibilidade dos resultados e da validade dos testes é, portanto, condição necessária (FERRO, 2013).

### **2.3.3. Fundamento do teste de biodegradabilidade imediata: Método OECD 301 B: CO<sub>2</sub> Evolution Test**

No teste de biodegradabilidade imediata segundo a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 301 B, 1992), uma substância orgânica é exposta à metabolização por cultura de microrganismos oriundos do meio ambiente. Tal substância é

fornecida como única fonte de carbono e energia, numa solução nutriente mineral definida. Através do metabolismo dos microrganismos, esta fonte de carbono é consumida, transformando-se em gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e água. A partir do teor de carbono inicial do material teste pode-se prever o total de  $\text{CO}_2$  teoricamente esperado para a completa oxidação do conteúdo de carbono do material em teste. Para a realização do teste, uma massa conhecida do material teste é colocada em um frasco estéril contendo solução nutriente. Inocula-se esse frasco com uma concentração padronizada de microrganismos de, no mínimo,  $10^5$  colônias por mL, oriundos de lamas ativadas, efluentes de esgoto, águas ou a partir de uma mistura destes. Na entrada do sistema monta-se um sistema de purificação do ar com frascos plásticos (não podem ser de vidro devido ao ataque do NaOH concentrado), contendo cada um NaOH a 10 M para eliminar a presença de  $\text{CO}_2$ . Estes frascos são interligados, em linha, através de tubos plásticos apropriados. A extremidade inicial é ligada a um frasco cheio de lã de vidro, seca (para filtragem), o qual é ligado à fonte de ar comprimido. A outra extremidade é ligada a um sistema de distribuição do ar, com tantas saídas quantos forem os frascos de ensaio a serem aerados. Na saída do sistema, que deve ser livre de vazamentos, faz-se a coleta e medida do  $\text{CO}_2$  produzido ao longo do tempo. As medidas do  $\text{CO}_2$  formado podem ser realizadas por titulometria, bem como por analisador de gases por infravermelho ou cromatografia de fase gasosa (Figura 2.4).



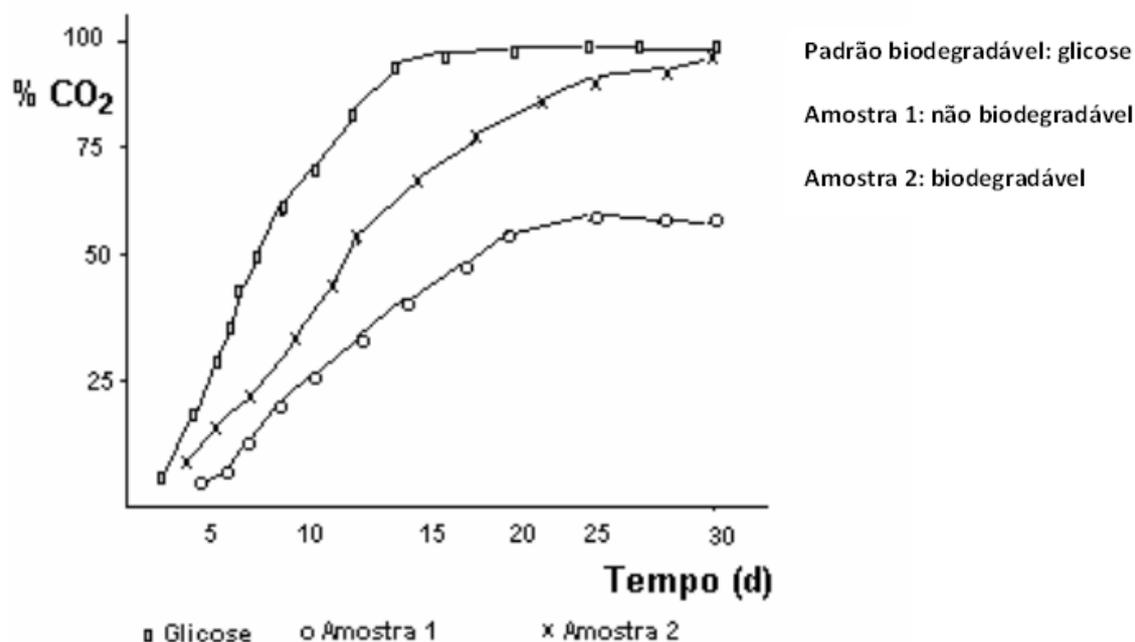
**Figura 2.4** - Desenho esquemático do teste de biodegradabilidade pela medida do  $\text{CO}_2$

Fonte: SALAZAR, 2005

O teste deve ser conduzido no escuro, à temperatura de 20 a 25<sup>0</sup>C durante 28 dias. São realizados controles simultaneamente à avaliação da amostra, descritos abaixo:

- a) Branco: solução nutriente e inóculo
- b) Padrão biodegradável ou controle positivo: solução nutriente, inóculo e uma substância padrão que é reconhecidamente biodegradável (glicose, ácido benzóico, anilina, etc.).
- c) Substância teste: solução nutriente, inóculo e a substância ou material a ser testado.
- d) Inibição para a substância teste ou controle negativo: solução nutriente, inóculo, padrão biodegradável e a substância teste. O controle negativo tem o objetivo de verificar a existência ou não de efeito inibitório da amostra em estudo sobre a biodegradação da do padrão escolhido.

Ao final do teste, avalia-se a porcentagem de CO<sub>2</sub> desprendida comparando-a aos valores teóricos previstos (Figura 2.5). Será considerada “facilmente biodegradável” aquela substância cuja porcentagem de CO<sub>2</sub> desprendido atingir no mínimo 60% em 10 dias contados a partir do momento em que se observou 10% de evolução de CO<sub>2</sub>, e não excedendo o período máximo de 14 dias.



**Figura 2.5** - Forma de apresentação dos resultados do teste de biodegradabilidade.

Fonte: SALAZAR, 2005

## **2.4.Ecotoxicologia**

A ecotoxicologia é a área da toxicologia que relaciona os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre indivíduos, populações e comunidades de organismos, além de se conhecer como pode afetar o homem, podendo a resposta ser aguda ou crônica. Trata de movimentos de poluentes no ar, água, solos, e sedimentos através da cadeia alimentar, com as transformações químicas e biotransformação. É uma ferramenta auxiliar nas análises de impactos ambientais causados por tais elementos, estimando assim sua toxicidade em relação ao organismo teste utilizado (WALKER *et al.*, 2006). A análise ecotoxicológica tem a capacidade de fornecer dados quantitativos e qualitativos dos efeitos nocivos das substâncias químicas isoladas ou em forma de misturas sobre sistemas biológicos. Logo, a utilização dos testes de toxicidade torna-se cada dia mais importante para o conhecimento global da área de estudo, pois informa a respeito da extensão da poluição, da deterioração ou da melhoria gerada fornecendo subsídios necessários para que os institutos ambientais, indústrias ou outros que estejam ligados diretamente à preservação dos recursos hídricos e do meio ambiente, tomem decisões fundamentadas e objetivas na avaliação quanto ao uso e preservação desses recursos naturais. (KNIE & LOPES, 2004; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; DEZOTTI, 2008; COSTA *et al.*, 2008; MACHADO, 2011; WANDERLEY, 2013; SILVA, 2013b).

### **2.4.1. Potencial tóxico dos fluidos dielétricos**

O fluido dielétrico vegetal é conhecido como fluido ecologicamente correto devido principalmente a sua característica biodegradável e renovável, sendo facilmente degradado pelos microrganismos presente no meio. Em função disto, são utilizados onde a proteção ambiental é requerida. Apresentam alto ponto de combustão, o que os torna menos inflamáveis em comparação ao óleo mineral, aumentando a segurança ao incêndio, contribuindo, conseqüentemente, para a redução da poluição do ar (CLAIBORNE e CHERRY, 2006).

O óleo mineral em geral é bastante nocivo ao meio ambiente (água, ar, solo). Em caso de falhas relativas a curto circuito ou vazamentos em transformadores, os compostos de hidrocarbonetos contidos no solo contaminado, podem migrar, com a infiltração da água de chuva, da superfície para a primeira camada do lençol freático. No caso de contaminação em água, tem-se que 1 kg de óleo mineral, que tenha vazado de um

transformador para um reservatório, torna 5 milhões de litros de água impróprios para consumo, sendo os custos, para tratar seus efeitos, bastante altos. Os produtos da combustão do óleo mineral, provenientes de sua ignição, devido a um curto circuito, por exemplo, são considerados perigosos e causam uma grande poluição do ar, onde 1000 kg de óleo mineral queimado emitem cerca de 10 kg de substâncias nocivas na atmosfera. Portanto os cuidados a serem tomados na manutenção destes equipamentos, prevenindo vazamentos e falhas devem ser grandes, para que os efeitos de um acidente possam ser minimizados (ROZGA, 2013).

#### **2.4.2. Toxicológicos com organismos aquáticos**

O teste de toxicidade aquática é uma ferramenta para o estudo dos efeitos dos agentes tóxicos sobre organismos aquáticos e está fundamentado no princípio de que a resposta dos organismos vivos depende da dose do tóxico a que foram submetidos (JARDIM, 2004). Os ensaios de toxicidade podem refletir o sinergismo de todas as substâncias geradas num sistema, mostrando que as características isoladas de um elemento químico não podem garantir a preservação e manutenção da biota aquática, uma vez que os mecanismos e processos do sistema são diferenciados no tempo e no espaço (RODGHER, 2003).

Para a realização desses ensaios utilizam-se organismos conhecidos como bioindicadores. Este termo é utilizado para indicar os membros da fauna e da flora de um habitat que possui seu grau de tolerância reduzido e específico quando exposto a um fator ambiental, apresentando uma resposta clara diante de pequenas variações na qualidade do ambiente. Dentre esses organismos podem-se destacar algas, microcrustáceos e peixes, entre outros. Muitas pesquisas foram realizadas com diferentes espécies de vegetais e animais, a fim de indicar os organismos que fossem mais representativos de cada ecossistema, pois, cada espécie possui uma sensibilidade diferente. A partir da diversidade de organismos pesquisados nos anos 50 e 60, alguns foram normatizados e são hoje utilizados nos laboratórios de diversos países. A escolha de tais bioensaios deve ser feita através de alguns critérios como fácil manuseio e disponibilidade, sua importância na cadeia alimentar, representatividade do ecossistema em estudos e sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, de maneira a possibilitar a obtenção de resultados

precisos, exatos e reprodutivos (KNIE & LOPES, 2004; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; MACHADO, 2011; WANDERLEY, 2013; SILVA, 2013b).

Hoje em dia, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Works Association (AWWA), International Organization for Standardization (ISO), Standard Methods (APHA), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Environmental Canada, Environmental Aquatic Assesment e United States Environmental Protection Agency (USEPA). Os métodos padronizados apresentam a vantagem de poderem ser utilizados por diferentes laboratórios, permitindo que os resultados obtidos sejam comparados entre si (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; KLEINE, 2013).

### **2.4.3. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos**

#### **2.4.3.1. Toxicidade aguda**

Os ensaios de toxicidade aguda são desenvolvidos para determinar a toxicidade relativa de uma substância sobre um organismo aquático selecionado, exposto a várias concentrações desta substância, em um curto período de tempo. O tempo de exposição pode compreender de minutos (como o caso da bactéria *Vibrio fischeri*) a 96 horas. Os testes apresentam algumas vantagens como facilidade na interpretação, são rápidos e fáceis de executar, possuem curta duração e baixo custo. Como desvantagem tem-se o fato de que estes ensaios avaliam os efeitos quantitativos, não evidenciando efeitos que poderiam ocorrer em tempos mais prolongados de exposição, tais como o de bioacumulação, efeitos sobre a reprodução e o crescimento (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; CUNHA, 2014)

Os efeitos avaliados são, por exemplo, mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, no caso de invertebrados; e taxa de luminescência, no caso de *Vibrio fischeri*. O resultado é expresso em Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) ou a Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>), ou seja, concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos teste após determinado tempo de exposição. O objetivo deste ensaio é determinar a concentração do material (substância química ou

efluente) que produz um efeito deletério na população exposta durante um curto período de tempo sob condições controladas (COSTA *et al.*, 2008; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; CUNHA, 2014).

Os valores de toxicidade aguda para os organismos aquáticos podem ser classificados de acordo com a escala de classificação de toxicidade aguda fornecida por ZUCKER (1985), a fim de classificar as substâncias quanto ao seu potencial tóxico (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3 - Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos**

Classe de toxicidade	CL <sub>50</sub> ou CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
Extremamente tóxico	< 0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	> 1,0 a < 10
Ligeiramente tóxico	> 10 a < 100
Praticamente não-tóxico	> 100

Fonte: adaptado de ZUCKER, 1985

#### 2.4.3.2. Toxicidade crônica

Em ambientes aquáticos a ocorrência dos efeitos crônicos é mais frequente, devido à diluição pontual e dispersa dos xenobióticos oriundos das águas de contribuição, a rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica e a sedimentação de sólidos em suspensão. Dessa forma, os organismos são expostos a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo ocasionando efeitos crônicos a níveis subletais e até mesmo letais ao longo do tempo. Logo, ensaios de toxicidade crônica são usados para determinar o efeito adverso da concentração da substância em organismos testes, a partir da exposição prolongada (SILVA, 2013b).

A toxicidade crônica é interpretada pela resposta a um estímulo contínuo, geralmente por períodos que podem abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles. Testes de toxicidade crônica tem como vantagem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas

funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras. As desvantagens do teste é a sua longa duração e o alto custo. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como CENO (Concentração de Efeito não Observado) ou CEO (Concentração de Efeito Observado), mas também podem ser expressos como CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva Média) (COSTA *et al.*, 2008; WANDERLEY, 2013; COUTO, 2014).

#### **2.4.4. Sistemas de Exposição**

Os testes de toxicidade, quando realizados em laboratórios, podem ainda ser classificados em sistema estático, sistema semi estáticos e sistema de fluxo contínuo, de acordo com o método de adição das soluções-teste (KNIE & LOPES, 2004). Os ensaios estáticos são realizados sem renovação das soluções-testes e são recomendados para amostras que não causam depleção de oxigênio dissolvido, que não são voláteis e que não sofrem significativas alterações em meio aquoso (RUBINGER, 2009). Para substâncias tóxicas instáveis ou voláteis as quais têm suas concentrações reduzidas ao longo do teste, contribuindo para que o resultado seja subestimado, são recomendados os testes semi-estáticos. Nesse tipo de teste as soluções-testes são renovadas periodicamente (COSTA *et al.*, 2008). Sendo que o período de renovação das soluções-testes dependerá da espécie de organismo. No sistema de fluxo contínuo, as soluções fluem continuamente através dos recipientes onde estão os organismos-teste. O fluxo deve ser capaz de manter concentração constante das soluções-testes e a concentração de oxigênio dissolvido deve ser mantida a 90% de saturação. Nos testes os equipamentos utilizados são os diluidores proporcionais e as bombas peristálticas (ARAGÃO & ARAÚJO, 2008)

#### **2.4.5. Critérios para seleção de organismos aquáticos**

De acordo com APHA (2012), os requerimentos mais importantes para designar um programa de testes de toxicidade são a definições dos objetivos do estudo e o estabelecimento de práticas de controle de qualidade para assegurar que os dados são de qualidade suficiente para alcançarem os objetivos pré-definidos e promover sua credibilidade.

Para a seleção do organismo-teste primeiramente precisa-se conhecer sobre a sensibilidade da espécie a uma diversidade de agentes químicos. Esta deve ser relativamente constante, possibilitando a obtenção de resultados precisos, com uma boa exatidão e reprodutibilidade dos resultados. É necessário o conhecimento prévio da biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para a realização dos testes. Além disso, o uso de espécies de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo se mostra ideal aos estudos ecotoxicológicos em laboratório. Outro critério é a disponibilidade de organismos. Devem-se desconsiderar espécies presentes em épocas restritas e em pequeno número em favor daquelas abundantes e disponíveis ao longo do ano. Como os testes são realizados para avaliar o efeito de determinado poluente ao ambiente, deve-se dar preferência a espécies autóctones ou representativas do ecossistema em estudo, ou seja, a espécie deve exercer papel importante no que se refere à estrutura e funcionamento das biocenoses, além de ter, preferencialmente, importância comercial (DOMINGUES & BERTOLETTI, 2006).

De acordo com nível trófico algumas espécies são mais usadas em testes de toxicidade, dentre estas se destacam:

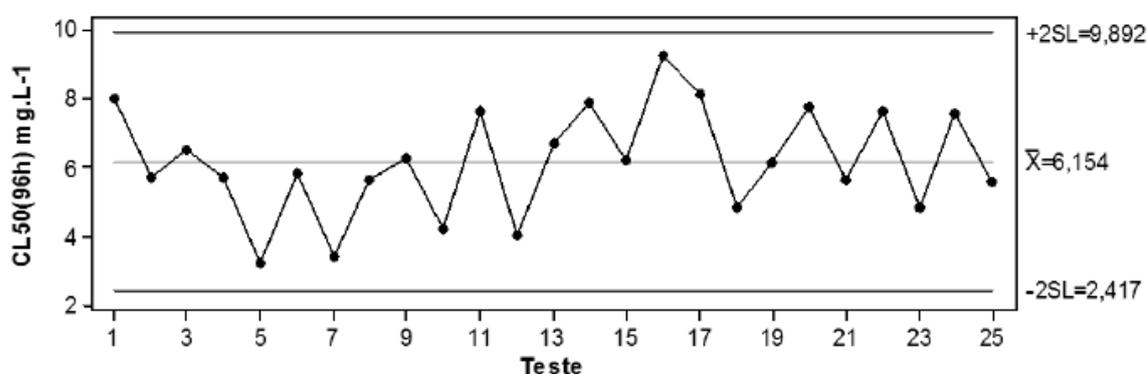
- Algas de água doce: *Chlorella vulgaris*; *Scenedesmus quadricauda*; *Scenedesmus subspicatus*; *Pseudokirchnerilla subcapitata*.
- Algas de água marinha: *Phaeodactylum tricornutum*; *Asterionella japonica*; *Dunaliella tertiolecta*; *Champia parvula*.
- Microcrustáceos de água doce: *Daphnia magna*; *Daphnia similis*; *Ceriodaphnia dubia*; *Hyalella azteca*; *Hyalella meinerti*.
- Microcrustáceos de água marinha: *Mysidopsis Bahia*; *Mysidopsis juniae*; *Leptocheirus plumulosus*; *Tiburonella viscana*; *Artemia salina*.
- Moluscos de água marinha: *Mytilus edulis*; *Crassostrea rhizophorae*.
- Equinodermos: *Arbacia lixula*; *Arbacia punctulata*; *Lytechinus variegatus*;
- Peixes de água doce: *Pimephales promelas*; *Danio rerio*; *Poecilia reticulata*; *Oncorhynchus mykiss*; *Lepomis macrochirus*.
- Peixes de água marinha: *Menidia beryllina*; *Menidia menidia*; *Cyprinodon variegatus*.
- Insetos de água doce: *Chironomus sp*; *Hexagenia sp*.

- Bactérias de água doce: *Spirillum volutans*; *Pseudomonas fluorescens*. *Salmonella typhimurium*.

- Bactérias de água marinha: *Vibrio fischeri* (anteriormente denominada *Photobacterium phosphoreum*).

#### 2.4.6. Sensibilidade e cartas controle de organismos testes

A avaliação periódica da sensibilidade dos organismos bem como dos procedimentos dos testes são realizados com substância referência, a fim de se ter maior precisão e confiabilidade nos resultados. Dentre os produtos mais utilizados como substâncias de referências pode-se citar: cloracetamida, cloreto de cádmio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de zinco, cromato de potássio, dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, fenol, nitrato de prata, pentaclorofenato de sódio, pentaclorofenol, sulfato de cobre e sulfato de zinco (KNIE & LOPES, 2004). As substâncias de referência são utilizadas para estabelecer a faixa de aceitação de resultados da sensibilidade dos organismos para uso em testes. Uma substância de referência deve possuir alguns requisitos tais como: ter meia vida longa e estável, estar disponível na forma pura, apresentar uma boa curva de concentração-resposta para o organismo, ser estável em solução aquosa e apresentar um baixo risco a saúde humana (ENVIRONMENT CANADA, 1992). O resultado de um ensaio de toxicidade é considerado aceitável se a sensibilidade à substância de referência estiver dentro dos limites estabelecidos pela carta-controle, obtida pela média da  $CL_{50}$  ou  $CE(I)_{50}$  de um determinado número de ensaios  $\pm 2$  desvios padrão (Figura 2.6) (ABNT, 2004; NIPPER, 2002).



**Figura 2.6** - Exemplo de carta controle da sensibilidade dos organismos *M. juniae* utilizando a substância de referência dodecil sulfato de sódio

Fonte: GONÇALVES, 2014

## 2.4.7. Expressão dos Resultados dos Testes de Toxicidade

A Tabela 2.4 mostra a definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade.

**Tabela 2.4** - Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade

Parâmetros	Definição	Tempo de exposição
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 ou 48 h
CENO	Concentração de Efeito não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste	7 dias

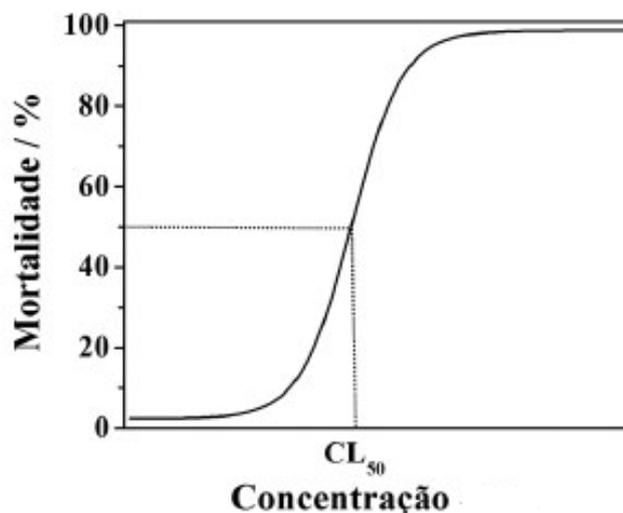
Fonte: adaptado de WANDERLEY, 2013

Em ensaios de toxicidade aguda, a partir dos resultados obtidos, pode-se calcular a concentração mediana que causa efeito adverso em 50% dos organismos testados durante um período de tempo predeterminado (48, 72 ou 96 horas). Para avaliação de efeito agudo em invertebrados calcula-se a CE<sub>50</sub>, concentração efetiva média que mobiliza 50% dos organismos e para peixes calcula-se a CL<sub>50</sub>, concentração letal média a 50% dos organismos testados. Utiliza-se o nível de efeito de 50% porque é a resposta mais reprodutível e pode ser estimada com maior confiança. Esses resultados podem ser determinados através de vários métodos estatísticos (ARAGÃO & ARAÚJO, 2008).

Ao final de um ensaio de toxicidade crônica estimam-se os efeitos do agente na reprodução, no crescimento e/ou na sobrevivência de uma espécie por um período de tempo prolongado. De acordo com ARAGÃO & ARAÚJO (2008) com esse tipo de teste

estima-se a maior concentração que não causa efeito aos organismos teste (CENO) e a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo nos organismos-teste (CEO). Os valores numéricos de toxicidade aguda e crônica, expressos como  $CL_{50}$ ,  $CE_{50}$ , CENO e CEO, exprimem uma relação inversa à toxicidade, ou seja, menores valores numéricos indicam maiores toxicidades.

A relação dose-resposta constitui a base fundamental para a avaliação do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente porque permite quantificar a toxicidade aguda dessas substâncias. Em geral, as curvas que representam a relação dose-resposta apresentam comportamento não-retilíneo do tipo sigmóide, como ilustrado na Figura 2.7 (HODGSON, 2004).



**Figura 2.7** - Representação de uma curva dose-resposta típica obtida e testes de toxicidade.

Fonte: HODGSON, 2004

Dois parâmetros importantes podem ser determinados a partir das curvas dose-resposta: a concentração ou dose, que resulta em 50% do efeito medido, ou seja, os valores de  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  e, o coeficiente angular da porção linear da curva que passa pelo ponto correspondente à  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ . Os dois parâmetros são necessários para descrever precisamente a relação entre a concentração do agente químico e o efeito deletério provocado nos organismos-teste.

Dentre os métodos estatísticos para determinar  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  encontram-se o método Probit, o método Logit e os métodos Spearman-Kärber e trimmed Spearman-Kärber. Os dois primeiros são métodos paramétricos que transformam os dados da curva dose-resposta

em uma função matemática conhecida ou esperada antes dos valores de  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  serem estimados. Apresentam deficiências para contornar as anomalias apresentadas por alguns dados e não são válidos para curvas dose-resposta assimétricas. Os métodos Spearman-Kärber e trimmed Spearman-Kärber são métodos não paramétricos que não estão sujeitos a esses problemas, têm boas propriedades estatísticas, são fáceis de usar e recomendados para cálculos precisos de  $CE_{50}$  e  $CL_{50}$  com intervalo de confiança de 95%. Eles são válidos para curvas dose-resposta simétricas e assimétricas. A única limitação desses métodos em relação aos métodos paramétricos é que devem cobrir o intervalo de zero a 100% de mortalidade ou de efeito agudo. O resultados de  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  são comumente expressos em  $mg L^{-1}$  (APHA, 2012).

#### **2.4.8. Toxicidade aguda com organismo *Danio rerio***

Os peixes são organismos indicadores importantes por encontrarem-se no topo da cadeia alimentar, sendo capazes de demonstrar a sua própria situação toxicológica e a de outros organismos. Os organismos-teste utilizados na realização dos testes ecotoxicológicos desta pesquisa foram os peixes da espécie *Danio rerio* e a metodologia utilizada foi a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 203, 1992).

Conhecido mundialmente como *zebrafish*, e no Brasil como Paulistinha, o *Danio rerio* (Figura 2.8), foi descrito por Hamilton-Buchanan em 1822 e introduzido como modelo animal nas pesquisas científicas por George Streisinger em 1981. É um peixe tropical de água doce, sendo encontrado em rios, águas paradas, canais e campos de arroz. Todavia ele é comercializado e bastante difundido em aquários e laboratórios do mundo todo. São originários da Ásia e vivem em média três anos e apresentam comprimento total, quando adulto, entre 3 a 4 cm e pertencem à família *Cyprinidae*. Esta espécie apresenta dimorfismo sexual externo, é ovíparo, de hábito alimentar onívoro, possui alta taxa de fecundidade e, se mantida em ambiente favorável, podem repetir o ciclo de desova a cada 5-7 dias, influenciada pelos fatores ambientais e/ou sazonais (ARMILIATO *et al.*, 2014).



**Figura 2.8 - *Danio rerio* (Cyprinidae)**

Fonte: <http://www.iimcb.gov.pl/zebrafish-core-facility.html>

O *Danio rerio* é um organismo padrão em estudos científicos, principalmente em toxicologia, devido à sua fácil adaptação às variadas condições ambiental, tanto natural quanto artificiais, além de não necessitarem de cuidados excessivos. São facilmente mantidos em aquários de água doce sob condições controladas de temperatura, pH e fotoperíodo, sendo bastante indicado para estudos experimentais. O *Danio rerio* apresenta grande sensibilidade a produtos químicos, por absorver de forma rápida os compostos que são diretamente expostos na água e acumulá-los em diferentes tecidos e órgãos. Desta forma, a espécie de peixe *Danio rerio* mostra-se adequada para trabalhos em condições laboratoriais, devido ao fato de ser amplamente reconhecida como um bom modelo para estudos de toxicidade (ARMILIATO *et al.*, 2014; SOUZA, 2015).

A Tabela 2.5 mostra resumidamente as condições de teste de toxicidade aguda com o organismo *Danio rerio*, conforme a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 203, 1992).

**Tabela 2.5 - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com *Danio rerio*.**

Condições-teste	
Sistema de teste	Estático, semi-estático ou fluxo contínuo
Duração do teste	96 horas
Água de diluição	Reconstituída ou natural, com dureza de 40-48 mg de CaCO <sub>3</sub> /L
Tamanho do frasco-teste	Béquer de 1 a 2 litros
Volume/quantidade das soluções-teste	1 a 2 litros
Renovação da amostra-teste	Não para o sistema estático. Sim para o sistema semi-estático e de fluxo contínuo
Idade dos organismos	Acima de 60 dias

**Tabela 2.5** - - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com *Danio rerio* (continuação)

Nº de soluções-teste	> 5 e controle
Nº de organismos/réplica	> 7
Nº de réplica/solução-teste	1
Alimentação durante o teste	Nenhuma
Qualidade de luz	Luz fria ou natural de laboratório
Fotoperíodo	16 horas de luz; 8 horas de escuro
Temperatura	25 ± 2 <sup>0</sup> C
Aeração das soluções-teste	Sim, se o oxigênio dissolvido for < 6,0 mg/L
pH	6 - 8,5
Fator de diluição	0,3 ou 0,5
Critério de avaliação de efeito	Mortalidade
Expressão dos resultados	Quantitativo: CL <sub>50</sub> (mg/L) Qualitativo: efeito tóxico ou não tóxico
Critério de aceitação do teste	> 90% de sobrevivência dos organismos-controle

Fonte: adaptado da OECD 203, 1992

#### 2.4.9. Toxicidade aguda com organismo *Artemia salina*

A utilização de invertebrados como bioindicadores é implementada em testes antes do uso de vertebrados, mas sua aplicação envolve, dentre os resultados primários, a avaliação da toxicidade e genotoxicidade dos compostos testados. Neste estudo o organismo-teste utilizado foi o microcrustáceo *Artemia salina* e a metodologia utilizada foi a de MEYER *et al.* (1982) adaptada por NASCIMENTO *et al.*, (2002).

A *Artemia salina* (camarões de água salgada) é uma espécie de microcrustáceo pertencente à subclasse *Branchiopoda*. Caracteriza-se pela enorme quantidade de pares de apêndices achatados na região torácica, uteis na formação de correntes que auxiliam o animal na captura de alimentos, aumentando a superfície de contato com a água. É muito utilizada como bioindicador em ensaios de laboratório, em função da sua facilidade de manipulação e do seu baixo custo econômico. Habitam em lagos e lagoas salgadas, mares, tanques de salinas, de várias partes do mundo. São adaptados à sobrevivência frente a grandes variações sazonais, em teores de salinidades que flutuam de 3,5 a 70%. São filtradores e se alimentam basicamente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio. A filtração do alimento ocorre nos toracópodos encarregados de conduzir as partículas em direção ao trato digestivo, enquanto, a sua taxa de filtração diminui com o aumento da concentração de partículas, ficando estas

acumuladas e interferindo o processo normal de seus batimentos. Outro efeito das altas concentrações é que podem passar diretamente pelo tubo digestivo sem sofrer digestão, tornando o indivíduo subnutrido (WANDERLEY, 2013; OLIVEIRA 2015; PEREIRA *et al.*, 2015).

Os cistos podem ser armazenados em ambiente seco ou sob condições anaeróbias por no mínimo seis meses, sem perder a viabilidade e sem a necessidade de manter culturas contínuas. Após serem hidratados, os embriões que estão dentro do cisto se ativam e em cerca de 24 horas as membranas rompem-se e nasce uma larva náuplio livre natante. É neste estágio do seu ciclo de vida que a *Artemia sp.* é utilizada nos testes de toxicidade aguda (WANDERLEY, 2013). A Figura 2.9 mostra o ciclo vital da *Artemia sp.*



**Figura 2.9 - Ciclo vital da *Artemia sp***

Fonte: <http://www.acuarionorte.com/index.php?topic=1309.0>

O teste de toxicidade aguda com *Artemia sp* é um ensaio eficiente que requer quantidades baixas de amostra (2 – 20 mg), não requer métodos assépticos e nem equipamentos especiais. O efeito tóxico avaliado neste bioensaio consiste na perda da capacidade de movimentação das larvas, após 48 horas de incubação com as amostras a serem testadas. Para que os resultados do teste sejam viáveis, é necessário que as larvas sejam mantidas sob as condições ótimas de crescimento, como temperatura entre 25 e 35°C, salinidade de 35‰ e pH ligeiramente alcalino, em torno de 8,0. A *Artemia sp.* tem sido utilizado em ensaios de toxicidade com objetivo de avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (WANDERLEY, 2013; OLIVEIRA 2015; PEREIRA *et al.*, 2015). De acordo com a

Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL<sub>50</sub> abaixo de 1000 ppm em *Artemia sp.* (MEYER *et al.*, 1982).

A Tabela 2.6 apresenta de forma resumida as condições gerais de teste de toxicidade aguda com o organismo *Artemia salina* conforme MEYER *et al.* (1982) adaptada por NASCIMENTO *et al.*, (2002).

**Tabela 2.6 - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com a *Artemia salina***

<b>Condições-teste</b>	
Sistema de teste	Estático
Duração do teste	48 horas
Água de diluição	Água do mar natural ou artificial
Tamanho do frasco-teste	Tubo de ensaio > 10 mL
Volume/quantidade das soluções-teste	5 a 10 mL
Renovação da amostra-teste	Não
Idade dos organismos	48 horas
N <sup>o</sup> de soluções-teste	5 ou 6 e controle
N <sup>o</sup> de organismos/réplica	10
N <sup>o</sup> de réplica/solução-teste	Mínimo de 3 para todas as amostras
Qualidade de luz	Luz fria ou natural de laboratório
Fotoperíodo	12 horas de luz; 12 horas de escuro
Temperatura	25 ± 2 <sup>o</sup> C
Salinidade	35%
Aeração	Sim, se o oxigênio dissolvido for < 4,0 mg/L
pH	7-8
Critério de avaliação de efeito	Mortalidade
Expressão dos resultados	Quantitativo: CL <sub>50</sub> (mg/L) Qualitativo: efeito tóxico ou não tóxico
Critério de aceitação do teste	> 90% de sobrevivência dos organismos-controle

Fonte: adaptado de MEYER *et al.*, 1982

#### **2.4.10. Toxicológicos que utilizam plantas**

Os ensaios toxicológicos que utilizam as plantas são ferramentas versáteis na avaliação da contaminação de um solo, permitindo-nos identificar o efeito dos contaminantes (VAN GESTEL *et al.*, 2001; LOUREIRO, 2004; ALVARENGA, 2009). O

solo desempenha uma matriz física para o desenvolvimento da planta. Logo, uma estrutura deficiente, e com macro e micro-porosidade insuficientes, podem influenciar a germinação da semente, a penetração e o crescimento da raiz, a capacidade de retenção de água essencial para suprir as necessidades hídricas da planta, as trocas gasosas ao nível da raiz e, como consequência, afetar a biomassa vegetal da cultura. Os testes de ecotoxicidade de solos descritos na literatura podem ser classificados como (VAN GESTEL *et al.*, 2001; ALVARENGA, 2009):

- Testes agudos ou Testes crônicos, dependendo do tempo de exposição do organismo ao contaminante,

- Ensaios diretos, que colocam o organismo em contato direto com o solo a testar (testam a função habitat do solo);

- Ensaios indiretos, que utilizam espécies aquáticas, as quais são colocadas em contato com os extratos do solo (testam a função de retenção desse solo). Recomenda-se o uso de uma bateria de testes, incluindo várias espécies representativas do ecossistema em avaliação, ensaios agudos, crônicos e reprodutivos e, se possível, utilização de organismos terrestres e aquáticos.

Podem utilizar-se diferentes organismos do solo:

- Microrganismos do solo: estes ensaios avaliam processos como a mineralização do azoto e a nitrificação, a determinação da biomassa microbiana ou a atividade enzimática da desidrogenase;

- Mesofauna do solo: reprodução de *Enchytraeus albidus* e de *Folsomia candida*;

- Macrofauna do solo: mortalidade, reprodução e percentual de fuga (evitamento) de *Eisenia fetida*;

- Plantas: emergência e crescimento de mono e dicotiledóneas.

#### **2.4.10.1. Influência da qualidade do solo no desenvolvimento das plantas**

A necessidade de entender e avaliar a qualidade do solo tem sido apontada como um dos principais compromissos da ciência do solo. Através deste estudo pode-se avaliar o grau de contaminação de determinado solo, avaliar o uso correto para determinada área, definindo práticas e sistemas de manejo capazes de manter ou melhorar a sustentabilidade

dos sistemas agrícolas (CARDOSO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2013; CHERUBIN *et al.*, 2015). A qualidade do solo pode ser determinada pela integração das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, proporcionando condições adequadas para o crescimento e desenvolvimento das plantas e para a manutenção da diversidade de organismos que habitam o solo (CHERUBIN *et al.*, 2015).

Contaminações ocorridas no solo podem promover compactação do solo, causando uma maior resistência física ao crescimento das raízes e decréscimo do potencial de água, falta de oxigênio e elevadas concentrações de etileno na zona radicular, gerando modificações morfológicas e fisiológicas nas plantas na busca por uma adaptação. Essas alterações podem provocar alterações na germinação, no número de ramos por planta, no número de nós férteis, na altura de planta, no comprimento radicular, no diâmetro do caule, no acúmulo de matéria seca, no número de vagens por planta e no número de grãos por vagem, podendo provocar modificações no potencial produtivo das culturas (JIMENEZ *et al.*, 2008).

A contaminação do solo com derivados do petróleo pode causar estresse na camada de vegetação, afetando o seu desenvolvimento. Os sintomas mais comuns e mais importantes observados em plantas contaminadas por hidrocarbonetos são a erosão da cera epicuticular (BAKER, 1970), degradação da clorofila (BAKER, 1970; MALALLAH *et al.*, 1996; MALALLAH *et al.*, 1998), alterações no mecanismo estomático (BAKER, 1970; BUJOKAS, 2001), distúrbios na fotossíntese e respiração (BAKER, 1970; LARCHER, 2000), aumento das taxas de fitormônios relacionados ao estresse (LARCHER, 2000), acumulação de substâncias tóxicas ou de seus derivados nos tecidos vegetais (BAKER, 1970; LARCHER, 2000), entre outros. WILLIAM *et al.* (1982) analisaram o efeito do solo contaminado por petróleo na germinação e estabelecimento das plântulas e verificaram que esse pode atrasar o estabelecimento de plântulas por décadas.

QUITÉRIO (2010) verificou a possibilidade de detecção de alterações botânicas relacionadas à presença de gasolina e óleo diesel no solo, através das respostas espectrais de três espécies vegetais (*Brachiaria brizantha* – braquiária, *Neonotonia wightii* – soja perene e *Eucalyptus camaldulensis* – eucalipto), no intervalo de 400 a 2500 nm do espectro eletromagnético. Os resultados mostraram que as três espécies vegetais apresentaram alterações espectrais e morfo-fisiológicas relacionadas à presença de gasolina e diesel no solo, porém, cada qual com volume de hidrocarbonetos e tempo de exposição distinto.

MAGALHÃES *et al.* (2011) investigaram os impactos causados pelos combustíveis (óleo diesel e gasolina) em cinco espécies vegetais (*Phaseolus vulgaris* - feijão, *Neonotonia wightii* - soja perene, *Zea mays* - milho, *Saccharum spp* - cana-de-açúcar e *Brachiaria brizantha* - braquiária), em um experimento em escala real onde a contaminação ocorreu depois das plantas atingirem um bom nível de desenvolvimento. Foi possível observar o efeito do estresse induzido por hidrocarbonetos em todas as espécies e os resultados mostraram a maior toxicidade da gasolina para todas as culturas selecionadas.

Diversas espécies de plantas que crescem em solo contaminado por petróleo e derivados foram analisadas por CHUPAKHINA; MASLENNIKOV, 2004 e, como resultado foi encontrada alterações nas concentrações de antocianina, ácido ascórbico e riboflavina. As plântulas com 25 dias de crescimento, germinadas em solo contaminado por hidrocarboneto, também foram analisadas e registraram-se alterações na germinação e formação de eofilos.

Os efeitos da poluição por óleo cru na germinação de *Zea mays L.* (*Poaceae*) e *Capsicum frutescens L.* (*Solanaceae*) foram investigados por AMAKIRI; ONOFEHGARA, 1984. Nos dois casos a germinação foi inibida, porém quanto maior o tempo após a contaminação, menor foram os efeitos encontrados, sendo que as sementes de *C. frutescens* apresentaram maior tolerância ao poluente do que as sementes de *Z. mays*.

Logo, a contaminação do solo pode provocar variações em sua qualidade (física, química ou biológica) causando efeitos tóxicos, desarranjo nutricional e consequente prejuízo para o crescimento ou morte das plantas e demais organismos presentes.

#### **2.4.10.2. Toxicidade em solo contaminado utilizando a soja (*Glycine max L.*) como bioindicador**

Para testes de toxicidade em solo, as interações entre os compostos químicos e o solo devem ser levadas em consideração para prever corretamente o impacto químico no ambiente, pois os contaminantes presentes no solo podem ser adsorvidos ou liberados, tendo efeitos tóxicos diferentes. Realizar os testes utilizando plantas como bioindicadores é interessante porque elas têm relação direta com a físico-química do solo, com a associação de fauna edáfica (decomposição), regula o fluxo de minerais, regula as substâncias contaminantes do solo, possuem uma boa sensibilidade na indicação qualitativa de presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos e ainda possuem baixo custo

(CASTRO, 2010; LOZADA, 2015). As folhas e as raízes de plantas absorvem sais minerais e água e podem ser contaminadas por metais pesados e outros elementos tóxicos contidos no solo, esses compostos entram em seus tecidos fazendo alterações em sua morfologia e fisiologia mostrando os efeitos dos impactos ambientais em seu organismo (BAGLIANO, 2012).

Os testes de toxicidade vêm sendo realizados com uma ampla variedade de espécies de plantas, como gramíneas, leguminosas, hortaliças, árvores e diversas outras monocotiledôneas e dicotiledôneas, a fim de investigar a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos perigosos, onde estão inclusos: metais pesados, solventes clorados, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs, bifenilas policloradas e radionuclídeos (AGUIAR *et al.*, 2012). No entanto, ainda não existe uma espécie que atenda os requisitos necessários para todos os ecossistemas.

A soja tem sido empregada como bioindicador em estudo de fitotoxicidade, fitorremediação e em testes de toxicidade, é originada de clima temperado, com ampla adaptação aos climas subtropicais e tropicais é uma planta autógama anual, pertencente à família *Fabaceae*, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max (L.) Merrill* (CELLA, 2012). A cultura da soja apresenta capacidade de se adaptar a períodos de déficit hídrico, apresenta características de alta plasticidade, ou seja, capacidade de se adaptar às condições ambientais e de manejo, por meio de modificações na morfologia da planta e nos componentes do rendimento (BARZOTTO, 2015).

SANTOS (2013) avaliou técnicas de compostagem, fitorremediação e processo oxidativo para o tratamento de resíduos impregnados com óleo mineral isolante em culturas de girassol, milho, grama batatais/boiadeira, mamona, capim-braquiária, feijão guandú, soja e sorgo. Demonstrou que o óleo mineral isolante não promove alterações no ciclo de vida e não é letal à soja na concentração de 3,04% no solo. Os autores AGUIAR *et al.* (2012), realizaram estudo do emprego de *Glycine max* cv CD 214 Br e *Brachiaria brizantha* cv Marandu com o intuito de avaliar o potencial de ambas para fitorremediação de solo planosolo háplico contaminado por petróleo a 3%. No estudo a soja mostrou-se mais tolerante que braquiária à presença do contaminante e a condição estressante promovida pelo solo contaminado promoveu alterações anatômicas.

Os autores FREITAS *et al.* (2011), avaliaram a utilização de espécies vegetais para a remediação, tratamento e a descontaminação de solos impregnados com óleo mineral

isolante por meio da utilização da fitorremediação. Os dados obtidos mostram que as espécies: girassol, milheto, grama batatais, feijão guandú e soja apresentam grande potencial para serem utilizadas como fitorremediadoras em solos contaminados com óleo mineral isolante. As plantas de mamona e sorgo não são tolerantes ao solo impregnado com óleo mineral isolante à taxa de 3,04%, todavia conseguiram reduzir a taxa de óleo, inicialmente apontada.

ROSA (2006) estudou o desempenho em termos de germinação e de produção de biomassa radicular e aérea de sete espécies vegetais mamona (*Ricinus communis*), girassol (*Helianthus annuus*), soja (*Glicine max*), Acácia (*Acacia holosericea*), branquiária (*Brachiaria brizantha*), quaresmeira (*Tibouchina granulosa*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) pertencentes a diferentes grupos (nativas, exóticas, oleaginosas com potencial de produção de biodiesel, gramíneas e florestais) na presença de dois tipos de óleo cru em cinco concentrações. Mostrou que dependendo da espécie, condições experimentais e da concentração do óleo, o mesmo pode inibir, adiar ou favorecer a germinação, assim como a produção de biomassa.

Esta tese tem como objetivo analisar diferentes dosagens de fluido dielétrico vegetal e mineral no solo e no meio aquático, a fim de identificar os efeitos deletérios no desenvolvimento das espécies estudadas, bem como uma avaliação comparativa da toxicidade desses fluidos dielétricos. Pois, apesar de todos os avanços obtidos até o momento para mostrar que o fluido dielétrico vegetal possui características físico-químicas mais adequadas que o mineral e por ser recente sua introdução no setor elétrico, ainda não há parâmetros para a toxicidade dos mesmos.

No presente trabalho, as espécies *Danio rerio* e *Artemia salina* foram testadas com o intuito de se conhecer a toxicidade dos fluidos dielétricos estudados, levando em consideração a menor diluição que causou letalidade em 50% dos organismos (CL<sub>50</sub>). As características fitotécnicas da soja (*Glycine max L.*) foram avaliadas com a finalidade de analisar sua resistência a solos contaminados por fluidos dielétricos. Foram realizadas análise da composição química e de degradação de óleos e graxas no solo bem como a biodegradabilidade, a fim de verificar o efeito deletério desses fluidos no solo, além de verificar se o tempo após a contaminação diminui esse efeito.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1.Fluidos Dielétricos**

Para o estudo da biodegradabilidade imediata foram estudados cinco fluidos dielétricos utilizados em transformadores: quatro deles com base em óleo vegetal (crambe, soja (W3), canola (W6) e girassol (W9)) e o quinto fluido utilizado foi a base de óleo mineral (Lubrax). Para os ensaios de toxicidade aguda com os organismos *Danio rerio* e *Artemia salina* e para os ensaios de toxicidade em solo utilizando a soja (*Glycine max L*), foram usados o fluido dielétrico vegetal de soja (W3) e o mineral (Lubrax). O fluido dielétrico vegetal de soja foi escolhido, por ser o mais utilizado, devido ao baixo custo e alta eficiência. O fluido dielétrico vegetal e mineral foram adquiridos comercialmente.

Todos os fluidos vegetais pertencem à Agbioelectric® e são denominados W3 (soja), W6 (canola), W9 (girassol) e crambe. Possuem base derivada de 99% de óleo de semente / grãos e menos de 1% de aditivos, conforme descrito na norma técnica Agbioelectric (AGBIO, 2017) a sua caracterização físico-química atende os ensaios descritos na norma ABNT - NBR 15422 (2015). O óleo mineral utilizado foi o Lubrax AV 66 IN da empresa Petrobras Distribuidora S.A, de acordo com a ficha de informações de segurança de materiais, este óleo mineral é composto por destilados naftênico hidrotratado leve (70-100% w, CAS No. 64742-53- 6), destilado de petróleo hidrotratado médio (25% w, CAS # 64.742-46-7) e inibidor antioxidante BHT (0,30% m) a sua caracterização atende as exigências da Resolução ANP n<sup>o</sup> 36 (2008), norma que o regulariza.

#### **3.2.Avaliação da Biodegradabilidade Imediata**

O teste de biodegradabilidade imediata foi realizado no Bioagri Ensaios e Testes de Saneantes e Cosméticos Ltda em Charqueada – SP e a metodologia utilizada seguiu a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 301 B, 1992). Essa metodologia avaliou a biodegradação dos fluidos dielétricos pela ação de microrganismos que transformou a amostra em gás carbônico, medido indiretamente por titulometria. O gás carbônico monitorado foi calculado para determinar sua produção durante o teste de biodegradabilidade e os valores acumulados foram comparados àquele teoricamente esperado a partir da composição, em carbono, da amostra.

Os fluidos dielétricos testados foram os seguintes: W3, W6, W9, crambe e Lubrax. Antes de iniciar o teste de biodegradabilidade imediata, realizou-se a análise elementar do teor de carbono dessas amostras.

### 3.2.1. Análise elementar do teor de carbono

#### 3.2.1.1. Procedimento analítico

De acordo com a OECD 301 B (1992) o pré-requisito para se iniciar o teste de biodegradabilidade imediata é o conhecimento do teor de carbono total de cada um dos materiais em estudo. Para esta análise o equipamento utilizado foi o Elemental Analyzer modelo 2400 CHN, marca Perkin Elmer. Este equipamento permite determinações rápidas das percentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes tanto em amostras orgânicas quanto inorgânicas, estando nas formas líquidas, gasosas ou sólidas. Para o preparo das amostras dos fluidos dielétricos, pesou-se em duplicata,  $1,1000 \pm 0,1000$  mg dos óleos utilizando uma cápsula de lata. Depois de dobrar a cápsula (parecendo uma folha de lata envolvida), as amostras foram colocadas no auto-amostrador do equipamento, sendo submetida à combustão a  $925\text{ }^{\circ}\text{C}$  na presença de oxigênio puro. O resultado foi expresso em percentual. As condições analíticas utilizadas no equipamento encontram-se na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Condições operacionais do equipamento Elemental Analyzer

Parâmetros	
Detector	TCD (detector de condutividade térmica)
Temperatura de combustão	$925^{\circ}\text{C}$
Temperatura de redução	$640^{\circ}\text{C}$
Pureza mínima dos gases	He (99,995%), O <sub>2</sub> (99,995%) e N <sub>2</sub> (99,0%)
Padrão de referência	Acetanilida
Vazão dos gases de arraste	$1,0\text{ mL min}^{-1}$
Tempo de análise por amostra	8 a 10 minutos

### **3.2.2. Preparo do inóculo**

#### **3.2.2.1.Preparo das soluções**

- Solução nutriente: Para o preparo da solução-tampão foi utilizado o reagente fosfato de sódio 0,2 M. O tampão foi preparado conforme DEUTSCHER, SIMON & ABELSON (1990), onde o pH ficou em 7,4. As quantidades de nutrientes utilizados para o preparo da solução foram baseadas no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para um volume final de líquido (solução-tampão) de 500 mL. Composição da solução nutriente: 6,25 g de  $K_2HPO_4$ ; 1,00 g de  $NaNO_3$ ; 1,50 g de Uréia; 0,40 g de  $MgSO_4$ ; 0,25 g de  $ZnSO_4$ ; 0,25 g de  $FeSO_4$ ; 0,10 g de  $MnSO_4$ .

- Ágar padrão - Plate Count Agar (PCA): (a) O Ágar Padrão utilizado foi da marca Acumedia, sua fórmula contém: digestão enzimática de caseína (5g), extrato de levedura (2,5g), dextrose (glicose) (1g) e Ágar (15g); (b) Pesou-se 23,5g do Ágar Padrão e dissolveu em 1 litro de água destilada e deionizada. Este foi aquecido e agitado frequentemente por 1 minuto para dissolver completamente o meio. Em seguida foi colocado em autoclave a  $121^{\circ}C$  por 15 minutos.

#### **3.2.2.2.Procedimento analítico**

Coletou-se na estação de esgoto doméstico de Piracicaba, São Paulo, Brasil, uma mistura de microrganismos de esgoto, em alta concentração de material orgânico onde essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos para decantação. O sobrenadante passou por peneira de 100 mesh para remover as partículas mais grossas. Na sequência 600 mL do material peneirado foi centrifugado em tubos de centrífuga modelo NT 825, marca Novatecnica com força máxima de 4.000 xg, a temperatura de  $4^{\circ}C$  por 20 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi suspenso em 100 mL de solução nutriente para obtenção do inóculo para teste. Após homogeneização foram transferidos 10 mL dessa suspensão (inóculo) por litro de solução nutriente para cada frasco âmbar a ser empregado no teste.

A determinação do número de microrganismos viáveis foi feita pelo método *pour plate*. Transferiu-se com auxílio de uma pipeta estéril, 1 ml do inóculo para uma placa de Petri vazia e estéril, abrindo as placas apenas o suficiente para inserir a pipeta. O inóculo

foi depositado fora do centro da placa, pois facilita a posterior mistura com o meio de cultura. Adicionou-se 12 a 15 mL do Agar padrão - Plate Count Agar (PCA), mantido em banho-maria a 50<sup>0</sup>C (para impedir a solidificação) sobre as placas inoculadas no momento do plaqueamento e, evitaram-se movimentos bruscos para não formar bolhas. Misturou-se o meio com o inóculo suavemente, com movimentos circulares oito a dez vezes no sentido horário e oito a dez vezes no sentido anti-horário. A movimentação das placas foi realizada cuidadosamente, para evitar respingos de meio nas bordas ou nas tampas. Para facilitar esta etapa do trabalho, utilizaram-se placas altas (20 x 100 mm). Após solidificação do ágar, a placa foi incubada em estufa bacteriológica modelo NI 1525i, marca Nova Instruments a 37°C por 48 horas. Após 48 h fez-se à contagem das unidades formadoras de colônias por unidade de volume (UFC/mL). É necessário que estes valores sejam, no mínimo 10<sup>5</sup> UFC/mL.

### 3.2.3. Acompanhamento dos Testes de Biodegradabilidade Imediata: Método OECD 301 B: CO<sub>2</sub> Evolution Test

Para os testes empregou-se um sistema de aeração de fluxo contínuo de acordo com o esquema mostrado na Figura 2.4, no qual se utilizou ar comprimido para suprir o metabolismo aeróbio de microrganismos nos diferentes frascos âmbar reagentes (5 L).

Para remover o CO<sub>2</sub> que poderia estar presente no ar comprimido que chega ao sistema, adaptou-se frascos plásticos de 1 L interligados em série, contendo 700 mL de solução de NaOH a 10 M. Deste modo, evitou-se que o dióxido de carbono existente no ar fosse erroneamente analisado como resultado da metabolização do material. A vazão de ar foi controlada entre 50 e 100 mL/min. Os frascos âmbar reagentes (5 L) foram completados com os seguintes tratamentos (Tabela 3.2):

**Tabela 3.2** - Tratamentos utilizados no experimento de biodegradabilidade com suas respectivas composições

Tratamentos	Branco	Padrão biodegradável	Substância teste	Ensaio de Inibição
Solução nutriente	3L	3L	3L	3L
Inóculo	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL
Substância teste (W3, W6, W9, crambe e Lubrax)	*	*	10 mg de carbono L <sup>-1</sup>	10 mg de carbono L <sup>-1</sup>

**Tabela 3.2** - Tratamentos utilizados no experimento de biodegradabilidade com suas respectivas composições (continuação)

Padrão biodegradável (Benzoato de sódio)	*	20 mg de carbono L <sup>-1</sup>	*	20 mg de carbono L <sup>-1</sup>
Repetição	Duplicata	Duplicata	Duplicata	Duplicata

O tratamento com o branco foi realizado para verificar a produção de CO<sub>2</sub> relacionada com a atividade do próprio inóculo e possível entrada de CO<sub>2</sub> no sistema, o tratamento com o padrão biodegradável visa à comprovação da viabilidade e atividade do inóculo, o tratamento com a inibição visa verificar se a substância teste apresentava efeitos deletérios aos microrganismos e o tratamento com a substância teste é a que vai ser testada a biodegradabilidade.

Todos os tratamentos receberam o inóculo 24 horas antes da adição da substância teste para adaptação. Em seguida, montou-se um sistema de absorção de CO<sub>2</sub>, o qual consistiu em ligar em linha, à saída de ar de cada frasco âmbar reagente. O CO<sub>2</sub> resultante da metabolização da amostra foi coletado por uma série de 3 frascos absorvedores de gás de 125 mL, contendo 100 mL de solução de Ba(OH)<sub>2</sub> a 0,0125 N. O experimento foi conduzido no escuro, à temperatura de 20 a 25 °C durante 28 dias.

À medida que o dióxido de carbono é coletado nestes frascos, forma-se BaCO<sub>3</sub> e o hidróxido de bário residual foi então titulado manualmente com HCl a 0,05 N, utilizando como indicador fenolftaleína 0,04% em etanol a 70%. Após a titulação do primeiro frasco, os dois frascos posteriores passaram para a primeira e segunda posição, respectivamente. A terceira posição era então preenchida por um novo frasco, contendo nova solução de Ba(OH)<sub>2</sub>.

As titulações no início do teste foram realizadas em intervalos aproximados de 3 em 3 dias e, após 10 dias de ensaio, foram feitas de 5 em 5 dias. Dos valores de HCl, gastos na titulação de cada frasco contendo padrão e amostras, foram descontados o valor do branco e este novo valor foi multiplicado pelo fator 1,10, para se obter o total de CO<sub>2</sub> desprendido, de acordo com a norma (Equação 3.1).

$$mgCO_2 = (mL \text{ de HCl (diferença)}) \times 1,10 \text{ mg} \cdot mL^{-1} \quad (3.1)$$

A cada titulação somou-se a nova diferença ao valor obtido anteriormente, de maneira que ao final de 28 dias da duração do teste, tinha-se um valor acumulativo de CO<sub>2</sub>.

Cada valor acumulado, obtido ao longo das titulações, foi dividido pelo total de CO<sub>2</sub> teórico esperado para a biodegradação total do produto e multiplicado por 100 (Equação 3.2).

$$\%CO_{2-t} = \left(\frac{Cd}{Ct}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

Onde

%CO<sub>2-t</sub> = porcentagem de degradação da substância ensaiada, num determinado tempo de incubação (dias).

Cd = quantidade totalizada de CO<sub>2</sub> (mg) desprendido num determinado tempo de incubação (dias) para a substância testada.

Ct = quantidade de CO<sub>2</sub> (mg) teoricamente esperada para a oxidação completa da quantidade de substância testada.

### **3.3. Ensaio toxicológicos com organismos aquáticos**

Para os estudos da toxicidade aguda com os organismos *Danio rerio* e *Artemia salina* foram realizados dois experimentos distintos. No primeiro experimento os organismos foram expostos em contato direto às diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax (g L<sup>-1</sup>). No segundo, foram expostos a fração solúvel em água (FSA) dos fluidos dielétricos testados (%), ambos os experimentos foram sem renovação da solução. As frações solúveis em água do fluido dielétrico W3 e Lubrax utilizadas no ensaio com o *Danio rerio* foram submetida a cromatografia gasosa.

#### **3.3.1. Preparo da fração solúvel em água (FSA)**

O preparo da fração seguiu as recomendações apresentadas na norma NBR 15469 (ABNT, 2015b). A finalização do preparo da fração (FSA) ocorreu na data do ensaio. Em um recipiente de vidro foi adicionado um volume na proporção de uma parte de amostra para nove partes de água de diluição (1:9). O recipiente foi fechado, em seguida colocado em agitador magnético e ajustada a velocidade de agitação de forma que o vórtex formado não ultrapasse 25% da altura da coluna de líquido. O recipiente foi mantido ao abrigo da luz e em agitação por 20 horas. Após o término da agitação foi deixado em repouso por 1 hora. Em seguida foi drenada somente a fase aquosa. O extrato recolhido foi mantido sob agitação lenta, no agitador magnético, durante a retirada das alíquotas necessárias ao

ensaio toxicológico. Para os ensaios com o *Danio rerio* a FSA e as diluições foram realizadas com água de diluição e para os ensaios com *Artemia salina* a FSA e as diluições foram realizadas com solução salina na concentração de 3,5% (m/v).

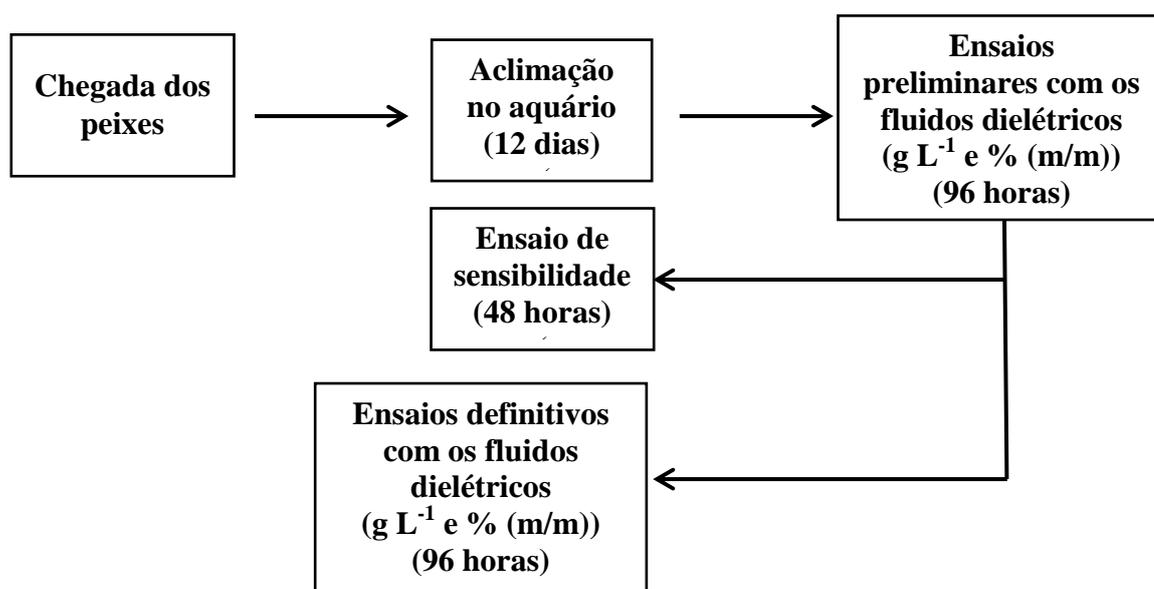
### 3.3.2. Ensaio de toxicidade aguda com organismos *Danio rerio*

#### 3.3.2.1. Local de realização dos testes

O teste de toxicidade aguda com o peixe *Danio rerio* foi realizado no laboratório Aplysia Tecnologia para o Meio Ambiente em Vitória – ES, em sala aclimatada, com manutenção de temperatura ambiente ( $23 \pm 1$  °C) e controle do fotoperíodo (16 horas de luz). A metodologia utilizada seguiu a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 203, 1992).

Neste estudo foi utilizado o ensaio estático com duração de 96 horas, onde os organismos foram expostos no primeiro experimento às diferentes concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de fluido tipo W3 e tipo Lubrax e no segundo experimento foram expostos a fração solúvel em água (%) dos fluidos dielétricos testados, ambos os testes foram realizados sem renovação da solução, com o intuito de se conhecer a faixa aproximada de toxicidade dos fluidos dielétricos estudados para a espécie *Danio rerio*. Levou-se em consideração a menor diluição que causou letalidade em 50% dos peixes ( $\text{CL}_{50}$ ).

A Figura 3.1 mostra resumidamente as etapas utilizadas para os dois ensaios de toxicidade aguda com o *Danio rerio*.



**Figura 3.1** - Resumo das etapas dos experimentos de toxicidade aguda com o *Danio rerio*

### 3.3.2.2.Preparo da água de diluição

A água de diluição utilizada para aclimação e execução dos testes de toxicidade foi natural, proveniente de poço artesiano (sem cloro), com dureza controlada entre 40 mg e 48 mg de CaCO<sub>3</sub>/L e foi coletada periodicamente em bombonas de plástico com capacidade para 40 L e levada ao laboratório onde foi filtrada para remoção de material particulado e organismos (filtro de carvão ativado e ultravioleta), permanecendo armazenada em barrilhetes até o momento da sua utilização. A água foi aerada por pelo menos 12 horas antes do início dos testes para saturação de oxigênio e estabilização do pH que variou entre 7 a 7,5.

### 3.3.2.3.Análises físico-químicas da água de diluição

As seguintes variáveis físicas e químicas da água foram mensuradas no início e a cada 24 horas, durante o experimento: oxigênio dissolvido, pH, temperatura e condutividade elétrica e foram obtidos com o medidor Multiparâmetro modelo AK88, marca AKSO. As faixas de trabalho do equipamento encontram-se na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3 - Faixas de trabalho do equipamento**

Parâmetros	Faixa de medição	Resolução
Oxigênio dissolvido	0 a 30 mg/L	0,1 mg/L
pH	2 a 12	0,01
Temperatura	0 a 60 <sup>o</sup> C	0,1
Condutividade elétrica	0 a 199,9 µS/cm	0,1 µS/cm

A análise de dureza da água também foi realizada no início e a cada 24 horas com um medidor de dureza modelo HI 96735C, marca Hanna Instruments com faixa de medição de 0 a 750 mg/L e resolução de 1 mg/L de 0 a 100 mg/L e 5 mg/L de 100 a 750 mg/L.

### 3.3.2.4.Aclimação do organismo teste

A espécie de peixe empregada neste estudo foi o *Danio rerio* (Cyprinidae), o lote dos indivíduos utilizados possuíam comprimento médio de 2,07 ± 0,08 cm e peso médio de 0,182 ± 0,015 g e foram adquiridos comercialmente. Antes do início dos ensaios, os peixes

foram aclimatados às condições de realização dos testes de toxicidade aguda por doze dias em água de diluição (dureza de 40-48 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ), em aquários de vidro com capacidade de 50 L, com fotoperíodo de 16 horas de luz e aeração constante. O pH foi mantido em 7, a temperatura ficou em  $23 \pm 1$  °C e o oxigênio dissolvido ficou entre 6 a 8 mg/L. Os peixes foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia (pela manhã e ao final da tarde) e a alimentação se deu até 24 horas antes do teste ser iniciado.

A limpeza dos aquários de aclimação foi feita diariamente por sifonamento e a água foi renovada sempre que se julgava necessário para a manutenção da faixa adequada de pH e oxigênio dissolvido.

Os peixes foram observados todos os dias e organismos mortos ou com comportamento anormal (perda de equilíbrio, ausência de movimentos respiratórios, pigmentação, etc.) foram removidos imediatamente após a observação. Se depois desse período de aclimação fossem observados sinais vitais positivos (mobilidade, coloração etc.) e a mortalidade fosse menor que 5%, o lote de peixes era considerado viável e poderia ser utilizado nos testes.

### **3.3.2.5. Ensaio preliminares com o *Danio rerio***

Foi realizado ensaio preliminar para estabelecer um intervalo de solução-teste a ser utilizado no ensaio definitivo. Foram preparadas concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) dos fluidos dielétricos W3 e Lubrax e a FSA (%) dos mesmos com o intuito de conhecer a concentração que causa mortalidade a 100% dos organismos e a concentração onde não ocorre letalidade. A faixa de concentrações utilizada nos testes foi determinada após uma bateria de experimentos preliminares, além do conhecimento dos resultados dos estudos do laboratório. Neste trabalho serão apresentadas apenas algumas das concentrações analisadas.

Para o ensaio preliminar com as concentrações dos fluidos dielétricos foi preparado um controle, contendo somente água de diluição e os organismos teste, oito e seis concentrações, respectivamente, sendo elas:

- Fluido dielétrico Lubrax: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 60  $\text{g L}^{-1}$ .
- Fluido dielétrico W3: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2  $\text{g L}^{-1}$ .

Para os ensaios com a FSA dos fluidos dielétricos, foi preparado um controle, contendo somente água de diluição e os organismos teste e cinco FSA, as porcentagens utilizadas foram:

- Fluido dielétrico Lubrax e W3: 0,39; 1,56; 6,25; 25 e 100% (m/m).

Os ensaios preliminares foram conduzidos nas mesmas condições dos ensaios definitivos descrito no item 3.3.2.7.

### **3.3.2.6. Teste de sensibilidade com o *Danio rerio***

Para garantir a validação dos testes de toxicidade aguda realizou-se o teste de sensibilidade do lote de *Danio rerio* com a substância referência cloreto de potássio (KCl) seguindo recomendação de ZAGATTO & BERTOLETTI (2008). Os organismos foram expostos a essa substância nas concentrações de 0,38; 0,506; 0,675; 0,9 e 1,2 g L<sup>-1</sup> (concentrações já utilizadas pelo laboratório) e os testes foram feitos em triplicata.

O teste de sensibilidade foi realizado em paralelo aos testes de toxicidade aguda, a fim de se obter resultados comparáveis, isto é, que apresentem boa precisão analítica, aumentando a confiabilidade dos dados gerados no laboratório. Os testes foram conduzidos sob as mesmas condições dos ensaios definitivos descrito no item 3.3.2.7, por um período de 48 horas.

Após o término do experimento, observou-se a letalidade em cada concentração e foi calculada a CL<sub>50</sub> e o intervalo de confiança, expressando os resultados de sensibilidade através da construção da carta de controle (gráfico  $\bar{x}$  (média) e S (desvio padrão)).

### **3.3.2.7. Ensaio definitivo com *Danio rerio***

Com base na mortalidade observada nos ensaios preliminares foi definida a faixa de concentração dos fluidos dielétricos para os ensaios definitivos.

Para o experimento onde os organismos foram expostos em contato direto com as concentrações dos fluidos (g L<sup>-1</sup>) foi preparado um controle contendo somente água de diluição e os organismos teste, além de sete concentrações diferentes do fluido dielétrico Lubrax e seis do fluido dielétrico W3, sendo elas:

- Fluido dielétrico Lubrax: 0,781; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 g L<sup>-1</sup>.
- Fluido dielétrico W3: 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 g L<sup>-1</sup>.

No experimento onde os peixes foram submetidos à fração solúvel em água dos fluidos dielétricos foi preparado um controle, contendo água de diluição e os organismos teste e as porcentagens utilizadas foram as seguintes:

- Fluido dielétrico Lubrax e W3: 0,195; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100% (m/m).

Para cada concentração e controle foram adicionados 10 organismos divididos em 2 replicatas, respeitando a relação de 1 g de peixe/L de água de diluição. Os organismos foram transferidos para aquários com capacidade de 5 litros e enchidos com 2,5 litros de água de diluição de forma aleatória, com fornecimento de oxigênio de 6 a 8 mg/L, em ensaio estático, sem renovação de solução, por um período de 96 horas. Foram mantidos com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura variando em  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e pH entre 7 e 8, sem fornecimento de alimento.

A mortalidade dos peixes para cada concentração estudada foi registrada após 24, 48, 72 e 96 horas, foram considerados mortos os peixes que não demonstraram reação após serem tocados no pedúnculo caudal. Os resultados foram considerados válidos se, no término do período de ensaio, a porcentagem dos organismos mortos no controle não excedia 10% (OECD 203, 1992).

Os parâmetros físico-químicos, como oxigênio dissolvido, pH, temperatura, dureza e condutividade elétrica foram monitorados a cada 24h até o final dos ensaios, pois podem afetar o andamento do teste.

Ao final dos ensaios, foi calculada a média aritmética da porcentagem de letalidade para cada concentração em relação ao número total de organismos utilizados e então calculada a CL<sub>50</sub> que provocou efeito agudo em 50% dos organismos no período de 96 horas.

A Tabela 3.4 apresenta um resumo das condições gerais do teste de toxicidade aguda com o *Danio rerio*.

**Tabela 3.4 - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com *Danio rerio*.**

Condições-teste	
Sistema de teste	estático, sem renovação de água de diluição
Duração do teste	96 horas
Água de diluição	natural, com dureza de 40-48 mg de CaCO <sub>3</sub> /L
Tamanho do frasco-teste	5 litros
Volume final	2,5 litros
Renovação da amostra-teste	não
N <sup>o</sup> de concentrações (g L <sup>-1</sup> )	sete (Lubrax), seis (W3), mais controle
N <sup>o</sup> de FSA (%)	dez (Lubrax e W3), mais controle
N <sup>o</sup> de organismos/recipiente	10
N <sup>o</sup> de réplicas	2
Alimentação	nenhuma
Fotoperíodo	16 horas de luz
Temperatura	23 ± 1 °C
Oxigênio dissolvido	6-8 mg/L
pH	7-8
Critério de avaliação de efeito	mortalidade
Expressão dos resultados	CL <sub>50</sub> (mg/L)
Critério de aceitação do teste	> 90% de sobrevivência dos organismos-controle

### 3.3.2.8. Análise cromatográfica da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos

A análise cromatográfica da fração solúvel em água foi realizada no laboratório Bioagri Ambiental Ltda em Piracicaba – SP. Para o ensaio foi utilizada a mesma amostra da fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 e Lubrax empregada no ensaio de toxicidade com o organismo *Danio rerio*.

Para a FSA do fluido dielétrico Lubrax analisou-se os n-alcenos n-C<sub>8</sub> a C<sub>36</sub> e para a FSA do fluido dielétrico W3 os n-C<sub>8</sub> a n-C<sub>33</sub>. Para a determinação dos n-alcenos utilizou-se a metodologia Environmental Protection Agency 8015C (EPA, 2007a) e para o preparo adotou-se o Environmental Protection Agency 3550C (EPA, 2007b). As descrições das metodologias de análises encontram-se no Anexo 01.

Para encontrar a solubilidade das amostras dos fluidos dielétricos na FSA, considerou-se o sistema como solução ideal e utilizou-se a seguinte relação (Equação 3.3):

$$S_{mistura} = \sum_{i=1}^{nc} W_i \cdot S_i \quad (3.3)$$

Onde:



### 3.3.3.2.Preparo da água de diluição: solução salina

A solução salina para a execução dos testes de toxicidade foi preparada na concentração de 3,5% (m/v). Para isso pesou-se 23 g de NaCl,  $11,0 \pm 0,1$  g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $4,0 \pm 0,1$  g de  $Na_2SO_4$ ,  $1,3 \pm 0,1$  g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e  $0,7 \pm 0,1$  g de KCl e adicionou a 1 litro de água destilada. Com uma solução de  $Na_2CO_3$  ajustou-se o pH para 7,8 – 8,2. A solução salina foi aerada antes do início dos testes para saturação de oxigênio.

### 3.3.3.3.Análises físico-químicas da água de diluição

As análises físico-químicas realizadas durante o experimento foram as seguintes: salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH. Para a realização dessas análises utilizou-se o medidor Multiparâmetro modelo AK88, marca AKSO. Essas análises foram monitoradas no início e no final dos ensaios. As faixas de trabalho do equipamento encontram-se na Tabela 3.5.

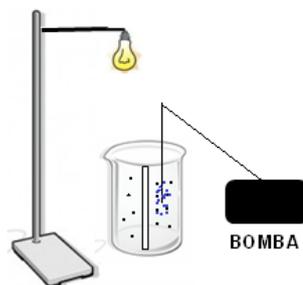
**Tabela 3.5** - Faixas de trabalho do equipamento

Parâmetros	Faixa de medição	Resolução
Salinidade	0 a 42 ppt	0,1 ppt
Temperatura	0 a 60 <sup>o</sup> C	0,1
Oxigênio dissolvido	0 a 30 mg/L	0,1 mg/L
pH	2 a 12	0,01

### 3.3.3.4.Eclosão dos cistos de *Artemia salina*

Os cistos de *Artemia salina* foram adquiridos comercialmente e expostos à solução salina na concentração 3,5% (m/v), sob aeração constante por 48 horas. O sistema para a eclosão dos cistos consistiu em um béquer que foi dividido ao meio por uma placa de polipropileno perfurada, onde os cistos foram colocados em um dos lados do sistema e do outro lado foi colocada uma lâmpada incandescente de 25 W. A temperatura ficou entre  $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$  com iluminação constante. O sistema permaneceu sob aeração por 48 horas, sendo este o tempo necessário para atingirem a fase de náuplio adequada ao teste. Após 48

horas observou-se que os náuplios migraram para o lado da luz e os mais resistentes foram utilizados no ensaio de sensibilidade e de toxicidade aguda (Figura 3.3).



**Figura 3.3** - Sistema para eclosão dos cistos de *Artemia salina*

### 3.3.3.5. Ensaio preliminar com a *Artemia salina*

Para estabelecer um intervalo de solução-teste a ser utilizado no experimento definitivo realizaram-se ensaios preliminares. A faixa de concentrações dos fluidos dielétricos utilizada foi obtida após uma série de experimentos preliminares, além dos dados já existentes no laboratório, com o intuito de conhecer a concentração que causa mortalidade a 100% dos organismos e a concentração onde não ocorre letalidade. O presente trabalho apresentará apenas algumas das concentrações que foram analisadas nos testes preliminares.

Para os ensaios preliminares com as concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) dos fluidos dielétricos foram preparados o controle, contendo somente solução salina e as *Artemias*, seis e cinco concentrações diferentes do fluido dielétrico Lubrax e W3, respectivamente, sendo elas:

- Fluido dielétrico Lubrax: 0,125; 0,5; 2; 8; 32 e  $96 \text{ g L}^{-1}$ .

- Fluido dielétrico W3: 0,05; 0,1; 0,4; 1,6 e  $64 \text{ g L}^{-1}$ .

Para os ensaios com a FSA (%), foi preparado um controle, contendo solução salina e os organismos teste e seis FSA diferentes dos fluidos dielétricos, as porcentagens utilizadas foram:

- Fluido dielétrico Lubrax e W3: 0,195; 0,39; 1,56; 6,25; 25 e 100% (m/m).

Os ensaios preliminares foram conduzidos nas mesmas condições dos ensaios definitivos descrito no item 3.3.3.7.

### **3.3.3.6. Teste de sensibilidade com a *Artemia salina***

Para que a sensibilidade do lote das *Artemias* utilizadas no presente estudo pudesse ser verificada, foram realizados testes com a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS) seguindo recomendação de ZAGATTO & BERTOLETTI (2008). Foi preparada uma solução-estoque de 100 mg/L com DSS ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ), diluído em água destilada e as concentrações utilizadas no teste foram as seguintes: 1; 2; 4 e 8 mg/L (concentrações já utilizadas pelo laboratório). Os testes foram realizados em triplicata.

Os testes de sensibilidade são realizados para se obter uma maior confiabilidade dos dados gerados no laboratório e foram feitos em paralelo aos testes de toxicidade. Os ensaios foram conduzidos sob as mesmas condições dos ensaios definitivos descrito no item 3.3.3.7, por um período de 48 horas.

Após o término do experimento, foi observada a letalidade em cada concentração e calculada a  $CL_{50}$  e o intervalo de confiança, expressando os resultados de sensibilidade através da construção da carta de controle (gráfico  $\bar{x}$  (média) e S (desvio padrão)).

### **3.3.3.7. Ensaio definitivo com a *Artemia salina***

Os testes definitivos foram realizados usando como referência as concentrações fornecidas nos testes preliminares. No primeiro ensaio definitivo foi preparado um controle contendo somente solução salina e os organismos teste, além de nove concentrações ( $g L^{-1}$ ) de fluido dielétrico Lubrax e sete de fluido dielétrico W3, sendo elas:

- Fluido dielétrico Lubrax: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e  $64 g L^{-1}$ .

- Fluido dielétrico W3: 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 1,8 e  $2,4 g L^{-1}$ .

No segundo experimento, contendo a fração solúvel em água (%) dos fluidos dielétricos foi preparado um controle contendo solução salina e as *Artemias* e as porcentagens utilizadas foram as seguintes:

- Fluido dielétrico Lubrax e W3: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100% (m/m).

Os testes foram realizados em tubos de ensaio de fundo chato com capacidade de 10 mL. Os tubos foram preparados com o controle (solução salina) e com a solução salina mais as concentrações dos fluidos dielétricos preestabelecidas, com quatro repetições.

Após a preparação de todos os tubos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de diâmetro adequado e ponta arredondada, colocou-se 10 náuplios de *Artemia salina* por tubo. O volume final do teste foi 5 mL em cada tubo de ensaio. O teste foi mantido com fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura variando em  $25 \pm 1$  °C, pH entre 7,8 a 8,2, salinidade em 35% (m/v) e oxigênio dissolvido maior que 5 mg/L, durante 48 horas.

Após a exposição de 48 horas, o número de organismos mortos em cada tubo foi quantificado com auxílio de lupa, foram considerados mortos quando não mostraram nenhum movimento durante 10 segundos. Os resultados foram considerados válidos se, no término do período de ensaio, a porcentagem dos organismos mortos no controle não excedia 10%.

Os parâmetros físico-químicos, como oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura e pH foram monitorados no início e no final dos ensaios, pois podem afetar o andamento do teste.

Ao término do ensaio, foi calculada a média aritmética da porcentagem de mortalidade para cada concentração em relação ao número total de organismos utilizados e então calculada a CL<sub>50</sub> que provocou efeito agudo em 50% dos organismos no período de 48 horas.

A Tabela 3.6 apresenta um resumo das condições gerais dos testes de toxicidade aguda com o *Artemia salina*.

**Tabela 3.6** - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Condições-teste	
Sistema de teste	estático, sem renovação de solução salina
Duração do teste	48 horas
Água de diluição	solução salina
Tamanho do frasco-teste	10 mL
Volume final	5 mL
Renovação da amostra-teste	não
Idade dos organismos	48 horas
N <sup>o</sup> de concentrações (g L <sup>-1</sup> )	nove (Lubrax), sete (W3), mais controle
N <sup>o</sup> de FSA (%)	nove (Lubrax e W3), mais controle
N <sup>o</sup> de organismos/recipiente	10
N <sup>o</sup> de réplicas	4

**Tabela 3.6** - Resumo das condições de teste de toxicidade aguda com *Artemia salina* (continuação)

Fotoperíodo	12 horas de luz
Temperatura	25 ± 1 °C
Salinidade	35%
Oxigênio dissolvido	5-6 mg/L
pH	7,8 a 8,2
Critério de avaliação de efeito	mortalidade
Expressão dos resultados	CL <sub>50</sub> (mg/L)
Critério de aceitação do teste	> 90% de sobrevivência dos organismos-controle

---

### 3.3.4. Expressão dos Resultados dos Testes de Toxicidade

Os resultados dos testes de toxicidade aguda para o *Danio rerio* e para a *Artemia salina* foram expressos de acordo com os seguintes cálculos:

Cálculo da CL<sub>50</sub> (mg/L): concentração letal média, que causa efeito aguda em 50% dos organismos teste, em exposição de 48 horas para a *Artemia salina* e 96 horas para o *Danio rerio*.

### 3.3.5. Método estatístico utilizado

Os resultados obtidos dos ensaios com o *Danio rerio* e com a *Artemia salina* nos dois experimentos de toxicidade com os fluidos dielétricos foram submetidos a análise pelo método Probit, descrito por BLISS (1935), e que foi empregado para estimar as concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) dos fluidos dielétricos. A estimação de CL<sub>50</sub> foi realizada utilizando o pacote estatístico BioStat 2009 Professional 5.8.9, com limites de 95% de confiança. Os valores da CL<sub>50</sub> para os dielétricos brutos foram expresso em mg/L e para a fração solúvel em água em porcentagem (%). Os gráficos referentes as curvas de dose-resposta geradas após análise de Probit foram feitas no Origin<sup>®</sup> 8.

## 3.4. Ensaio de toxicidade em solo contaminado com fluidos dielétricos utilizando a soja (*Glycine max L.*) como bioindicador

### 3.4.1. Área experimental e caracterização do solo

Os experimentos para avaliar os efeitos de toxicidade na soja plantada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax foram

conduzidos em casa de vegetação da Fazenda Escola pertencente ao Centro Universitário Fundação Assis Gurgacz, na cidade de Cascavel – PR, localizada entre latitudes de 24°56'25.39" S; 24°56'45.39" S e longitudes 53°30'9.89" O; 53°31'17.01"O.

O solo utilizado foi coletado em área situada no perímetro da Fazenda Escola sendo classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico, de textura argilosa, tendo como característica alta fertilidade e altos teores de ferro (EMBRAPA, 2006). As características químicas do solo foram caracterizadas a partir de amostras coletadas por meio de trados tipo sonda a uma profundidade 0 – 20 cm e foram encaminhadas ao Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR.

### **3.4.2. Espécie em estudo**

A espécie escolhida para os ensaios de toxicidade em solo contaminado com fluidos dielétricos foi a soja (*Glycine max L.*), pois é a principal cultura agrícola do país, tendo como um dos maiores estados produtores o estado do Paraná. A cultivar de soja selecionada para avaliar os efeitos de toxicidade na germinação, no crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas em solos contaminados com os fluidos foi a 95R51, pertence à Companhia DuPont Pioneer, devido a sua adaptação e recomendação para o plantio no estado do Paraná. Apresenta ciclo de 115-125 dias, hábito de crescimento indeterminado, cor da flor roxa, época de semeadura de outubro a dezembro, é tolerante ao acamamento, resistente ao herbicida glifosato e possui elevado potencial produtivo.

### **3.4.3. Estrutura e condução dos experimentos**

Utilizou-se vasos de polietileno com capacidade de 20 L, com diâmetros de 30 e 37 cm na parte inferior e superior, respectivamente, e 32 cm de altura com alguns orifícios na parte inferior para drenar a água. Os vasos foram preenchidos com 15 kg de solo, previamente contaminados com as diferentes concentrações dos fluidos dielétricos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial (2x7)+1, sendo: dois tipos de fluidos dielétricos novos (W3 e Lubrax), sete concentrações: (0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10% (m/m)) e um tratamento controle adicional (sem aplicação de fluido dielétrico), totalizando 60 parcelas experimentais.

Para a contaminação do solo foram calculadas as massas dos fluidos dielétricos para cada concentração e a homogeneização foi realizada com o auxílio de carrinho de mão e enxada. A montagem do experimento consistiu de quatro repetições para cada concentração. Os cálculos de massa são expressos pela Equação (3.4).

$$\text{Fluido dielétrico}_{\text{massa}}(g) = Q \times C \div 100 \text{ (percentual)} \quad (3.4)$$

onde:

Q = quantidade total de solo (kg)

C = Concentração de fluido dielétrico (%)

Concentração 0% (controle):

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = sem contaminação

Concentração 0,5%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 0,5 ÷ 100 = 0,075 kg = 75 g

Concentração 1,0%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 1,0 ÷ 100 = 0,15 kg = 150 g

Concentração 2,0%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 2,0 ÷ 100 = 0,30 kg = 300 g

Concentração 2,5%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 2,5 ÷ 100 = 0,375 kg = 375 g

Concentração 5,0%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 5,0 ÷ 100 = 0,750 kg = 750 g

Concentração 7,5%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 7,5 ÷ 100 = 1,125 kg = 1125 g

Concentração 10%:

*Fluido dielétrico*<sub>massa</sub>(g) = 15 kg de solo x 10 ÷ 100 = 1,5 kg = 1500 g

Após a montagem do experimento semeou-se vinte sementes de soja por recipiente e os mesmos foram mantidos em casa de vegetação com temperatura controlada de

$26 \pm 2$  °C e umidade relativa do ar de  $65 \pm 5\%$ , receberam rega diária (40 mL de água por vaso) com fotoperíodo de 12 horas. Além disso, o controle fitossanitário e a eliminação de ervas daninhas foram realizados conforme necessário.

O cultivo da soja foi realizado por três anos seguidos: primeiro plantio (06/10/14 a 09/02/15), segundo plantio (10/09/15 a 14/01/16) e terceiro plantio (04/10/16 a 10/02/17). Para cada novo plantio foi utilizado o mesmo solo contaminado. Ele foi retirado do vaso, colocado em um carrinho de mão, homogeneizado com o auxílio de uma enxada e devolvido para o vaso. Após a homogeneização do solo realizou-se o plantio empregando-se vinte sementes de soja por recipiente.

Transcorrido a semeadura a cada dois dias foi avaliada a emergência da soja e aos vinte e um dias após o plantio, com a emergência completa das plântulas foi feito o desbaste, a fim de evitar competição entre plantas, deixando-se cinco plântulas uniformes e equidistantes por vaso. Após um ciclo de 120 dias de cultivo, a soja foi colhida e avaliou-se: a altura das plantas, comprimento radicular, diâmetro do caule, massa seca de raízes, número de vagens por plantas, número de grãos por plantas, massa de mil grãos e produtividade.

O solo teve suas propriedades químicas determinadas em todas as concentrações estudadas, bem como o teor de óleos e graxas. Estas análises foram feitas no solo antes do plantio e no final do ciclo da cultura (120 dias) de cada concentração estudada nos três anos de plantio.

#### **3.4.4. Análise dos atributos químicos do solo**

As características químicas do solo foram caracterizadas a partir de amostras coletadas por meio de trados tipo sonda a uma profundidade 0 – 20 cm e foram encaminhadas ao Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR - Brasil. O solo teve suas propriedades químicas determinadas no primeiro ano, antes do plantio e, no final do terceiro ano de cultivo, para cada concentração estudada. As análises de solo realizadas foram: pH, acidez potencial, cálcio trocável e magnésio trocável, alumínio trocável, fósforo disponível, potássio trocável, carbono. Com algumas dessas variáveis foi determinada capacidade de troca de cátions (CTC) e índice de saturação por bases (\*V). As metodologias utilizadas seguiram o manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes (EMBRAPA, 2009) e encontram-se no Anexo 02.

### 3.4.5. Análise de Teor de Óleos e Graxas (TOG)

O parâmetro químico quantificador do processo de degradação do fluido dielétrico W3 e Lubrax no solo foi definido como “óleos e graxas”. A análise do teor de óleos e graxas no solo foi determinada antes do plantio e no final do ciclo da cultura (120 dias) de cada concentração estudada, nos três anos de plantio. Para a retirada das amostras de solo foi utilizada o trado tipo Sonda 100 cm, fabricado pela SONDATERRA®, os quais são confeccionados em aço inoxidável, sendo a ponteira em aço carbono. De cada vaso foi retirada uma amostra com profundidade de 15 cm. Após cada retirada de amostra de solo em cada vaso, houve a assepsia do trado. As amostras foram colocadas em sacos novos de plástico de alta resistência, limpos e translúcidos, os quais foram identificados e encaminhados para o laboratório de química do Centro Universitário Assis Gurgacz.

O teor de óleos e graxas dos fluidos dielétricos foi quantificado pelo método de extração em aparelho tipo Soxhlet, segundo a American Public Health Association (APHA, 2012). As amostras úmidas de solo de cada tratamento foram secas a temperatura ambiente, em seguida pesou-se em balança analítica de precisão, modelo ML204, marca Mettler Toledo, 5 g de cada amostra e colocou em cartuchos feitos de papel de filtro para evitar vazamentos. Os cartuchos com as amostras foram colocados no aparelho extrator de gordura Soxhlet modelo MA487, marca Marconi, o tempo de extração foi de 6 horas. Utilizou-se o solvente hexano p.a. marca Synth para a extração do material oleoso presente nas referidas amostras. O material oleoso extraído das amostras de solo foi coletado em balões com capacidade de 250 mL que foram mantidos sobre uma placa aquecedora modelo AA-2050, marca Gehaka. Depois de concluída a extração colocou-se o balão para secar em estufa a uma temperatura de aproximadamente 105 °C. Em seguida o balão foi colocado em um dessecador, sendo realizadas pesagens até se obter peso constante. O mesmo procedimento foi realizado a partir de amostra de solo sem os indícios de contaminação por material oleoso (branco da amostra). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata, sendo os valores apresentados à média dos obtidos em cada procedimento.

O valor do teor de óleos e graxas foi calculado através da Equação 3.5:

$$\text{Teor de Óleos e Graxas (\%)} = \frac{(A-B)}{C} * 100 \quad (3.5)$$

A = massa do balão com óleo impregnado (g)

B = massa do balão vazio (g)

C = massa da amostra de solo (g)

### **3.4.6. Avaliações fitotécnicas**

(i) Emergência da soja: Vinte e um dias após a semeadura efetuou-se a contagem dos cotilédones acima da superfície do solo por vaso, o resultado foi expresso em porcentagem.

(ii) Altura das plantas e comprimento radicular: Retiraram-se cuidadosamente as plantas dos vasos eliminando o excesso de terra e com o auxílio de régua graduada, em centímetro, efetuaram-se as medidas. Para a altura das plantas mediu-se a distância entre a superfície do solo e o ápice do caule. E para a raiz mediu-se o comprimento a partir do ápice até sua inserção no caule.

(iii) Diâmetro do caule: Foi realizada na haste principal, acima do nível do solo, com o auxílio do paquímetro digital, na escala de milímetro.

(iv) Matéria seca de raízes: Esta análise seguiu a metodologia da Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2012). As plantas foram lavadas e secas com auxílio de papel toalha e as partes foram separadas. Pesou-se as partes em balança analítica de precisão, modelo ML204, marca Mettler Toledo, obtendo assim a massa fresca. Após determinação da massa fresca, as partes das plantas foram secadas a 65 °C durante 72 h (até massa constante) em estufa com circulação de ar forçada modelo CE - 220, marca CIENLAB e em sequência pesadas novamente.

#### **3.4.6.1. Produtividade**

Para determinar a produtividade da soja nos solos contaminados com as diferentes concentrações dos fluidos dielétricos, as plantas foram retiradas dos vasos e as vagens e os grãos foram retirados de forma manual. O número de vagens e de grãos por planta foi realizado através do somatório total de vagens e grãos presentes nas plantas. O número de grãos por vagem foi calculado pela divisão do número de grãos pelo respectivo número de vagens por planta. A massa de mil grãos foi obtida através da pesagem de todos os grãos da planta e transformação direta para massa de mil grãos (BRASIL, 1992). A

produtividade estimada foi determinada em gramas por planta, após correção do teor de água para 13%.

### 3.4.7. Análises Estatísticas

Para a interpretação dos dados, realizou-se a análise de variância para todos os caracteres, adotando-se o modelo estatístico expresso pela Equação (3.6).

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + TC_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (3.6)$$

$Y_{ijk}$ : valor da característica para o  $i$ -ésimo tipo de óleo ( $i = 1, 2, \dots, g$ ) no  $j$ -ésimo delineamento inteiramente casualizado ( $j = 1, 2, \dots, b$ ) na  $k$ -ésimo concentração de óleo ( $k = 1, 2, \dots, a$ );

$\mu$ : média geral;

$T_i$ : tipos de óleo;

$C_j$ : concentrações de óleo;

$TC_{ij}$ : efeito da interação dos tipos com as concentrações dos óleos;

$\varepsilon_{ijk}$ : erro aleatório

Adicionalmente, foram estimados os coeficientes de variação para cada um dos atributos avaliados.

Com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos de diferentes concentrações dos fluidos dielétricos sobre os caracteres de importância fitotécnica e dos teores de óleos e graxas (TOG), os dados foram submetidos à análise de regressão. O modelo selecionado foi aquele em que os parâmetros (coeficientes de regressão) apresentaram significância, com coeficiente de determinação de elevada magnitude e que melhor atendeu as explicações do evento biológico.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2006).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

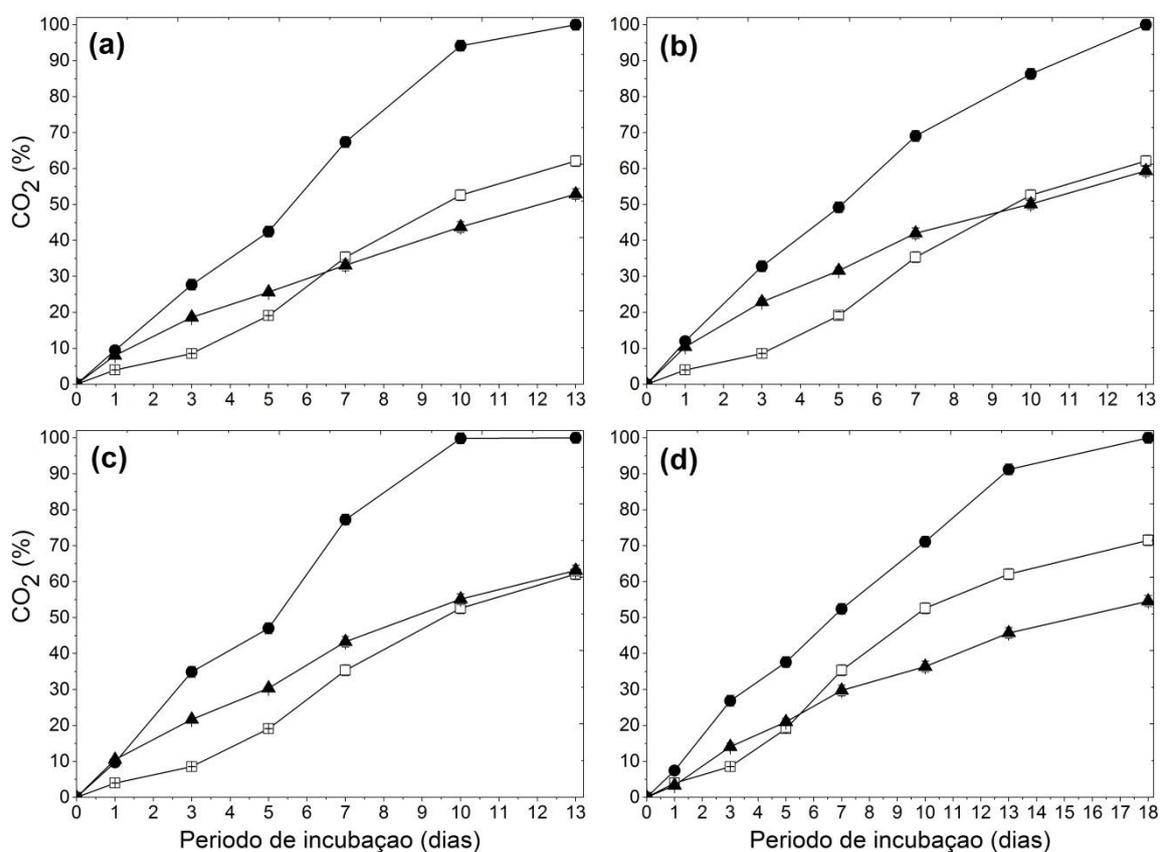
### 4.1. Avaliação da biodegradabilidade imediata

O número de células viáveis obtidas no inóculo foi de  $4,9 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^4$  UFC/mL, estando de acordo com a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 301 B, 1992). Os resultados da análise do teor de carbono total de cada um dos fluidos dielétricos estudados encontram-se na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Análise teor de carbono total

Fluidos dielétricos	Carbono (%)
Crambe	$69,34 \pm 0,03$
Soja (W3)	$68,91 \pm 0,02$
Canola (W6)	$48,62 \pm 0,02$
Girassol (W9)	$69,48 \pm 0,01$
Mineral (Lubrax)	$34,56 \pm 0,01$

A Figura 4.1 (a), (b), (c) e (d) apresenta a produção de CO<sub>2</sub>, calculados a partir dos volumes de HCl gastos na titulação dos frascos com Ba(OH)<sub>2</sub> para o fluidos vegetais.



**Figura 4.1** - Percentagem de CO<sub>2</sub> liberado nas soluções: □ padrão de benzoato de sódio, ● substância teste dielétrica: (a) crambe, (b) W3, (c) W6 e (d) W9, ▲ inibição em função do período de incubação em dias.

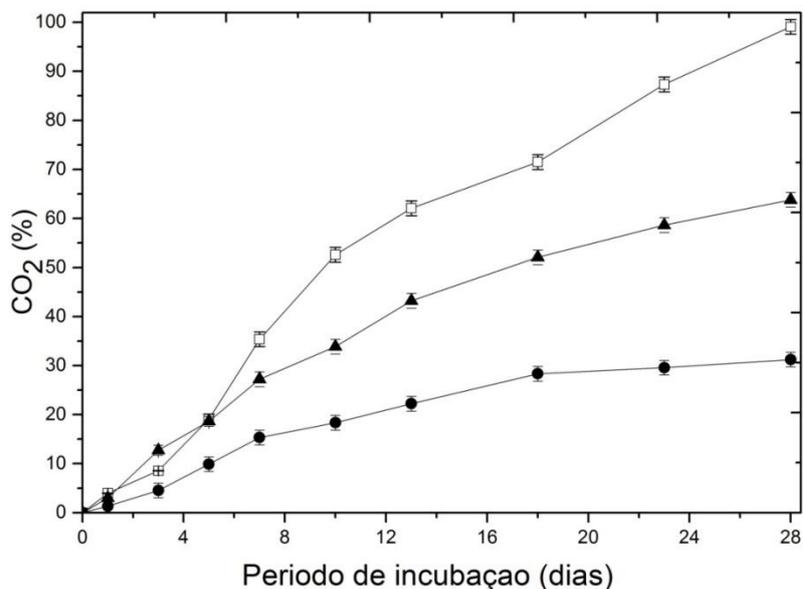
O padrão biodegradável (benzoato de sódio) apresentou 62,08% de biodegradação em 13 dias para os óleos de crambe (Figura 4.1 (a)), W3 (Figura 4.1 (b)), W6 (Figura 4.1 (c)) e Lubrax (Figura 4.2). Para o óleo de W9 (Figura 4.1 (d)) foi de 71,51%, em 18 dias. Todos atingiram 60% de evolução de CO<sub>2</sub> em 10 dias contados a partir do momento em que se observou 10% de evolução de CO<sub>2</sub>, e não excedeu o período máximo de 14 dias, visando à comprovação da viabilidade e atividade do inóculo, mostrando que o benzoato de sódio é considerado como facilmente biodegradável.

Os ensaios de inibição para as substâncias testes tiveram o objetivo de verificar a existência ou não de efeito inibitório dos fluidos dielétricos em estudo sobre o padrão biodegradável (benzoato de sódio). Segundo a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 301 B, 1992), a inibição deve atingir 25% de liberação de CO<sub>2</sub> em 14 dias. O fluido dielétrico de crambe (Figura 4.1 (a)), W3 (Figura 4.1 (b)) e W6 (Figura 4.1 (c)) no quinto dia atingiram respectivamente 25,62%, 31,59% e 30,36% e o W9 (Figura 4.1 (d)) apresentou 29,74% de inibição no sétimo dia. Os resultados mostraram que os fluidos dielétricos testados atingiram os 25% de liberação de CO<sub>2</sub> em menos de 14 dias, logo não são considerados inibitórios aos microrganismos.

As substâncias testes dielétricas de crambe (Figura 4.1 (a)), W3 (Figura 4.1 (b)) e W6 (Figura 4.1 (c)), atingiram 60% de evolução de CO<sub>2</sub> entre o quinto e sétimo dia do início de incubação e, 100% de carbono total se deram aos 13 dias. Na análise da substância teste dielétrica W9 (Figura 4.1 (d)), 100% de carbono total se deu aos 18 dias de incubação e os 60% de evolução de CO<sub>2</sub> ocorreram entre o oitavo e nono dia. Todas as substâncias testes dielétricas a base de óleo vegetal são consideradas como facilmente biodegradável, pois pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 301 B, 1992) todas atingiram 60% de evolução de CO<sub>2</sub> em 10 dias contados a partir do momento em que se observou 10% de evolução de CO<sub>2</sub>, não podendo exceder o período máximo de 14 dias.

Os ésteres naturais são classificados como biodegradáveis (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013), onde a degradação do óleo vegetal é inicialmente hidrolisado por lipases microbianas, sendo transformados em glicerol e ácidos graxos. O glicerol formado pode ser convertido à dihidroxicetona enquanto os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA pela beta-oxidação para posterior conversão a CO<sub>2</sub> através do ciclo de Krebs (BERG *et al.*, 2006).

A Figura 4.2 mostra a produção de CO<sub>2</sub> pelo período de incubação do fluido dielétrico mineral (Lubrux).

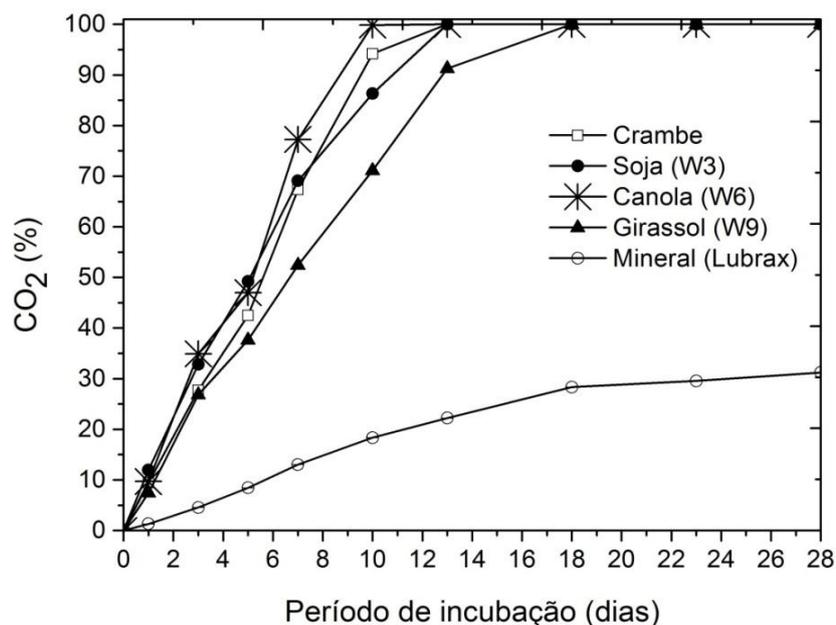


**Figura 4.2** - Percentagem de CO<sub>2</sub> liberado nas soluções: □ padrão de benzoato de sódio, ● substância teste dielétrica Lubrux, ▲ inibição em função do período de incubação em dias.

Para o Lubrux a inibição atingiu 27,22% no quinto dia. O resultado mostra que o fluido não é considerado inibitório aos microrganismos, pois atingiu 25% de liberação de CO<sub>2</sub> em menos de 14 dias. O resultado encontrado para a substância teste dielétrica Lubrux mostrou que a produção de CO<sub>2</sub> atingiu 31,22% de CO<sub>2</sub> durante 28 dias de incubação, não atingindo os 60% de evolução de CO<sub>2</sub> em 10 dias, demonstrando que esse fluido é de difícil degradação, sendo considerado como não facilmente biodegradável.

A metabolização dos hidrocarbonetos de cadeia linear (alcanos e alcenos) presentes no óleo mineral são primeiramente convertidos a alcoóis, aldeídos e em seguida a ácidos graxos, para somente depois serem convertidos pela beta-oxidação (FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2005). A degradação dos hidrocarbonetos aromáticos acontece pela conversão do substrato aromático em um metabólito dihidroxiaromático, tipicamente um catecol, em seguida enzimas denominadas dioxigenases fazem a quebra do anel do catecol e o produto resultante do anel é convertido em compostos como acetil-CoA, oxalato e piruvato, sendo os intermediários do processo respiratório (LEMOS *et al.*, 2009; DEON *et al.*, 2012).

Os resultados de biodegradabilidade imediata encontrados neste trabalho mostraram que os fluidos dielétricos vegetais testados, independente da oleaginosa usada para a sua produção, sofreram maior degradação pelos microrganismos em comparação com o fluido dielétrico mineral (Figura 4.3). O óleo mineral é formado por hidrocarbonetos de petróleo e possui uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias, certamente, não foi metabolizada na mesma velocidade que o óleo vegetal.



**Figura 4.3** - Percentagem de CO<sub>2</sub> liberado nas soluções das substâncias testes dielétricas óleo: □ crambe, ● W3, \* W6, ▲ W9 e ○ Lubrax em função do período de incubação em dias.

O trabalho de CECUTTI & AGIUS (2008) com biolubrificantes e lubrificante mineral também mostrou que os biolubrificantes são facilmente degradáveis e a taxa de biodegradabilidade final é significativamente maior do que o lubrificante mineral. Nos testes de avaliação da biodegradabilidade primária e final dos óleos lubrificantes de base que diferem na estrutura química, realizados por BERAN (2008), óleo de colza e óleos Poliéster sintéticos podem ser classificados como substâncias facilmente biodegradáveis enquanto os óleos poli (α-olefinas) (PAO 4 e PAO 6) e o óleo mineral convencional classificam-se como não facilmente biodegradáveis.

Nos próximos tópicos o fluido dielétrico vegetal usado para os ensaios será o de soja por ser o mais utilizado, devido ao baixo custo e alta eficiência.

## **4.2. Avaliação da toxicidade aguda com organismos aquáticos**

### **4.2.1. Toxicidade aguda com o organismo *Danio rerio***

#### **4.2.1.1. Análises físico-químicas da água de diluição durante o teste**

Neste trabalho, não foram observadas alterações significativas da água de diluição ao longo dos experimentos com os organismos expostos em contato direto às diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax, organismos expostos à fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 e Lubrax e no teste de sensibilidade com o *Danio rerio* que pudessem interferir nos resultados de mortalidade, estando todos dentro do limite estabelecido pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 203, 1992). A determinação dos parâmetros físico-químicos da água de diluição é de suma importância para a validação dos testes e para o controle laboratorial.

As variações de temperatura nos experimentos durante o período de exposição não tiveram alterações, ficando em  $23 \pm 1$  °C, permanecendo dentro da faixa aceitável de 21 a 25 °C conforme estabelece a OECD 203 (1992). O uso de um termostato eletrônico para o controle possibilitou o equilíbrio da temperatura em todos os compartimentos utilizados durante as baterias de ensaios.

Os níveis de oxigênio dissolvido também permaneceram acima de 60%, o recomendado para testes de toxicidade, onde 60% da saturação do ar corresponde a 5,0 mg/L do oxigênio dissolvido na água (OECD 203, 1992).

As alterações do pH também estão dentro da faixa aceitável estipulada pela OECD 203 (1992) que é de 6,0 a 8,5.

Para a condutividade os valores ficaram dentro do estabelecido pela OECD 203 (1992) que é de 120 a 180  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Em relação à dureza da água de diluição, as concentrações dos fluidos dielétricos não foram suficientes para causar alterações significativas neste parâmetro durante os ensaios. Os valores obtidos ficaram dentro da faixa tolerável de variação segundo a norma que é de 40 e 48 mg/L.

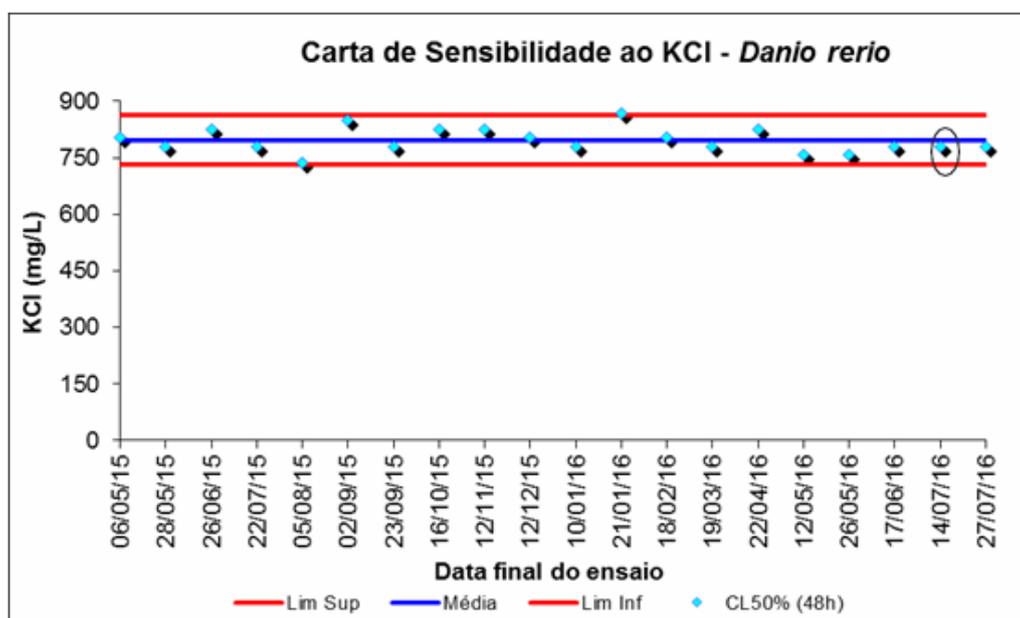
Os resultados encontrados durante os ensaios com o *Danio rerio* são mostrados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** - Resultados das análises físico-químicas durante os experimentos com *Danio rerio*

Parâmetros	Faixas dos experimentos	Unidades
Oxigênio dissolvido	6 a 8	mg/L
pH	6 a 8,5	-
Temperatura	23 ±1	°C
Condutividade elétrica	120 a 180	µS/cm

#### 4.2.1.2. Teste de sensibilidade com o *Danio rerio*

O teste de sensibilidade foi realizado em paralelo aos testes de toxicidade aguda (testes definitivos), a fim de se obter resultados comparáveis. Utilizou-se para o teste a substância referência cloreto de potássio (KCl) e, com os percentuais de mortalidade dos peixes *Danio rerio*, pode-se calcular a CL<sub>50</sub> (48h) para o teste de sensibilidade e formular a carta-controlê (Figura 4.4). O valor da CL<sub>50</sub> (48h) foi de 779,42 mg/L com (764,22 mg/L a 795,45 mg/L), ficando dentro do intervalo de sensibilidade esperado de 731,53 mg/L a 868,70 mg/L.



**Figura 4.4** - Carta controle da sensibilidade do organismo *Danio rerio* utilizando a substância de referência cloreto de potássio (KCl).

A partir da formulação da carta-controlê (Figura 4.4), pode-se afirmar que o organismo *Danio rerio* utilizado na realização deste estudo, possuem sensibilidade

adequada, pois os resultados obtidos permaneceram dentro do intervalo de confiança de  $\pm 2$  desvios-padrão em relação à média, conforme o que estabelece a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 203, 1992), validando a confiabilidade e a repetibilidade dos testes.

Segundo ZAGATTO & BERTOLETTI (2008) a realização dos testes com substâncias de referência para a frequente atualização da carta-controle é necessário, pois esta tem como intuito estabelecer uma faixa de aceitação dos valores obtidos através do cálculo estatístico da  $CL_{50}$ , apresentando a sensibilidade dos organismos à substância de referência, atestando a repetibilidade e reprodutividade dos ensaios.

#### 4.2.1.3. Toxicidade aguda com o organismo *Danio rerio*: Fluido dielétrico Lubrax e W3

Nos ensaios preliminares com o fluido dielétrico Lubrax não ocorreu mortalidade nas concentrações inferiores a  $0,625 \text{ g L}^{-1}$ . Já as concentrações superiores a  $60 \text{ g L}^{-1}$  causaram mortalidade a 100% dos organismos. No controle não foi observado mortalidade dos organismos. Com os resultados obtidos a partir do ensaio preliminar definiram-se as concentrações para o ensaio definitivo, sendo elas: 0,781; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e  $50 \text{ g L}^{-1}$ . A Tabela 4.3 apresenta a mortalidade acumulativa do *Danio rerio* durante o período de exposição ao fluido dielétrico Lubrax.

**Tabela 4.3** - Mortalidade acumulativa do *Danio rerio* durante o período de exposição ao fluido dielétrico Lubrax

Concentrações do fluido dielétrico Lubrax	Organismos expostos	Organismos mortos (96 horas)		Porcentagem média de organismos mortos (96 horas)
		R1	R2	
$\text{g L}^{-1}$				(%)
Controle	10	0	0	0
0,781	10	2	2	20
1,562	10	4	3	35
3,125	10	5	6	55
6,25	10	8	7	75
12,5	10	9	9	90
25	10	10	10	100
50	10	10	10	100

Em relação à mortalidade dos organismos expostos nas diferentes concentrações de fluido dielétrico Lubrax observou-se a ocorrência de mortalidade após 24 horas de exposição. A mortalidade dos peixes para cada concentração estudada foi registrada após 24; 48; 72 e 96 horas de exposição. Após as 96 horas nas concentrações de 0,781; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5 g L<sup>-1</sup> a mortalidade média foi de 20%; 35%; 55%; 75% e 90%, respectivamente. Nas concentrações de 25 e 50 g L<sup>-1</sup> foi registrada 100% de mortalidade. A sobrevivência do controle foi de 100%. Os peixes do grupo controle apresentaram comportamento normal durante o período de teste. Dentre os que sobreviveram nas concentrações analisadas alguns apresentaram perda de equilíbrio, nadando na vertical.

Pela análise de regressão linear Probit, pode-se estimar a concentração da amostra em que 50% dos organismos morreram (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008), para isso, utilizou-se os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda (Tabela 4.3). O valor médio estimado da CL<sub>50</sub> do fluido dielétrico Lubrax para o peixe *Danio rerio* foi de 2,46 g L<sup>-1</sup> (1,69 g L<sup>-1</sup> a 3,38 g L<sup>-1</sup>). Os resultados dos pontos estimados pelo Probit das concentrações versus porcentagem de mortalidade estão representados na Figura 4.5 (a).

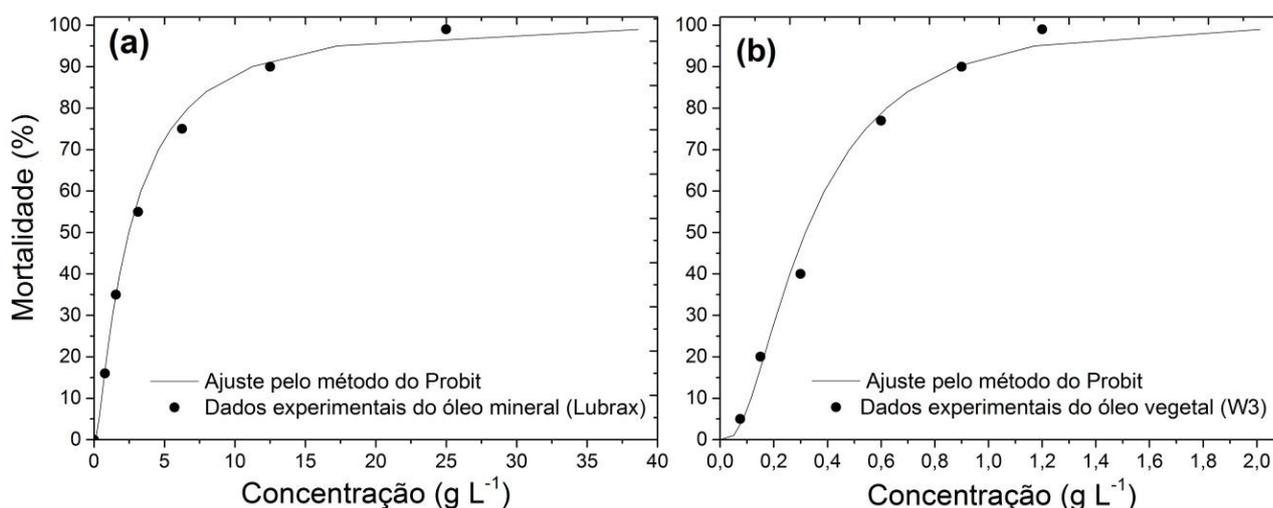
Em relação aos ensaios preliminares utilizando fluido dielétrico W3 não foi observado mortalidade nas concentrações inferiores a 0,0625 g L<sup>-1</sup>. Nas concentrações superiores a 2 g L<sup>-1</sup>, a mortalidade foi de 100%. O controle teve 100% de sobrevivência. Com base nesses resultados, definiram-se as concentrações para o ensaio definitivo de toxicidade, sendo elas: 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 g L<sup>-1</sup>. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** - Mortalidade acumulativa do *Danio rerio* durante o período de exposição ao fluido dielétrico W3

Concentrações do fluido dielétrico W3	Organismos expostos	Organismos mortos (96 horas)		Porcentagem média de organismos mortos (96 horas)
		R1	R2	
g L <sup>-1</sup>				(%)
Controle	10	0	0	0
0,075	10	1	0	5
0,15	10	2	2	20
0,3	10	4	4	40
0,6	10	7	8	75
0,9	10	9	9	90
1,2	10	10	10	100

No ensaio definitivo com *Danio rerio* não houve mortalidade no período de 24 horas de exposição à substância teste. Nas concentrações de 0,075; 0,15; 0,3; 0,6 e 0,9 g L<sup>-1</sup> o índice de mortalidade médio, após 96 horas de exposição, foi de 5%; 20%; 40%; 75% e 90%, respectivamente. Os peixes submetidos a 1,2 g L<sup>-1</sup> apresentaram 100% de mortalidade nas 96 horas. Já no controle não houve mortalidade.

Com os dados obtidos a partir do teste de toxicidade aguda com o *Danio rerio* (Tabela 4.4), pode-se estimar o valor da CL<sub>50</sub>, após 96 dias de exposição à substância teste. Para isso, utilizou-se a análise de regressão linear Probit, que é um método usado para estimar doses críticas em ensaios de dose-resposta (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). O valor médio estimado da CL<sub>50</sub> do W3 para o peixe *Danio rerio* foi de 0,318 g L<sup>-1</sup> (0,247 g L<sup>-1</sup> 0,4 g L<sup>-1</sup>). Os resultados dos pontos estimados pelo Probit das concentrações versus porcentagem de mortalidade estão representados na Figura 4.5 (b).



**Figura 4.5** - Porcentagem de mortalidade do organismo *Danio rerio* em função da concentração em g L<sup>-1</sup> dos fluidos dielétricos (a) Lubrax e (b) W3.

Quanto menor o valor de CL<sub>50</sub>, mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste. Logo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o contato direto dos organismos avaliados com o fluido dielétrico W3, causou maior mortalidade do que com o Lubrax. Para complementar as verificações foi analisado a fração solúvel em água desses fluidos dielétricos, pois é a porção que entra no ambiente aquático com maior facilidade.

#### 4.2.1.4. Toxicidade aguda com o organismo *Danio rerio*: Fração Solúvel em Água (FSA) do fluido dielétrico Lubrax e W3

Os testes preliminares de toxicidade aguda com a FSA do fluido dielétrico Lubrax utilizando o organismo *Danio rerio* não apresentaram toxicidade nas concentrações inferiores a 0,39% e houve 100% de mortalidade na concentração sem diluição. No controle não foi observado mortalidade dos organismos. Com os resultados obtidos a partir do ensaio preliminar definiram-se as concentrações para o ensaio definitivo, sendo elas: 0,195; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%. Os resultados do teste definitivo encontram-se na Tabela 4.5.

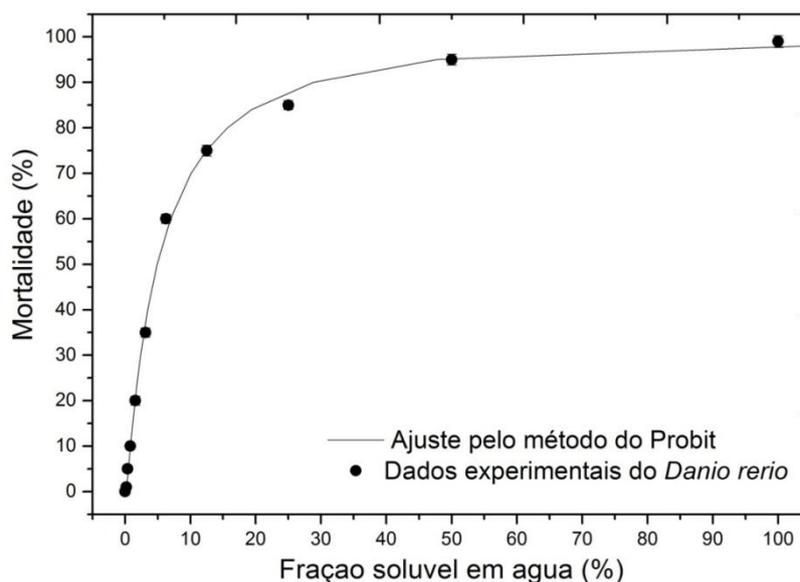
**Tabela 4.5** - Mortalidade acumulativa do *Danio rerio* durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico Lubrax

FSA do fluido dielétrico Lubrax	Organismos expostos	Organismos mortos (96 horas)		Porcentagem média de organismos mortos (96 horas)
		R1	R2	
(%)				(%)
Controle	10	0	0	0
0,195	10	0	0	0
0,39	10	0	1	5
0,78	10	1	1	10
1,56	10	2	2	20
3,12	10	4	3	35
6,25	10	6	6	60
12,5	10	8	7	75
25	10	9	8	85
50	10	10	9	95
100	10	10	10	100

No ensaio definitivo a mortalidade dos peixes para cada concentração estudada foi registrada após 24; 48; 72 e 96 horas de exposição. Observou-se mortalidade após 24 horas do início da incubação e constatou-se a morte de todos os organismos avaliados na solução sem diluição (100%). Não houve mortalidade no tratamento controle.

A mortalidade apresentou relação direta com a concentração do contaminante (Tabela 4.5). A  $CL_{50}$  da FSA do fluido dielétrico Lubrax foi calculada pelo método estatístico Probit, com análise de regressão linear e a concentração necessária para causar

efeito letal para 50% dos peixes em 96 horas foi de 4,89% (3,52% a 6,82%). Os resultados das concentrações versus porcentagem de mortalidade, estimados pelo Probit, estão representados na Figura 4.6.



**Figura 4.6** - Porcentagem de mortalidade do organismo *Danio rerio* em função das concentrações da FSA do fluido dielétrico Lubrax

Foram observadas algumas alterações comportamentais nos peixes expostos a FSA do fluido dielétrico Lubrax como: letargia, imobilidade (mesmo com a aproximação do observador), além de desequilíbrio, acompanhado de nado errático. A intensidade dessas alterações comportamentais foi gradativa, com maior ocorrência conforme o aumento das concentrações.

Em relação aos ensaios preliminares de toxicidade aguda com a FSA do fluido dielétrico W3 observou-se que nas concentrações inferiores a 0,39%, na concentração 100% e no controle não foi observado mortalidade dos organismos. Com os resultados obtidos a partir do ensaio preliminar definiram-se as concentrações para o ensaio definitivo, sendo elas: 0,195; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.

Os experimentos definitivos realizados com a fração solúvel em água do fluido dielétrico W3, não causaram efeito tóxico a 50% dos organismos *Danio rerio*, não foi observado mortalidade em nenhuma concentração estudada após as 96 horas. Os resultados são apresentados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** - Mortalidade acumulativa do *Danio rerio* durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico W3

FSA do fluido dielétrico W3	Organismos expostos	Organismos mortos (96 horas)		Porcentagem média de organismos mortos (96 horas)
		R1	R2	
(%)				(%)
Controle	10	0	0	0
0,195	10	0	0	0
0,39	10	0	0	0
0,78	10	0	0	0
1,56	10	0	0	0
3,12	10	0	0	0
6,25	10	0	0	0
12,5	10	0	0	0
25	10	0	0	0
50	10	0	0	0
100	10	0	0	0

O estudo da fração solúvel em água do fluido dielétrico Lubrax mostrou ser mais tóxica que o W3, onde este apresentou ser não tóxico ao organismo *Danio rerio*. No item 4.2.2 estudou o comportamento da *Artemia salina* em relação a esses fluidos, a fim de identificar a dose na qual esses efeitos ocorrem frente a outro organismo.

#### **4.2.2. Toxicidade aguda com o organismo *Artemia salina***

##### **4.2.2.1. Análises físico-químicas da água de diluição durante o teste**

Os parâmetros de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e salinidade da água de diluição foram medidos e registrados no início e no final do ensaio, em todas as concentrações estudadas. Não houve alterações significativas das variáveis físico-químicas entre os diferentes tratamentos com os fluidos dielétricos que pudessem interferir na mortalidade dos organismos. Os resultados físico-químicos que serão apresentados nesse tópico são referentes aos testes com os organismos expostos em contato direto às diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax, organismos expostos à fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 e Lubrax e do teste de sensibilidade com a *Artemia salina*.

Os níveis de oxigênio dissolvido permaneceram acima de 60%, onde 60% da saturação do ar corresponde a 5,0 mg/L do oxigênio dissolvido na água. As variações do pH também estão dentro da faixa aceitável que é de 6,0 a 8,5. As variações de temperatura nos experimentos durante o período de exposição permaneceram dentro da faixa aceitável de  $25 \pm 1$  °C e a salinidade ficou em 35% (m/v). Todas as variáveis analisadas seguiram o recomendado para testes de toxicidade em *Artemia salina* conforme estabelece MEYER *et al* (1982) e NASCIMENTO *et al.* (2002).

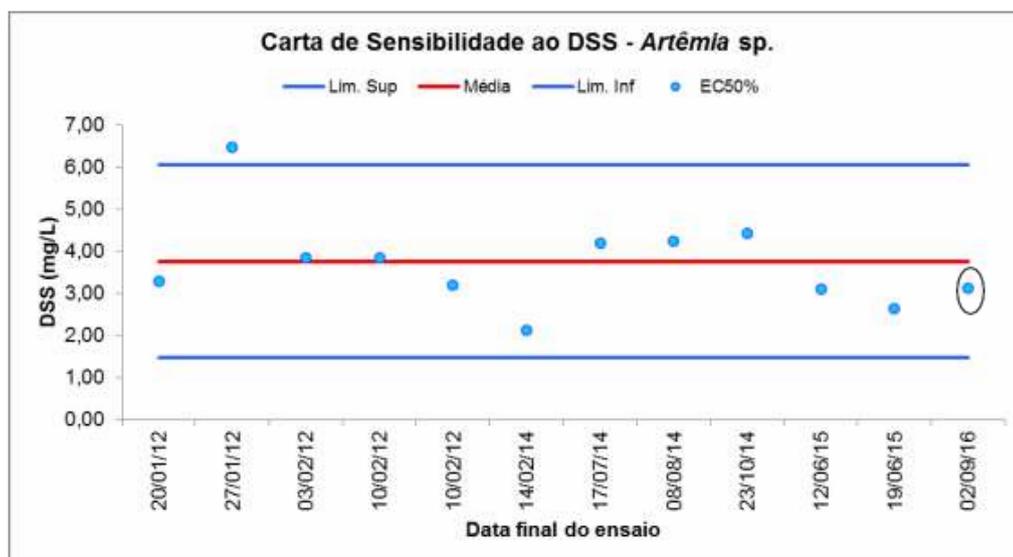
Os resultados encontrados durante os ensaios com *Artemia salina* são mostrados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** - Resultados das análises físico-químicas durante os experimentos com *Artemia salina*

Parâmetros	Faixas dos experimentos	Unidades
Oxigênio dissolvido	5 a 6,5	mg/L
pH	7 a 8,5	-
Temperatura	$25 \pm 1$	°C
Salinidade	35	ppt

#### 4.2.2.2. Teste de sensibilidade com a *Artemia salina*

O teste de sensibilidade foi avaliado com a substância referência dodecil sulfato de sódio (DSS) e o ensaio foi realizado em paralelo ao teste de toxicidade aguda (testes definitivos), a fim de se obter resultados que apresentem boa precisão analítica, aumentando a confiabilidade dos dados gerados no laboratório. Através dos percentuais de mortalidade da *Artemia salina* obteve-se a  $CL_{50}$  (48h) para o teste de sensibilidade e formulou-se a carta-controle (Figura 4.7). O valor da  $CL_{50}$  (48h) foi de 2,851 mg/L (2,261 mg/L a 3,051 mg/L), ficando dentro da faixa de aceitação esperada de 1,47 mg/L a 6,05 mg/L. Através do teste de sensibilidade pode-se afirmar que o organismo *Artemia salina* apresenta sensibilidade adequada. Os resultados obtidos ficaram compreendidos num intervalo de  $\pm 2$  desvios-padrão em relação à média, atestando a repetibilidade e reprodutividade dos ensaios.



**Figura 4.7** - Carta controle da sensibilidade do organismo *Artemia salina* utilizando a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS).

#### 4.2.2.3. Toxicidade aguda com o organismo *Artemia salina*: Fluido dielétrico Lubrax e W3

O ensaio preliminar com o fluido dielétrico Lubrax forneceu as seguintes informações: nenhuma mortalidade em concentrações inferiores a  $0,125 \text{ g L}^{-1}$ . Mortalidade de 100% dos organismos em concentrações superiores a  $96 \text{ g L}^{-1}$ . No controle obteve-se 100% de sobrevivência. A partir dos resultados do ensaio preliminar definiram-se as concentrações para o ensaio definitivo, sendo elas: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e  $64 \text{ g L}^{-1}$ . A sobrevivência do controle foi de 100%. Os resultados do teste definitivo são apresentados na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição ao fluido dielétrico Lubrax

Concentrações do fluido dielétrico Lubrax	Organismos expostos	Organismos mortos (48 horas)				Porcentagem média de organismos mortos (48 horas) (%)
		R1	R2	R3	R4	
$\text{g L}^{-1}$						
Controle	40	0	0	0	0	0
0,25	40	0	0	1	1	5
0,5	40	1	2	1	0	10
1	40	2	3	3	2	25

**Tabela 4.8 - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição ao fluido dielétrico Lubrax (continuação)**

2	40	4	4	3	3	35
4	40	5	5	5	4	48
8	40	6	6	6	5	58
16	40	7	7	7	6	68
32	40	9	8	9	8	85
64	40	9	10	10	10	98

No teste definitivo a mortalidade das *Artemias* para cada concentração estudada foi registrada após 48 horas de exposição. A mortalidade média nas concentrações de 0,25 a 4 g L<sup>-1</sup> ficou entre 5% a 48%. Nas concentrações de 8 a 64 g L<sup>-1</sup> a mortalidade média ficou entre 58% a 98%.

Com os dados de mortalidade obtidos no teste de toxicidade aguda (Tabela 4.8), estimou-se a CL<sub>50</sub> através da análise de regressão linear Probit. O valor médio estimado da CL<sub>50</sub> do fluido dielétrico Lubrax para a *Artemia salina* foi de 4,63 g L<sup>-1</sup> (3,49 g L<sup>-1</sup> 6,15 g L<sup>-1</sup>). O gráfico de dose-resposta das concentrações versus percentagem de mortalidade, elaborado com os pontos estimados pelo Probit encontra-se na Figura 4.8 (a).

Com o intuito de conhecer a concentração que causa mortalidade a 100% dos organismos e a concentração onde não ocorre letalidade, realizou-se o ensaio preliminar para o fluido dielétrico W3. No ensaio preliminar não foi observado mortalidade nas concentrações inferiores a 0,05 g L<sup>-1</sup> e nas concentrações superiores a 64 g L<sup>-1</sup>, a mortalidade foi de 100%. No controle não foi observado mortalidade dos organismos. Com os resultados do ensaio preliminar definiram-se as concentrações para o ensaio definitivo de toxicidade, sendo elas: 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4 g L<sup>-1</sup>. Os resultados são apresentados na Tabela 4.9.

**Tabela 4.9 - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição ao fluido dielétrico W3**

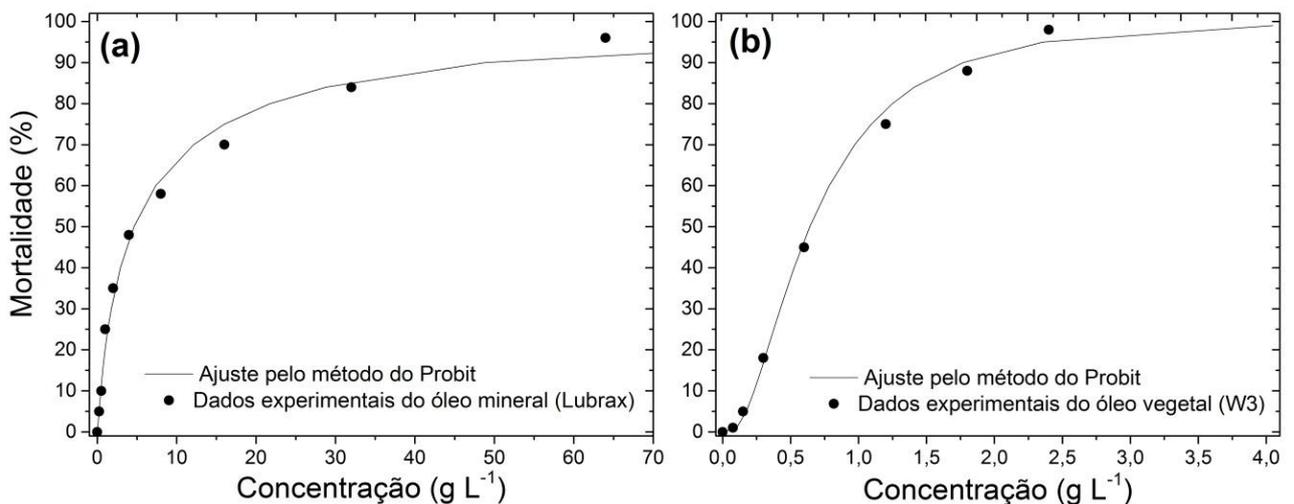
Concentrações do fluido dielétrico W3	Organismos expostos	Organismos mortos (48 horas)				Porcentagem média de organismos mortos (48 horas)
		R1	R2	R3	R4	
g L <sup>-1</sup>						(%)
Controle	40	0	0	0	0	0
0,075	40	0	0	0	0	0
0,15	40	0	0	1	1	5

**Tabela 4.9** - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição ao fluido dielétrico W3 (continuação)

0,3	40	2	1	2	2	18
0,6	40	5	5	4	4	45
1,2	40	8	8	7	7	75
1,8	40	8	9	9	9	88
2,4	40	10	10	10	10	100

Nos resultados obtidos no ensaio definitivo com *Artemia salina*, após 48 horas de exposição ao fluido dielétrico W3, não foi observado mortalidade das *Artemias* na concentração de 0,075 g L<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 0,150 a 1,8 g L<sup>-1</sup>, a mortalidade foi de 5% a 88%. O índice de mortalidade na concentração de 2,4 g L<sup>-1</sup> foi de 100%. Não foi observado mortalidade no controle.

A partir dos resultados de mortalidade da Tabela 4.9, estimou-se o valor da CL<sub>50</sub>, após 48 horas de exposição ao fluido dielétrico vegetal, através da análise de regressão linear Probit. Com os resultados dos pontos estimados pelo Probit das concentrações versus percentagem de mortalidade elaborou-se um gráfico de dose-resposta (Figura 4.8 (b)). O valor médio estimado da CL<sub>50</sub> para a *Artemia salina* foi de 0,641 g L<sup>-1</sup> (0,542 g L<sup>-1</sup> a 0,753 g L<sup>-1</sup>).



**Figura 4.8** - Porcentagem de mortalidade do organismo *Artemia salina* em função da concentração em g L<sup>-1</sup> dos fluidos dielétricos (a) Lubrax (b) W3.

Os resultados do presente estudo onde a *Artemia salina* foi submetida em contato direto com os fluidos dielétricos, mostrou que o W3 causou maior mortalidade do que o

Lubrax. Essa observação vem para confirmar os resultados observados com o *Danio rerio*, onde o W3 também mostrou ser mais letal do que o Lubrax.

#### 4.2.2.4. Toxicidade aguda com o organismo *Artemia salina*: Fração Solúvel em Água (FSA) de fluido dielétrico Lubrax e W3

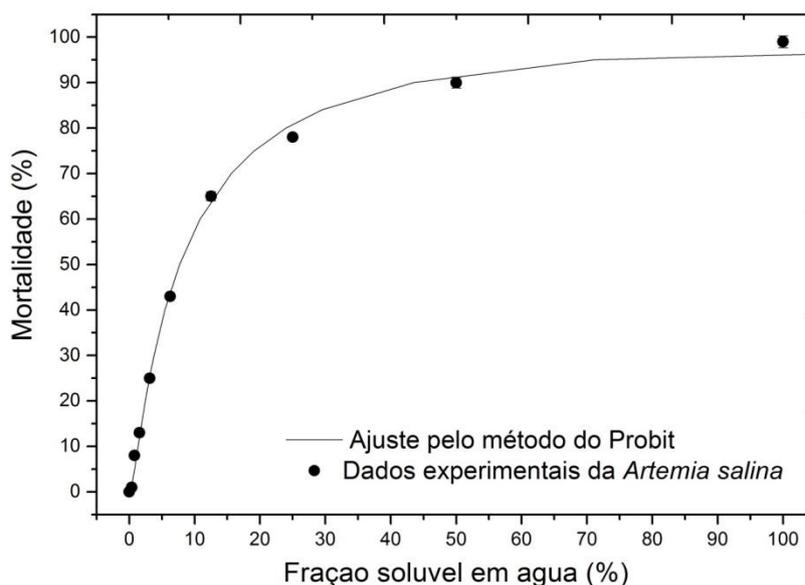
As concentrações do ensaio definitivo com a fração solúvel em água do fluido dielétrico Lubrax foram obtidas através do ensaio preliminar onde se observou que nas concentrações inferiores a 0,195% não houve mortalidade e na concentração de 100% todas as *Artemias* morreram. O controle teve 100% de sobrevivência. As concentrações utilizadas no teste definitivo foram: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%. A mortalidade foi registrada após 48 horas de exposição. Os resultados são apresentados na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10** - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico lubrax

FSA do fluido dielétrico Lubrax (%)	Organismos expostos	Organismos mortos (48 horas)				Porcentagem média de organismos mortos (48 horas) (%)
		R1	R2	R3	R4	
Controle	40	0	0	0	0	0
0,39	40	0	0	0	0	0
0,78	40	0	1	1	1	8
1,56	40	2	1	1	1	13
3,12	40	3	3	2	2	25
6,25	40	5	4	4	4	43
12,5	40	7	6	6	7	65
25	40	8	8	8	7	78
50	40	9	9	9	9	90
100	40	10	10	10	10	100

Os testes de toxicidade aguda com a *Artemia salina* apresentaram mortalidade média de 8% a 43% nas concentrações de 0,78% a 6,25% e de 65% a 100% nas concentrações de 12,5% a 100%. Não houve mortalidade no controle. A CL<sub>50</sub> que causou efeito letal para 50% das *Artemias* em 48 horas foi de 7,67% (6,10% a 9,67%). A Figura

4.9 mostra os resultados de dose-resposta dos pontos estimados pelo Probit das concentrações versus porcentagem de mortalidade.



**Figura 4.9** - Porcentagem de mortalidade do organismo *Artemia salina* em função das concentrações da FSA do fluido dielétrico Lubrax

Para os ensaios definitivos com a fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 utilizaram-se as mesmas concentrações dos ensaios com o Lubrax: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%. Os resultados mostram que a fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 não se aplica, pois a maior concentração testada (100% de amostra) não causou efeito tóxico a 50% dos organismos, verificou-se apenas 8% de letalidade de *Artemia salina* para solução sem diluição (Tabela 4.11).

**Tabela 4.11** - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico W3

FSA do fluido dielétrico W3 (%)	Organismos expostos	Organismos mortos (48 horas)				Porcentagem média de organismos mortos (48 horas) (%)
		R1	R2	R3	R4	
Controle	40	0	0	0	0	0
0,39	40	0	0	0	0	0
0,78	40	0	0	0	0	0
1,56	40	0	0	0	0	0
3,12	40	0	0	0	0	0

**Tabela 4.11** - Mortalidade acumulativa da *Artemia salina* durante o período de exposição a FSA do fluido dielétrico W3 (continuação)

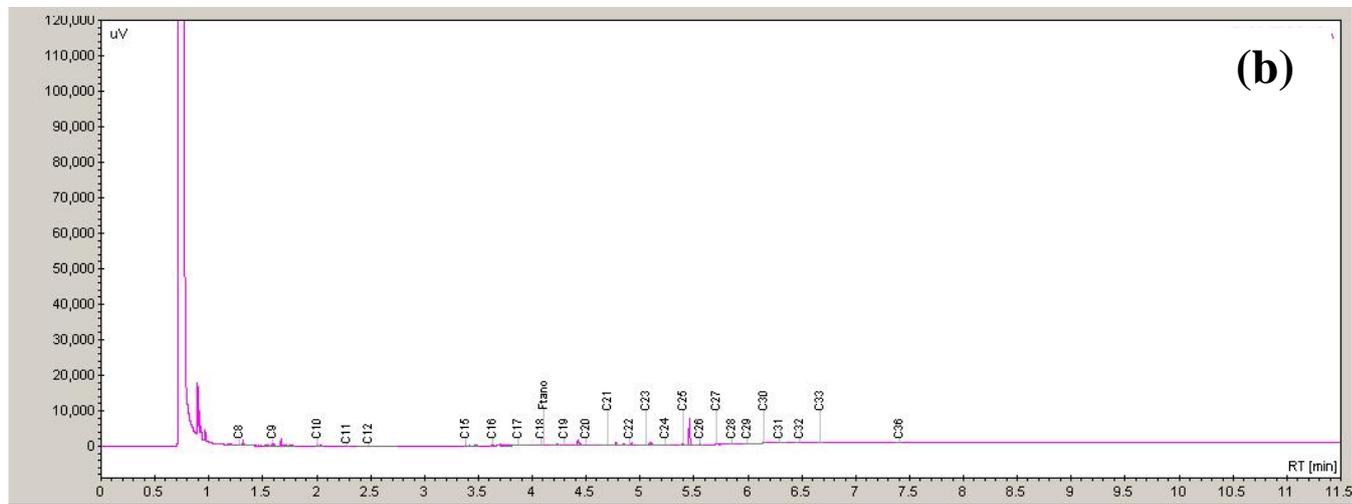
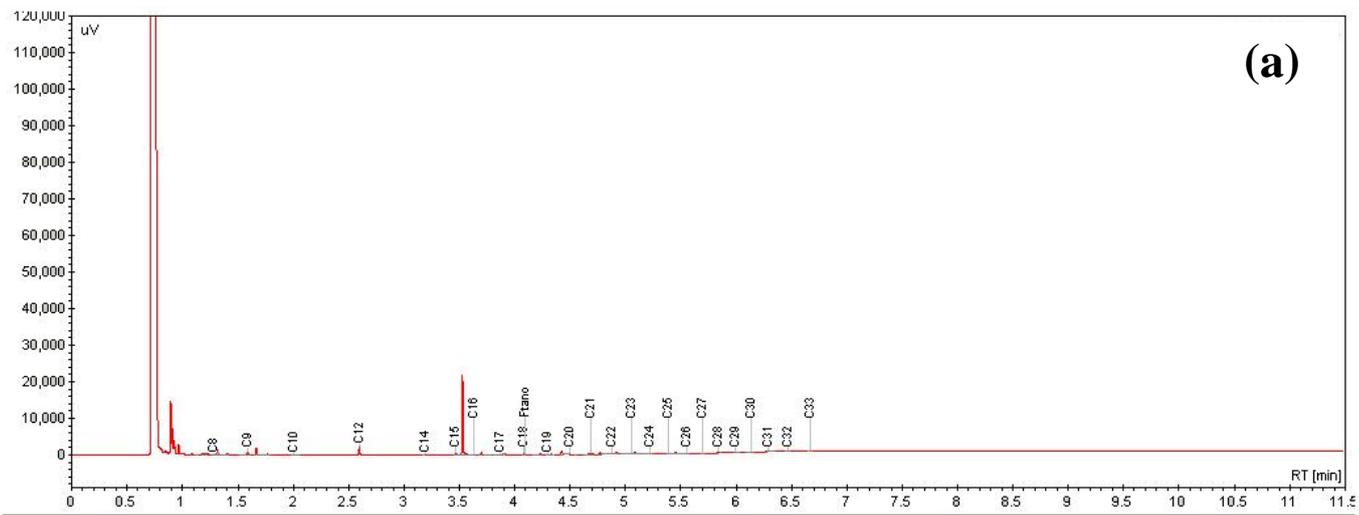
6,25	40	0	0	0	0	0
12,5	40	0	0	0	0	0
25	40	0	0	0	0	0
50	40	0	0	0	0	0
100	40	1	0	1	1	8

---

Os testes realizados com a *Artemia salina* com o intuito de detectar os efeitos danosos da exposição à FSA dos fluidos dielétricos mostraram que o W3 não apresentou alteração significativa quanto ao aspecto toxicidade aguda, quando comparada ao Lubrax, onde este causou maior efeito tóxico as *Artemias*. Esses resultados também foram observados nos ensaios com o *Danio rerio*.

#### **4.2.3. Análise cromatográfica da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos e comparação quanto ao potencial tóxico nos testes com *Danio rerio* e *Artemia salina***

A maioria das pesquisas toxicológicas relacionadas ao petróleo bruto e aos seus derivados tem incidido sobre a sua fração solúvel em água (FSA), porque esta é a porção que entra no ambiente aquático com maior facilidade e que pode infligir danos agudos imediatos sobre os organismos aquáticos (MARTÍNEZ-JERÓNIMO *et al.*, 2005). Logo, as análises cromatográficas foram realizadas com o intuito de analisar as composições das frações solúveis em água e quantificar as concentrações de algumas substâncias contidas na fase solúvel dos fluidos. Os dados obtidos através da análise cromatográfica da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos testados em *Danio rerio* encontram-se nas Figuras 10(a) e (b) e nas Tabelas 12 e 13.



**Figura 4.10** - Cromatograma da fração solúvel em água do fluido dielétrico (a) W3 e (b) Lubrax utilizado nos experimentos de toxicidade aguda com *Danio rerio*.

**Tabela 4.12** - Resumo da análise cromatográfica da fração solúvel em água do fluido dielétrico W3 utilizado nos experimentos de toxicidade aguda com *Danio rerio*.

<b>Componentes</b>	<b>Área Total (%)</b>	<b>Wi (%)</b>	<b>Si (mg/L)</b>	<b>Wi.Si (mg/L)</b>
n-Octano (C <sub>8</sub> )	0,226	2,0701	6,60E-01	1,367
n-Nonano (C <sub>9</sub> )	1,848	16,932	2,20E-01	3,725
n-Decano (C <sub>10</sub> )	0,224	2,052	5,20E-02	1,07E-01
n-Dodecano (C <sub>12</sub> )	1,721	15,769	3,70E-03	5,83E-02
n-Tretadecano (C <sub>14</sub> )	0,176	1,6126	3,30E-04	5,32E-04
n-Pentadecano (C <sub>15</sub> )	0,733	6,716	4,00E-05	2,69E-04
n-Hexadecano(C <sub>16</sub> )	0,149	1,365	2,10E-05	2,87E-05
n-Heptadecano (C <sub>17</sub> )	0,329	3,014	2,30E-03	6,93E-03
n-Octadecano (C <sub>18</sub> )	0,136	1,246	6,00E-03	7,48E-03
Fitano	0,065	0,596	1,70E-05	1,01E-05
n-Nonadecano (C <sub>19</sub> )	0,214	1,961	3,70E-05	7,26E-05
n-Eicosano (C <sub>20</sub> )	0,046	0,421	1,90E-03	8,01E-04
n-Heneicosano (C <sub>21</sub> )	1,014	9,291	2,90E-07	2,69E-06
n-Docosano (C <sub>22</sub> )	0,077	0,706	7,80E-07	5,50E-07
n-Tricosano (C <sub>23</sub> )	0,137	1,255	2,30E-07	2,89E-07
n-Tetracosano (C <sub>24</sub> )	0,337	3,088	6,40E-08	1,98E-07
n- Pentacosano (C <sub>25</sub> )	0,955	8,750	2,10E-08	1,84E-07
n-Hexacosano (C <sub>26</sub> )	0,251	2,299	6,20E-09	1,43E-08
n-Heptacosano (C <sub>27</sub> )	0,114	1,044	2,80E-09	2,93E-09
n-Octacosano (C <sub>28</sub> )	0,660	6,047	5,60E-10	3,39E-09
n-Nonacosano (C <sub>29</sub> )	0,220	2,016	1,60E-10	3,23E-10
n- triacontano (C <sub>30</sub> )	0,535	4,902	5,10E-11	2,50E-10
n-Hentriacontano (C <sub>31</sub> )	0,208	1,906	1,50E-11	2,86E-11
n-dotriacontano (C <sub>32</sub> )	0,287	2,629	4,60E-12	1,21E-11
n-tritriacontano (C <sub>33</sub> )	0,252	2,309	1,40E-12	3,23E-12
<b>Total</b>	<b>10,914</b>	<b>100,000</b>		<b>5,273</b>

Wi: área relativa; Si: referência de solubilidade para o componente puro (Anexo 03); Wi.Si: quantidade de componente na mistura.

**Tabela 4.13** - Resumo da análise cromatográfica da fração solúvel em água do fluido dielétrico Lubrax utilizado nos experimentos de toxicidade aguda com *Danio rerio*.

<b>Componentes</b>	<b>Área Total (%)</b>	<b>Wi (%)</b>	<b>Si (mg/L)</b>	<b>Wi.Si (mg/L)</b>
n-Octano (C <sub>8</sub> )	0,302	1,849	6,60E-01	1,220
n-Nonano (C <sub>9</sub> )	2,722	16,666	2,20E-01	3,666
n-Decano (C <sub>10</sub> )	0,295	1,806	5,20E-02	9,39E-02
n-Undecano (C <sub>11</sub> )	0,134	0,820	4,40E-03	3,61E-03
n-Dodecano (C <sub>12</sub> )	0,612	3,747	3,70E-03	1,39E-02
n-Pentadecano (C <sub>15</sub> )	0,129	0,789	4,00E-05	3,20E-05
n-Hexadecano(C <sub>16</sub> )	0,255	1,561	2,10E-05	3,30E-05
n-Heptadecano (C <sub>17</sub> )	0,543	3,324	2,30E-03	7,65E-03
n-Octadecano (C <sub>18</sub> )	0,271	1,659	6,00E-03	9,96E-03
Fitano	0,063	0,386	1,70E-05	6,60E-06
n-Nonadecano (C <sub>19</sub> )	0,141	0,863	3,70E-05	3,20E-05
n-Eicosano (C <sub>20</sub> )	0,123	0,753	1,90E-03	1,43E-03
n-Heneicosano (C <sub>21</sub> )	1,917	11,736	2,90E-07	3,4E-06
n-Docosano (C <sub>22</sub> )	0,339	2,076	7,80E-07	1,60E-06
n-Tricosano (C <sub>23</sub> )	0,369	2,259	2,30E-07	5,20E-07
n-Tetracosano (C <sub>24</sub> )	0,942	5,767	6,40E-08	3,70E-07
n- Pentacosano (C <sub>25</sub> )	2,454	15,024	2,10E-08	3,20E-07
n-Hexacosano (C <sub>26</sub> )	0,451	2,761	6,20E-09	1,70E-08
n-Heptacosano (C <sub>27</sub> )	0,348	2,131	2,80E-09	5,97E-09
n-Octacosano (C <sub>28</sub> )	1,467	8,982	5,60E-10	5,00E-09
n-Nonacosano (C <sub>29</sub> )	0,377	2,308	1,60E-10	3,70E-10
n- triacontano (C <sub>30</sub> )	0,387	2,369	5,10E-11	1,20E-10
n-Hentriacontano (C <sub>31</sub> )	0,350	2,143	1,50E-11	3,20E-11
n-dotriacontano (C <sub>32</sub> )	0,468	2,865	4,60E-12	1,30E-11
n-tritriacontano (C <sub>33</sub> )	0,205	1,255	1,40E-12	1,80E-12
n-Hexatriacontano (C <sub>36</sub> )	0,669	4,096	3,90E-14	1,60E-13
<b>Total</b>	<b>16,333</b>	<b>100,000</b>		<b>5,017</b>

Wi: área relativa; Si: referência de solubilidade para o componente puro (Anexo 03); Wi.Si: quantidade de componente na mistura.

As Tabelas 12 e 13 apresentam as concentrações individuais dos n-alcenos. Pelas análises do W3 observou-se que os n-alcenos predominantes encontram-se entre n-C<sub>8</sub> a n-C<sub>15</sub>. Para o Lubrax fica entre n-C<sub>16</sub> a n-C<sub>36</sub>. Os resultados podem ser explicados devido à estrutura química de cada fluido, a maioria dos ácidos graxos de óleos vegetais possui uma cadeia carbônica de 8 a 20 carbonos. O óleo mineral caracteriza-se pela presença de n-alcenos de C<sub>20</sub> a C<sub>26</sub> carbonos, porém por ser um derivado do petróleo pode apresentar cadeia carbônica de 1 a 40 átomos. Os resultados de solubilidade em água dos hidrocarbonetos alifáticos (n-alcenos) mostram que o W3 e o Lubrax possuem uma solubilidade em água bem próximas. Os valores encontrados foram 5,273 mg/L para o W3 e de 5,017 mg/L para o Lubrax.

Nas análises de toxicidade aguda dos organismos *Danio rerio* e *Artemia salina* com a FSA dos fluidos dielétricos, o Lubrax mostrou ser mais tóxico do que o W3. O resultado pode estar relacionado com a solubilidade de toda a substância e não apenas com a solubilidade dos n-alcenos, pois o Lubrax (óleo mineral) é uma mistura complexa de hidrocarbonetos saturados e aromáticos. Já o W3 (óleo vegetal) não apresenta compostos de hidrocarbonetos, particularmente compostos aromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, sua solubilidade em água é da ordem de 3 a 5 vezes maior (WATTS *et al.*, 2000). Os hidrocarbonetos monoaromáticos estão presentes no óleo mineral e são denominados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros de xileno) devido à sua alta toxicidade, representa risco à saúde humana e animal e são os principais contaminantes das águas. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2006), a poluição causada pelos compostos BTEX apresentam elevada toxicidade, tais compostos aromáticos podem obstruir fisicamente os tecidos, causando asfixia e danos subletais, por impregnar na pele, nas brânquias ou em outras partes vitais e acessórias, sendo outro risco comum o impedimento da realização de diversas funções metabólicas da fauna aquática, como respiração, alimentação, excreção, homeostase, localização e movimentação (como as nadadeiras de peixes), entre outras limitações.

Investigações laboratoriais encontradas na literatura utilizando biodiesel, óleo diesel e de misturas de ambos sobre organismos testes *Oncorhynchus mykiss* e *Daphnia magna*, também mostraram que a fração solúvel em água do biodiesel, proveniente de oleaginosa, é menos tóxica para os organismos testados do que a do óleo diesel convencional (KHAN *et al.*, 2007). MÜLLER (2011) também realizou ensaios de

toxicidade aguda com o microcrustáceo aquático *D. magna* utilizando a FSA do diesel, do B5 (mistura binária diesel/biodiesel de 5%) e do biodiesel. Os resultados mostraram que a FSA do biodiesel estudado não foi considerada tóxica para a *Daphnia magna*, enquanto a FSA do diesel e do B5 foram consideradas tóxicas.

Logo, o resultado encontrado nas análises cromatográficas da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos usados nos testes com o *Danio rerio*, não foram conclusivas. Elas apenas sugerem que a toxicidade causada pelo fluido dielétrico mineral (Lubrax) pode estar relacionada à solubilidade de todas as substâncias presentes em sua estrutura e não com a solubilidade dos n-alcenos.

### **4.3.Toxicidade em solo contaminado com fluidos dielétricos utilizando a soja (*Glycine max L.*) como bioindicador**

#### **4.3.1. Análise dos atributos químicos do solo**

A avaliação da fertilidade do solo em função das concentrações dos fluidos dielétricos W3 e Lubrax nos três anos de colheita indicou uma distribuição simétrica para o pH, P, K, Ca, Mg, capacidade de troca iônica (CTC) e saturação por base (V). As diferentes concentrações (0,5 a 10%) dos fluidos dielétricos W3 e Lubrax não causaram alterações significativas nos atributos químicos do solo. Não foi detectada a presença de alumínio trocável no solo, que é parâmetro tóxico para as plantas. Somente o carbono apresentou variação crescente em relação às concentrações de fluidos dielétricos, conforme aumentou à dosagem dos fluidos os valores de carbono também aumentaram (Tabela 4.14).

O aumento do teor de carbono foi devido à composição química dos fluidos dielétricos. O principal componente do óleo vegetal é o triacilgliceróis, que são ésteres de glicerol contendo três ácidos graxos, cada um destes ácidos graxos pode conter diferentes números de átomos de carbono, bem como diferentes graus de insaturação. O óleo mineral é um derivado do petróleo, constituído basicamente por carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos) e, em pequenas quantidades, por compostos que apresentam nitrogênio,

enxofre e oxigênio em sua estrutura (heterocompostos). Sendo assim, os valores dos teores de carbono encontrados nas amostras de solo podem ter sido quantificados nas análises

devido à composição química dos fluidos dielétricos, o que explica a variação crescente do carbono em relação às concentrações dos óleos.

Os resultados também mostram que os teores de carbono do Lubrax são superiores aos do W3 para todas as concentrações. Porém, a análise de teor de carbono total dos óleos (Tabela 4.1), contradiz esse resultado, onde a porcentagem de carbono é maior nos óleos vegetais. Esse comportamento pode ser explicado devido a maior degradabilidade do óleo vegetal em relação ao mineral, conforme exposto nesse trabalho no item 4.1. Os resultados de biodegradabilidade imediata encontrados mostraram que os fluidos dielétricos vegetais testados, sofreram maior degradação pelos microrganismos em comparação com o fluido dielétrico mineral. De acordo com os resultados, os fluidos dielétricos não interferiram nos atributos químicos do solo. Apenas o carbono apresentou variação crescente em relação às concentrações de fluidos dielétricos.

**Tabela 4.14** - Estatística descritiva (média) dos atributos pH, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), capacidade de trocas catiônicas (CTC), saturação por bases (V%) e carbono (C) do solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax.

Valores médios dos parâmetros físico-químicos									
Tipo de fluidos	Concentrações (%)	pH	P (mg dm <sup>-3</sup> )	K (cmol dm <sup>-3</sup> )	Ca (cmol dm <sup>-3</sup> )	Mg (cmol dm <sup>-3</sup> )	CTC (cmol dm <sup>-3</sup> )	V (%)	C (g dm <sup>-3</sup> )
	<b>Controle</b>	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.8	0.54 ± 0.02	4.4 ± 0.3	2.6 ± 0.4	11 ± 1	72 ± 2	26 ± 1
<b>Vegetal (W3)</b>	<b>0.5</b>	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.7	0.55 ± 0.02	4.4 ± 0.3	2.6 ± 0.4	11 ± 1	73 ± 2	27 ± 1
	<b>1</b>	5.7 ± 0.1	5.9 ± 0.6	0.52 ± 0.03	4.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	11 ± 1	73 ± 2	28 ± 1
	<b>2</b>	5.7 ± 0.1	6.0 ± 0.4	0.54 ± 0.02	4.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	12 ± 1	73 ± 2	29 ± 1
	<b>2.5</b>	5.8 ± 0.1	6.1 ± 0.4	0.55 ± 0.02	4.4 ± 0.3	2.6 ± 0.4	12 ± 1	74 ± 2	32 ± 1
	<b>5</b>	5.9 ± 0.1	6.4 ± 0.3	0.53 ± 0.01	4.5 ± 0.2	2.5 ± 0.4	12 ± 1	73 ± 2	36 ± 2
	<b>7.5</b>	5.9 ± 0.1	6.7 ± 0.5	0.53 ± 0.01	4.5 ± 0.2	2.4 ± 0.3	12 ± 1	76 ± 3	46 ± 7
	<b>10</b>	5.8 ± 0.1	6.9 ± 0.5	0.54 ± 0.02	4.6 ± 0.2	2.4 ± 0.3	12 ± 1	74 ± 3	53 ± 9
<b>Mineral (Lubrax)</b>	<b>0.5</b>	5.7 ± 0.1	6.0 ± 0.3	0.55 ± 0.02	4.2 ± 0.4	2.5 ± 0.4	11 ± 1	72 ± 2	28 ± 1
	<b>1</b>	5.7 ± 0.1	5.9 ± 0.4	0.53 ± 0.01	4.2 ± 0.4	2.5 ± 0.4	10 ± 1	73 ± 2	29 ± 1
	<b>2</b>	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.3	0.55 ± 0.02	4.2 ± 0.4	2.4 ± 0.3	10 ± 1	72 ± 2	33 ± 1
	<b>2.5</b>	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.4	0.55 ± 0.02	4.3 ± 0.3	2.4 ± 0.3	10 ± 1	73 ± 2	38 ± 4
	<b>5</b>	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1	0.54 ± 0.02	4.3 ± 0.3	2.4 ± 0.3	10 ± 1	74 ± 2	49 ± 1
	<b>7.5</b>	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.4	0.56 ± 0.03	4.3 ± 0.3	2.5 ± 0.4	10 ± 1	73 ± 2	54 ± 6
	<b>10</b>	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.3	0.53 ± 0.01	4.4 ± 0.3	2.2 ± 0.3	10 ± 1	74 ± 2	60 ± 5

### 4.3.2. Determinação do teor de óleos e graxas (TOG)

O parâmetro químico quantificador do processo de degradação dos fluidos dielétricos W3 e Lubrax no solo foi definido como “óleos e graxas”. A técnica é relativamente simples de ser executada e se mostrou adequada como controle de degradação dos contaminantes no solo. Para determinar o teor de óleos e graxas no solo contaminado com diferentes concentrações de fluidos dielétricos, as análises foram realizadas no final do primeiro, segundo e terceiro ano de plantio. Pelos resultados da análise de variância (Tabela 4.15), pode-se observar que os teores de óleos e graxas detectados nas amostras de solo foram influenciados significativamente ( $p \leq 0,01$ ) conforme os tratamentos e a combinação entre o tipo de fluido dielétrico e respectiva concentração.

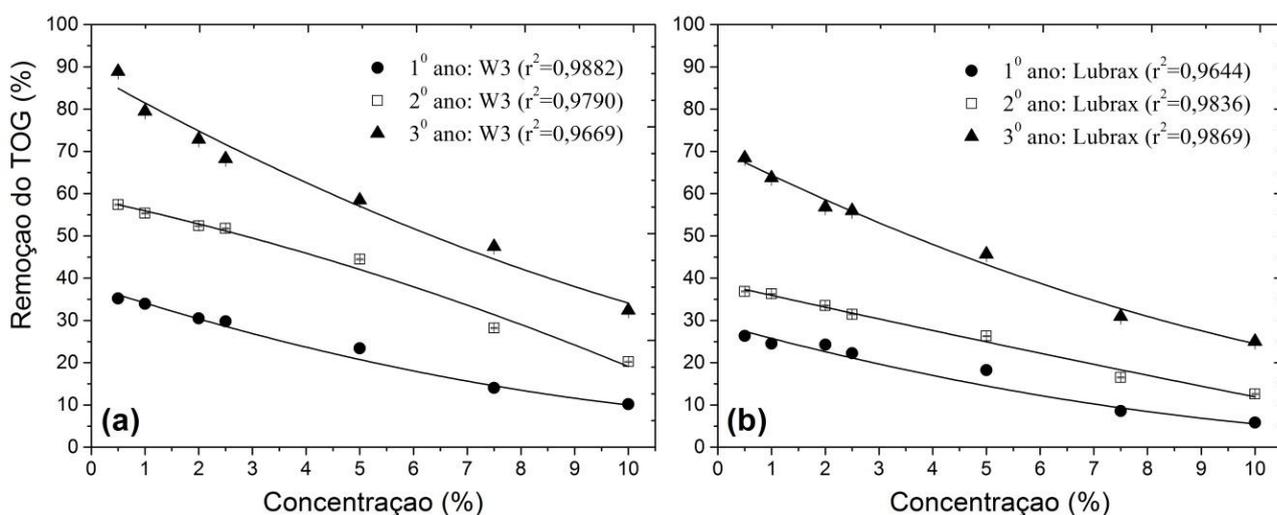
**Tabela 4.15** - Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de plantio do teor de óleos e graxas (TOG) presente nas amostras de solos contaminados com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax.

Parâmetros	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Ano 01 (2014/2015)	Ano 01 (2015/2016)	Ano 01 (2016/2017)
		TOG (%)		
Tratamentos	14	43.14**	36.09**	26.71**
Fatorial (AxB)	13	42.88**	36.21**	27.17**
Controle	1	46.62**	34.59**	20.72**
Resíduo	45	0.00776	0.00235	0.00213
		Médias		
Controle		0.00	0.00	0.00
Vegetal (W3)		3.40	2.76	2.09
Mineral (Lubrax)		3.66	3.33	2.63
Coefficiente de variação (%)		2.49	1.59	1.96

\*\* - significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F; A – W3 (vegetal); B – Lubrax (mineral)

Avaliando os percentuais de óleos e graxas no final do primeiro, segundo e terceiro ano de plantio, dos solos contaminados com fluido dielétrico W3 e Lubrax, nota-se uma resposta decrescente do valor do TOG em função do aumento da concentração do fluido.

Os solos em presença do W3 apresentaram maior degradação do que os solos contaminados com o Lubrax (Figuras 4.11a e b).

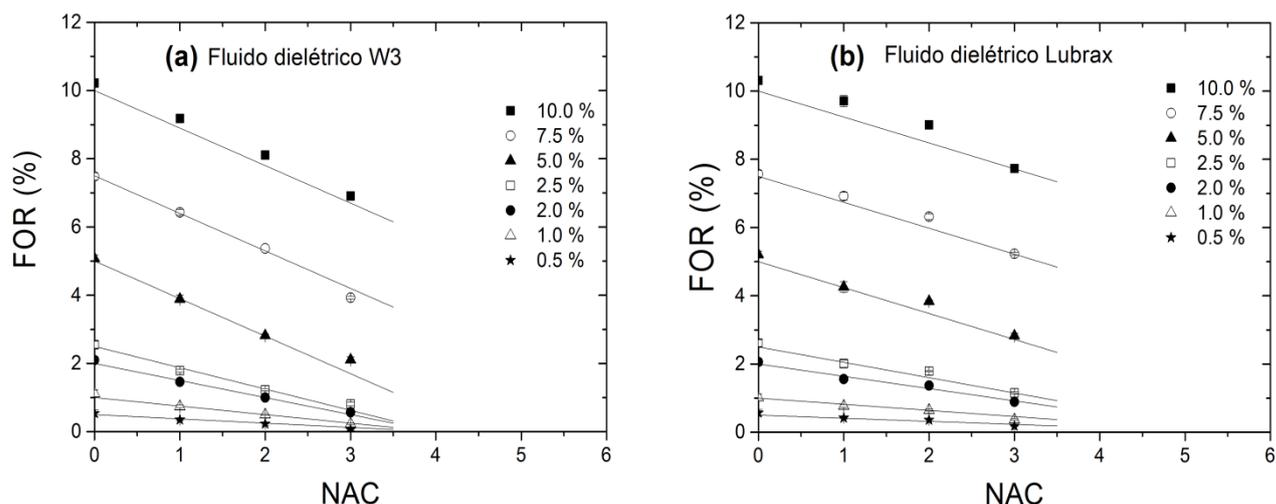


**Figura 4.11** - Percentagem de remoção de óleos e graxas no solo de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita

Foram observadas remoções de cerca de 35, 60 e 90% do W3 para uma concentração inicial de fluido de 0,5% após o primeiro, segundo e terceiro ano, respectivamente. Já para o Lubrax a remoção foi de cerca de 25, 40 e 70% após o primeiro, segundo e terceiro ano, respectivamente, para a concentração de 0,5%.

Os resultados obtidos na determinação do teor de óleos e graxas mostraram similaridade com os estudos anteriores deste trabalho (item 4.1 e 4.3.1). No teste de biodegradabilidade imediata e no estudo do teor de carbono no solo o fluido dielétrico W3 também foi degradado mais facilmente que o fluido dielétrico Lubrax. Esta resposta diferenciada provavelmente pode ser explicada pelo fato do óleo vegetal constituir de estruturas orgânicas mais simples (ácidos gordos cuja cadeia contém de 8 a 20 átomos de carbono) do que o mineral, sendo mais facilmente biodegradáveis que os hidrocarbonetos (Deon et. al., 2012).

As Figuras 4.12a e b mostram as frações de óleo residual (FOR) do W3 e Lubrax em função do número de anos de colheita (NAC).



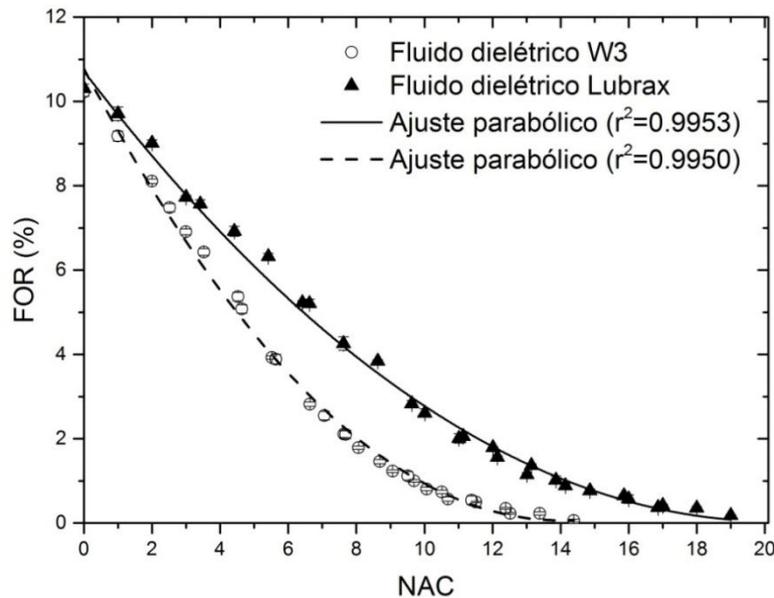
**Figura 4.12** - Resultados das frações de óleos residuais (FOR) dos solos contaminados com (a) W3 e (b) Lubrax com sete concentrações iniciais nos anos de colheita

Percebeu-se uma redução das frações de óleo residual (FOR) em todas as concentrações de fluidos dielétricos testados, em relação aos anos de cultivo no período de 120 dias. As remoções foram mais significativas nos solos contaminados pelo W3 do que pelo Lubrax, sugerindo um menor número de culturas para uma redução completa da fração de óleo residual no solo.

Conforme relatado na literatura (Fernández et al., 2016; Menkiti et al., 2017), o óleo vegetal é mais biodegradável do que o óleo mineral, concordando com os resultados encontrados neste trabalho. Neste contexto, os solos contaminados com as frações de 5,0, 7,5 ou 10% do W3 seriam removidos até atingir um valor de fração de óleo residual de cerca de 3%, seguindo uma taxa linear decrescente de cerca de 1,1% da fração de óleo por número de anos de colheita.

Abaixo de 3% da fração do W3, haveria uma queda linear decrescente na taxa de cerca de 0,25% da fração de óleo por número anos de colheita. Isso poderia ser explicado pela baixa concentração de óleo no solo, apresentando pouco disponibilidade para interagir com as plantas em contraste com as altas concentrações de óleo.

A Figura 4.13 apresenta o resultado das frações de óleo residual unificados para os solos contaminados pelos fluidos dielétricos W3 e Lubrax, incluindo seus ajustes parabólicos, em função dos número de anos de colheita (NAC).



**Figura 4.13** - Dados das frações de óleo residual (FOR) unificados para os solos contaminados pelos fluidos dielétricos W3 e Lubrax, incluindo seus ajustes parabólicos.

Para uma redução efetiva de 10% das frações de óleo residual do fluido dielétrico W3, seria necessário um número de colheitas variando de 14 a 15. No caso de 10% das frações de óleo residual do fluido dielétrico Lubrax, seria necessário um número de colheitas que variam de 18 a 19; isto é, haveria aproximadamente uma queda de 30% no desempenho de remoção em relação ao óleo vegetal devido à menor biodegradabilidade mostrada pelo óleo mineral (Figura 4.13).

Uma representação matemática dos conjuntos de dados das frações de óleo residual (FOR), obtidas a partir dos dados do TOG é uma ferramenta útil para fornecer uma boa estimativa do número total de anos de colheitas que seriam necessários para atingir uma redução total nos solos contaminados com fluidos dielétricos. Para este fim, os conjuntos de dados da FOR foram adequadamente unificados para obter uma função empiricamente bem definida da redução da FOR em relação ao número anos de colheitas (Figura 4.13). Nesta estrutura, foi necessário um deslocamento de tempo adequado em dados FOR para cada condição de fração de óleo, a fim de seguir o mesmo comportamento das frações de óleo residual em função do número de anos de colheita, Equações (4.1) e (4.2). Os dados da FOR unificados evidenciaram uma tendência não linear com o aumento dos anos de

colheita realizados em solos contaminados com os fluidos. Ao ajustar uma função de tipo polinomial de segunda ordem aos dados FOR, obteve-se um bom ajuste, como mostrado na Figura 4.13.

$$FOR_{vegetal}(\%) = 10,7 - 1,53.NAC + 0,055.(NAC)^2 \quad (4.1)$$

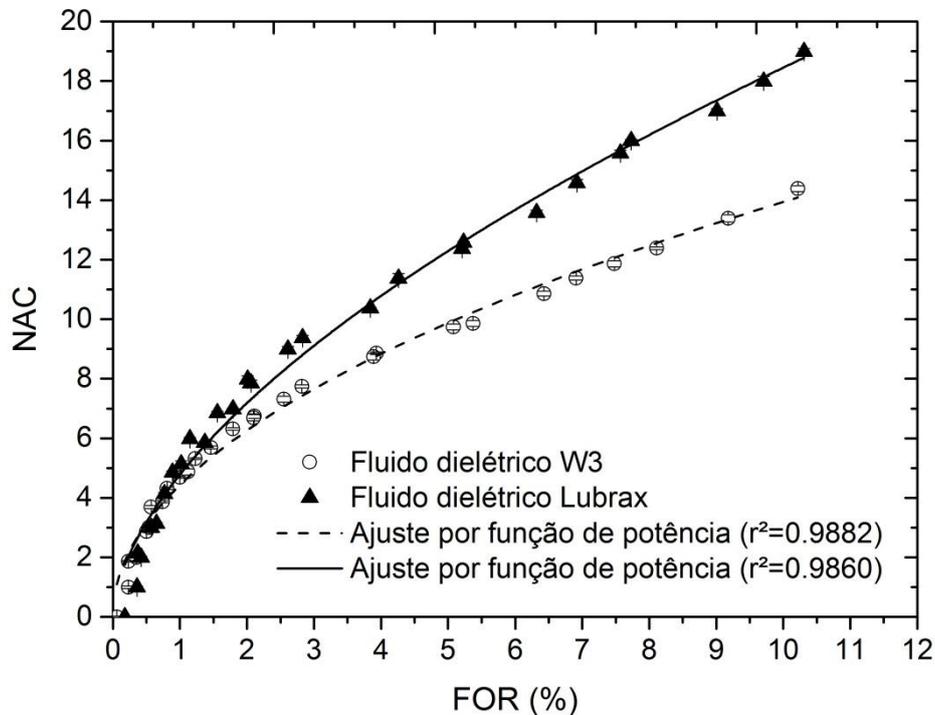
$$FOR_{mineral}(\%) = 10,7 - 1,05.NAC + 0,026.(NAC)^2 \quad (4.2)$$

Onde:

FOR: frações de óleo residual

NAC: número de anos de colheita

Assim, ao usar os dados da Figura 4.13, o número de anos de colheita (NAC) podem ser plotado como uma função das frações de óleo residual (FOR), ajustando uma função do tipo de potência aos dados FOR, a partir dos quais obteve um bom ajuste, como mostrado na Figura 4.14.



**Figura 4.14** - Previsão empírica sobre o número de anos de colheita (NAC) necessários para uma redução significativa das frações de óleo residual (FOR) para solos contaminados W3 e Lubrax

Sendo possível prever o NAC necessário para que a descontaminação total do solo ocorra através da reposição fitossanitária, Equações (4.3) e (4.4).

$$NAC_{vegetal} = 4,782. (FOR)^{0,5862} \quad (4.3)$$

$$NAC_{mineral} = 4,435. (FOR)^{0,497} \quad (4.4)$$

Onde:

FOR: frações de óleo residual

NAC: número de anos de colheita

#### **4.3.3. Avaliações fitotécnicas**

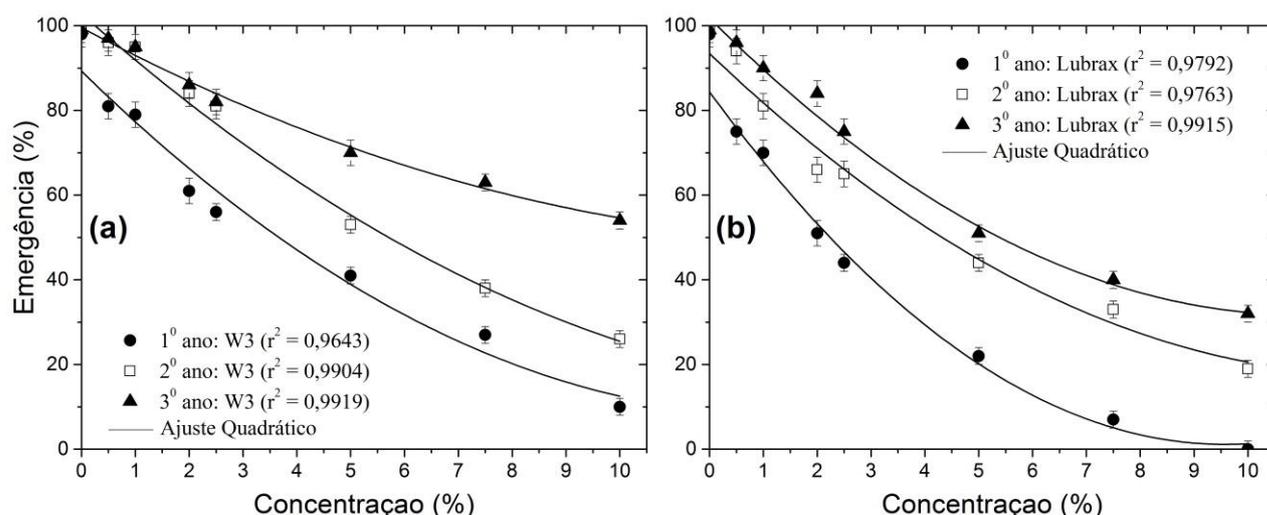
Na Tabela 4.16 são apresentados os resultados da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de plantio da emergência, altura da planta, diâmetro do caule, comprimento radicular e produção de matéria seca das raízes da soja em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax.

**Tabela 4.16** - Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de colheita da emergência (GE), altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), comprimento radicular (CR) e produção de matéria seca das raízes (MSR) da soja em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e mineral Lubrax.

Parâmetros	Graus de liberdade	Quadrados médios - Ano 01 (2014/2015)					Graus de liberdade	Quadrados médios - Ano 02 (2015/2016)					Graus de liberdade	Quadrados médios - Ano 03 (2016/2017)				
		GE	AP	DC	CR	MSR		GE	AP	DC	CR	MSR		GE	AP	DC	CR	MSR
		(%)	(cm)	(mm)	(cm)	(mg)		(%)	(cm)	(mm)	(cm)	(mg)		(%)	(cm)	(mm)	(cm)	(mg)
<b>Concentrações</b>	8	62.19**	659.30**	2.29**	90.87**	253.838.97**	12	92.26**	502.30**	3.24**	150.01**	204.605.99**	14	81.96**	442.02**	3.85**	185.26**	210.116.84**
<b>Fatorial (Ax B)</b>	7	46.85**	298.43**	0.96**	63.28**	258.673.90**	11	88.48**	435.07**	2.46**	132.29**	148.319.58**	13	82.02**	414.36**	3.45**	172.31**	166.659.15**
<b>Controle</b>	1	169.59**	3185.35**	11.59**	284.01**	219.994.50**	1	133.85**	1241.87**	11.79**	344.88**	823.756.60**	1	81.10**	801.65**	9.04**	353.73**	775.066.72**
<b>Resíduos</b>	27	1.51	0.07185	0.01005	0.04444	13.3537	39	2.13	0.0641	0.01023	0.0425	4.57019	45	0.91111	0.05728	0.00848	0.05883	24.61406
<b>Médias</b>																		
<b>Controle</b>		19.5	49.15	4.04	24.00	780.55		19.75	49.28	4.12	23.95	781.50		19.75	49.22	4.10	24.15	783.72
<b>Vegetal (W3)</b>		13.88	20.29	2.38	16.09	341.58		14.88	36.15	2.57	16.68	332.35		16.79	39.68	2.87	16.98	361.71
<b>Mineral (Lubrax)</b>		11.31	18.14	2.09	14.04	722.04		12.58	25.73	2.10	11.90	285.98		13.39	29.46	2.22	11.86	294.46
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		9.75	1.39	4.48	1.40	0.69		10.62	0.82	4.33	1.44	0.69		6.32	0.69	3.62	1.68	3.83

\*\* - significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F; A – W3 (vegetal); B – Lubrax (mineral)

Pelos resultados da análise de variância detectou-se interação ( $p \leq 0,01$ ) entre a emergência de plântulas em relação as diferentes concentrações, diferentes tipos de fluidos dielétricos e a testemunha para os três anos de colheita com solo contaminado (Tabela 4.16). Conforme observado no primeiro ano de colheita da soja, a emergência de plântulas ocorreu independentemente da concentração aplicada do fluido dielétrico W3 e Lubrax (Figura 4.15a e b). No entanto, as plantas de soja morreram prematuramente, em média 10 dias após o surgimento, devido à toxicidade dos solos, contendo 5%, 7,5% e 10% destes fluidos dielétricos.



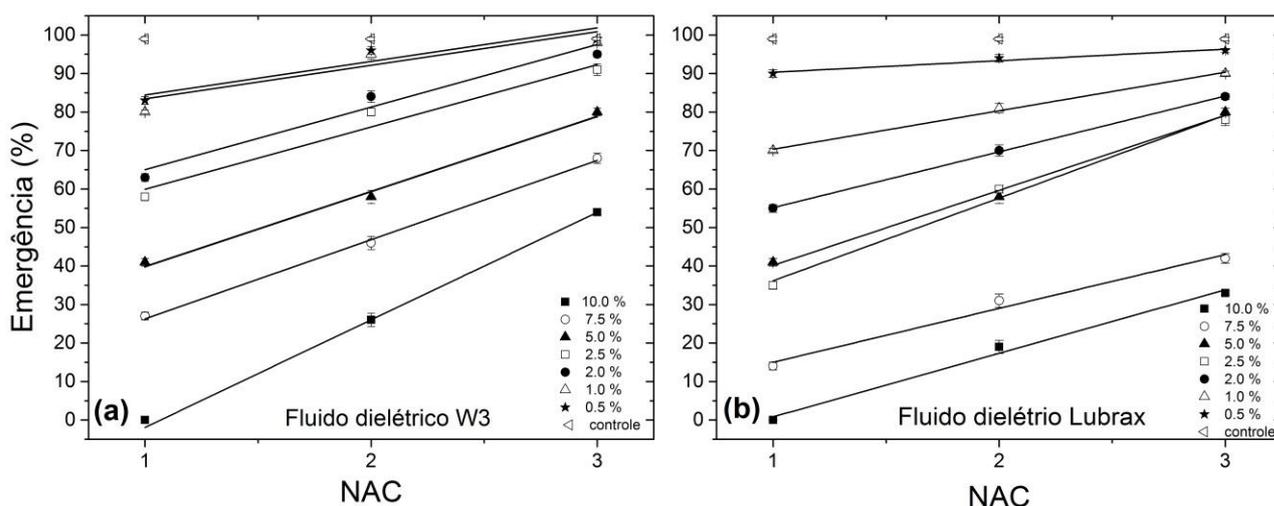
**Figura 4.15** - Emergência da soja de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita

Ao realizar a comparação dos resultados de emergência entre os anos de colheita, observou-se que a menor fração de emergência de plântulas ocorreu no primeiro ano da cultura, melhorando gradualmente em relação aos demais, como mostra a Figura 4.15a e b. Foi um indicativo da redução da toxicidade e da remediação de solos. A menor toxicidade foi evidenciada no final do terceiro ano de colheita, correspondendo à menor fração de óleo residual relacionada.

A emergência durante o segundo ano de plantio da cultura em solo contaminado com o fluido dielétrico W3 foi superior ao primeiro ano em todas as concentrações estudadas e todas as plantas completaram seu ciclo de vida. Para os solos contaminados com o Lubrax, durante o segundo ano, a emergência também foi maior em relação ao primeiro ano de plantio. Da mesma forma, após o terceiro ano, a emergência em solos

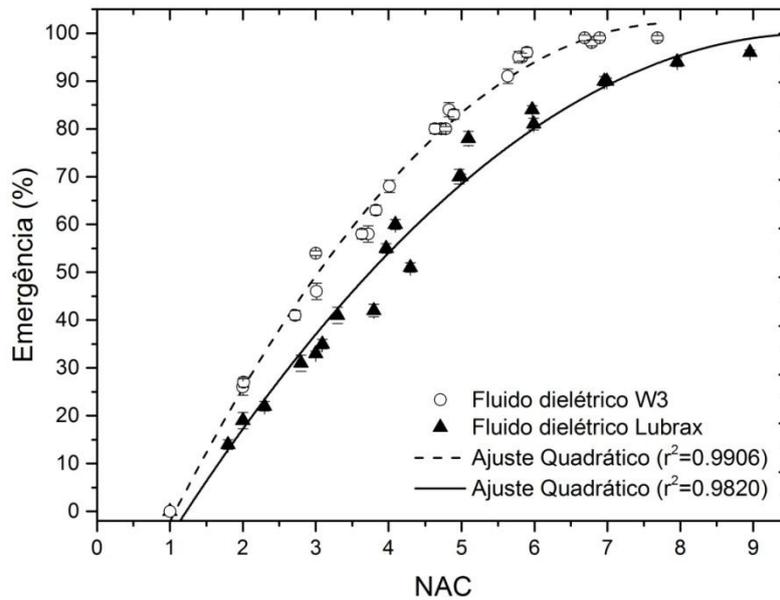
contaminados com W3 e Lubrax foi maior que a do segundo ano, e ocorreu emergência em todas as concentrações (Figuras 4.15a e b).

Mesmo que a cultura sendo mais sensível ao solo contaminado com o Lubrax, todas as suas plantas completaram seu ciclo de vida nas concentrações estudadas. O controle nos três anos de colheita teve um comportamento semelhante em relação à emergência. Foi confirmada uma melhora progressiva na emergência das plântulas, uma vez que houve aumento no número de anos de colheita (Figura 16a e b).



**Figura 4.16** - Comportamento da emergência ao longo dos primeiros três anos de colheita para os fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax.

Semelhante às frações de óleo residual (FOR), a unificação de todos os dados de emergência das plântulas, pode ser vista como resultado de sete testes de emergência de plântulas em três anos de colheita, realizados na aplicação sequencial de condições de diminuição da fração de fluido dielétrico (10, 7,5, 5,0, 2,5, 2,0, 1,0 e 0,5%) (Figura 4.17).



**Figura 4.17** - Perfil da previsão dos dados de emergência unificados em termos de número de anos de colheita (NAC).

Ao realizar um deslocamento de tempo adequado, em dados de emergência de plântulas, para cada condição de FOR, o comportamento de emergência em número de anos de colheita foi obtido de acordo com as Equações (4.5) e (4.6).

$$EP_{Vegetal}(\%) = -34.5 + 34.33.NAC - 2.17.(NAC)^2 \quad (4.5)$$

$$EP_{Mineral}(\%) = -30.43 + 26.52.NAC - 1.35.(NAC)^2 \quad (4.6)$$

Onde:

EP: emergência de plântulas

NAC: número de anos de colheita

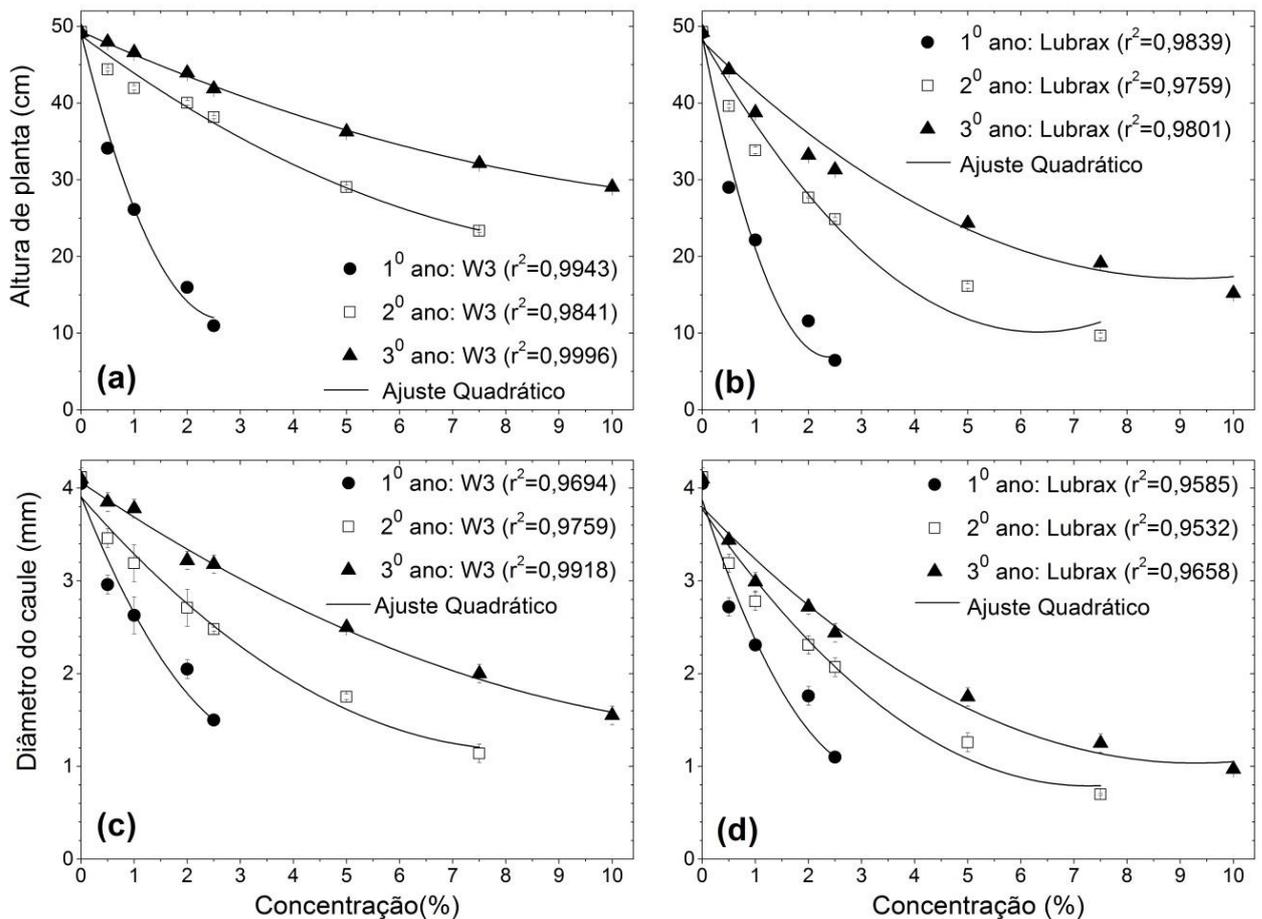
Os dados de emergência de plântulas unificados evidenciaram uma tendência não linear com o aumento do número de anos de colheita em solos contaminados com o Lubrax. Ao ajustar uma função de tipo polinomial de segunda ordem aos dados de

emergência de plântulas, obteve-se um ajuste de boa qualidade, conforme mostrado na Figura 4.17.

No início do desenvolvimento vegetativo, as plantas de soja submetidas ao tratamento com solo contaminado com o Lubrax durante os três anos de colheita apresentaram retardo de crescimento. As folhas jovens apresentaram tonalidade mais escura e consistência dura e apresentaram redução no ciclo no primeiro e no segundo ano de colheita, com 100 e 105 dias respectivamente. Houve um rápido amarelecimento das folhas (senescência) e todas as folhas caíram. A senescência e queda foliar iniciaram-se nos nós inferiores das plantas e subsequentemente estenderam-se para cima até as folhas mais jovens. Não foi observado antecipação no fechamento do ciclo no terceiro ano.

A altura da planta é considerada um parâmetro importante de resposta aos efeitos de contaminação do solo, pois pode variar devido às condições gerais do meio ambiente, influenciando na produção. O resultado da análise de variância dos três anos avaliados revelou que as concentrações e o tipo dos fluidos dielétricos tem efeito significativo sobre a altura das plantas ( $p \leq 0,01$ ) (Tabela 4.16). O aumento nas frações de contaminação dos solos causou um atraso no crescimento da planta e os dados foram ajustados usando o modelo de regressão quadrática aplicado aos dois fluidos dielétricos (Figuras 4.18a e b). As plantas que cresceram em solo contaminado com o W3 tornaram-se mais altas do que as que crescem em solo contaminado com o Lubrax. CHEN *et al.*, (2013) também relataram que um aumento nas frações de contaminação a base de diesel afetou significativamente a germinação de sementes, o alongamento de raízes e o crescimento de plântulas de *Acorus tatarinowii*.

Verificou-se uma redução no diâmetro do caule à medida que as concentrações de fluidos nos solos aumentaram. Os dados do diâmetro do caule foram ajustados por um modelo de regressão quadrática (Figuras 4.18c e d) e a análise de variância indicou que esta variável foi significativamente afetada pela concentração e pelo tipo de fluido ( $p \leq 0,01$ ), diferenciando do controle para os três anos de estudo (Tabela 4.16). Houve melhorias no diâmetro no terceiro ano, tanto em solos contaminados com o W3 como em solos contaminados com o Lubrax. Notou-se que o solo contaminado com Lubrax causou maior efeito no diâmetro do caule das plantas.

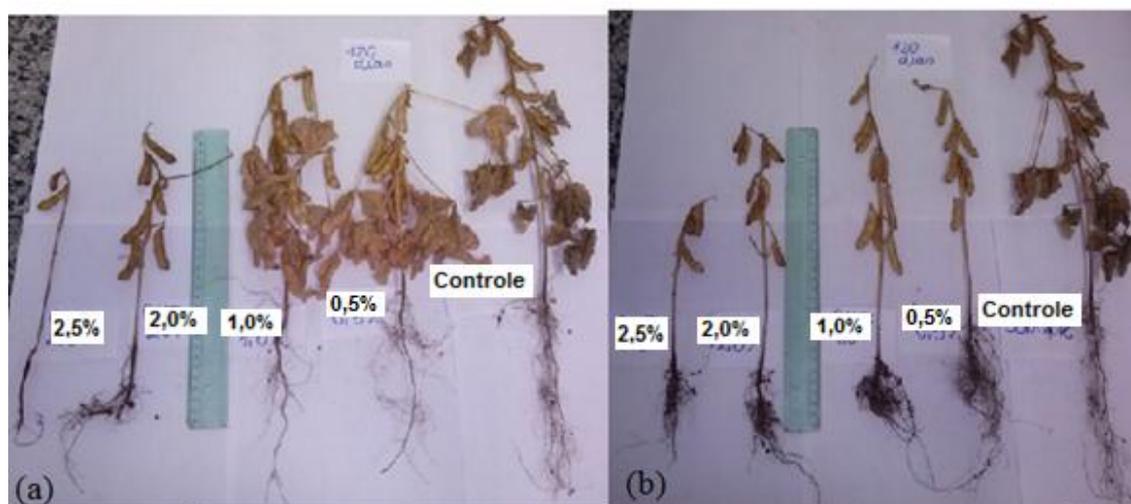


**Figura 4.18** - Altura da planta e diâmetro do caule da soja de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) e (c) W3 e (b) e (d) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita

O estudo do sistema radicular da soja foi importante para entender as relações de absorção de água e nutrientes. Os dados do comprimento da raiz foram ajustados aplicando o modelo quadrático para os três anos de colheita (Figuras. 4.24a e b) e através da análise de variância observou-se que a concentração e os diferentes fluidos dielétricos interferiram no comprimento da raiz ( $p \leq 0,01$ ), conforme mostrado na Tabela 4.16.

Observou-se que, no primeiro ano de colheita, todas as concentrações de W3 e Lubax influenciaram o crescimento da planta e alteraram a sua morfologia. Como resultado, o sistema radicular da soja contaminada com W3 apresentou poucas ramificações, porém houve a formação de nódulos. A formação de nódulos nas raízes foi um indicador importante, pois são neles que as bactérias do gênero *Rhizobium* fixam o nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos que são utilizados pelas plantas, eliminando ou diminuindo a necessidade de uso de adubos nitrogenados. Nos solos

contaminados com Lubrax, verificou-se um aumento no número de ramificações laterais e houve uma clara inibição da nodulação (Figuras 4.19a e b).



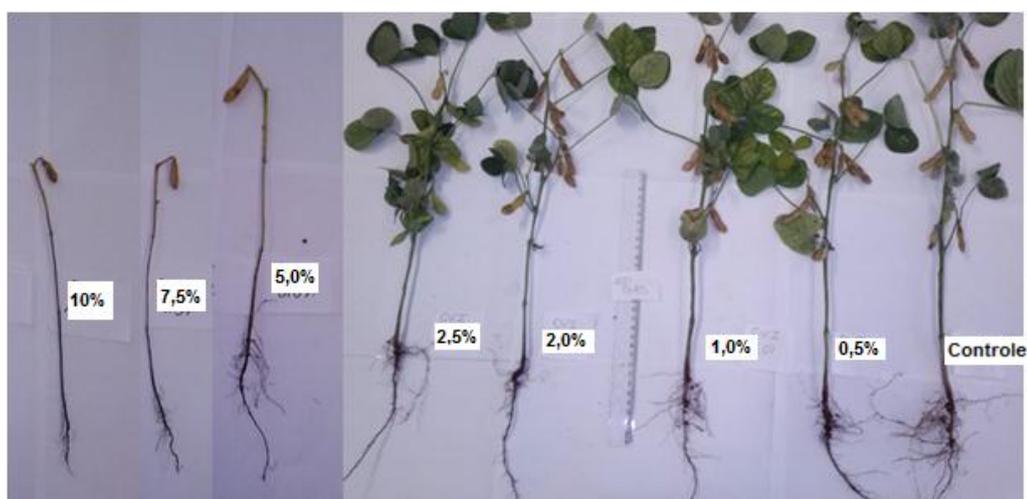
**Figura 4.19** - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro ano de colheita

Uma redução na nodulação de raízes de leguminosas, como observado nesta pesquisa, também foi observado nos estudos de WERNER *et al.* (1998), ORTA *et al.* (1999), MERKL *et al.* (2004) e NATERA *et al.* (2005). Nestes estudos, os autores sugeriram que a nodulação é inibida por compostos aromáticos derivados de hidrocarbonetos de petróleo que reduzem o crescimento e/ou atividade de rizóbios, ou perturbam a troca química de moléculas mensageiras entre simbiotes e hospedeiros.

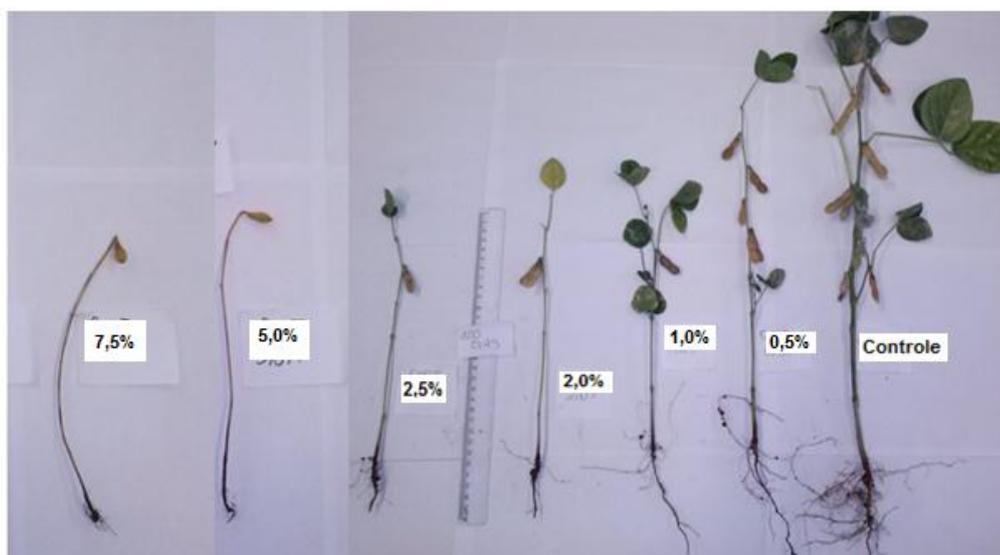
As medidas do comprimento da raiz foram inferiores às das plantas em solo com W3. Em ambos os casos, a morfologia da raiz diferiu do sistema radicular da soja cultivada sob condições normais de crescimento (Figura 4.19a e b). De acordo com GOGOSZ *et al.* (2010), o petróleo e seus derivados no solo diminuiu a capacidade de retenção de água interferindo desta forma no crescimento das plantas. Portanto, o óleo mineral provavelmente causou uma maior impermeabilização do solo do que o óleo vegetal, o que resultou em disponibilidade insuficiente de nutrientes para a planta e o crescimento do sistema radicular foi uma resposta a uma deficiência hídrica. TAIZ & ZEIGER (2013) relataram que o crescimento de raízes secundárias de plantas submetidas ao estresse

hídrico é uma reação de autoproteção, a fim de estimular a busca de água. Mais uma evidência apoiando esta hipótese foi relatada por ADAM & DUNCAN (1999), que em seus estudos descreveram um aumento das raízes laterais em plantas crescendo em solo contaminado com petróleo, detectando-se migração do crescimento radicular para áreas não contaminadas quando tinham esta opção. No trabalho relatado por DA SILVA OLIVEIRA *et al.* (2008), as plantas de aroeira que estavam em solo contaminado apresentaram um sistema radicular mais ramificado e mais denso quando comparadas às raízes das plantas que estavam em solo não contaminado.

O comportamento do sistema radicular da soja, no segundo ano de colheita, em solo contaminado com os fluidos dielétrico apresentou resultado divergente em relação ao primeiro ano. Nos solos contaminados com W3, as raízes apresentaram maior número de ramificações laterais, houve formação de nódulos em todas as concentrações estudadas e os resultados do comprimento da raiz foram superiores aos das plantas cultivadas em solos com Lubrax. Nos solos contaminados com Lubrax houve diminuição no número de ramificações laterais e quase nenhum nódulo foi formado sob concentrações de 5% e 10%. Observou-se também que, nessas concentrações, ocorreu redução da penetração do sistema radicular, que pode ser interpretada como uma resposta ao aumento da compactação do solo sob tais condições (Figuras 4.20 e 4.21).

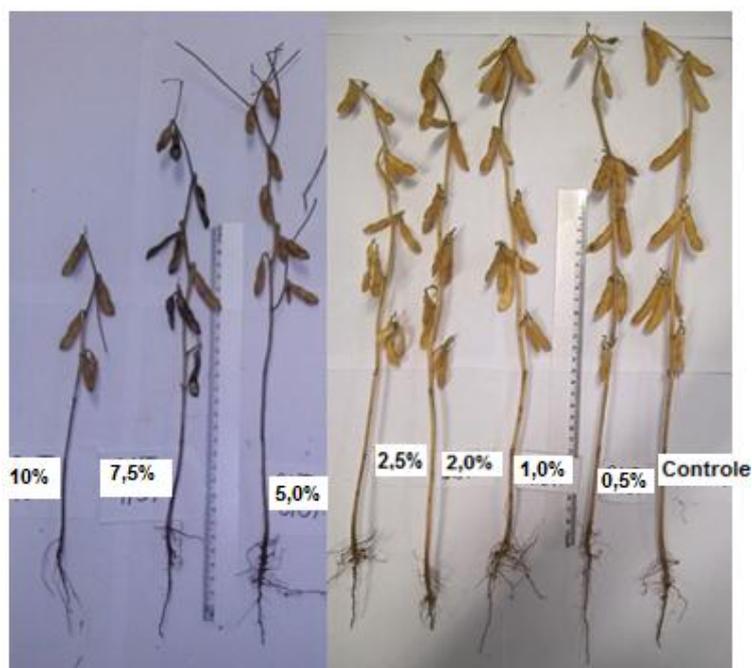


**Figura 4.20** - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 no segundo ano de colheita

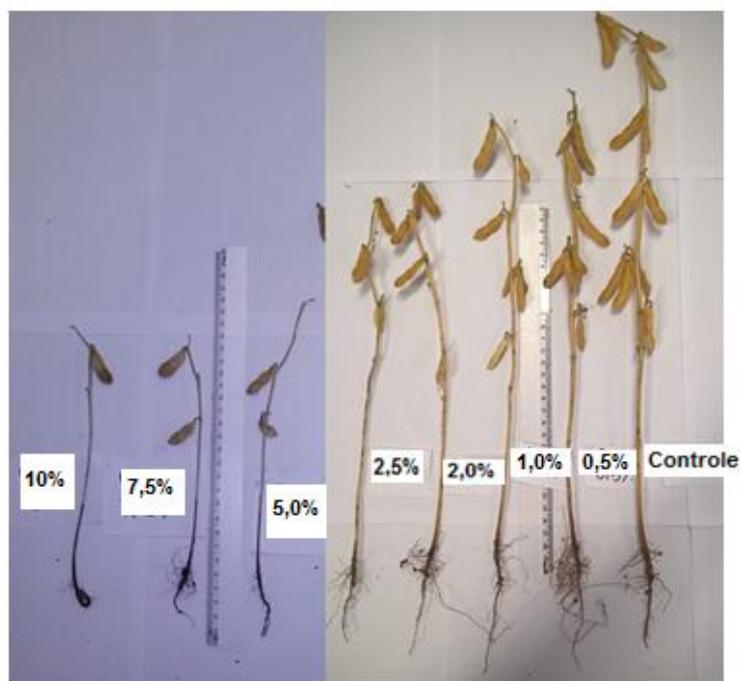


**Figura 4.21** - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico Lubrax no segundo ano de colheita

O sistema radicular de soja, no último ano de colheita, em solo contaminado com W3 e Lubrax sob concentrações de 0,5% até 2,5% aproximou-se do sistema radicular do controle em relação ao número de ramificações e formação de nódulos. O comprimento da raiz da soja cultivada em solo contaminado com W3 foi maior do que com o Lubrax (Figuras 4.22 e 4.23). Através da análise visual, observou-se que os solos contaminados com Lubrax apresentaram alguma compactação, principalmente sob as concentrações de 5 e 10% e as raízes desenvolveram-se superficialmente. Houve mudanças e redução no comprimento do sistema radicular, restringindo a absorção de água e nutrientes. A resposta das raízes ao impedimento mecânico se resume, essencialmente, à pressão que a raiz precisa exercer para aumentar sua dimensão ou criar novos poros. A compactação do solo reduz a infiltração de água no solo e aumenta o risco de erosão e de déficit hídrico e nutricional nas plantas, fazendo com que as raízes desenvolvam-se superficialmente (BURIOLA PRANDO *et al.*, 2010).



**Figura 4.22** - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 no terceiro ano de colheita



**Figura 4.23** - Soja cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico Lubrax no terceiro ano de colheita

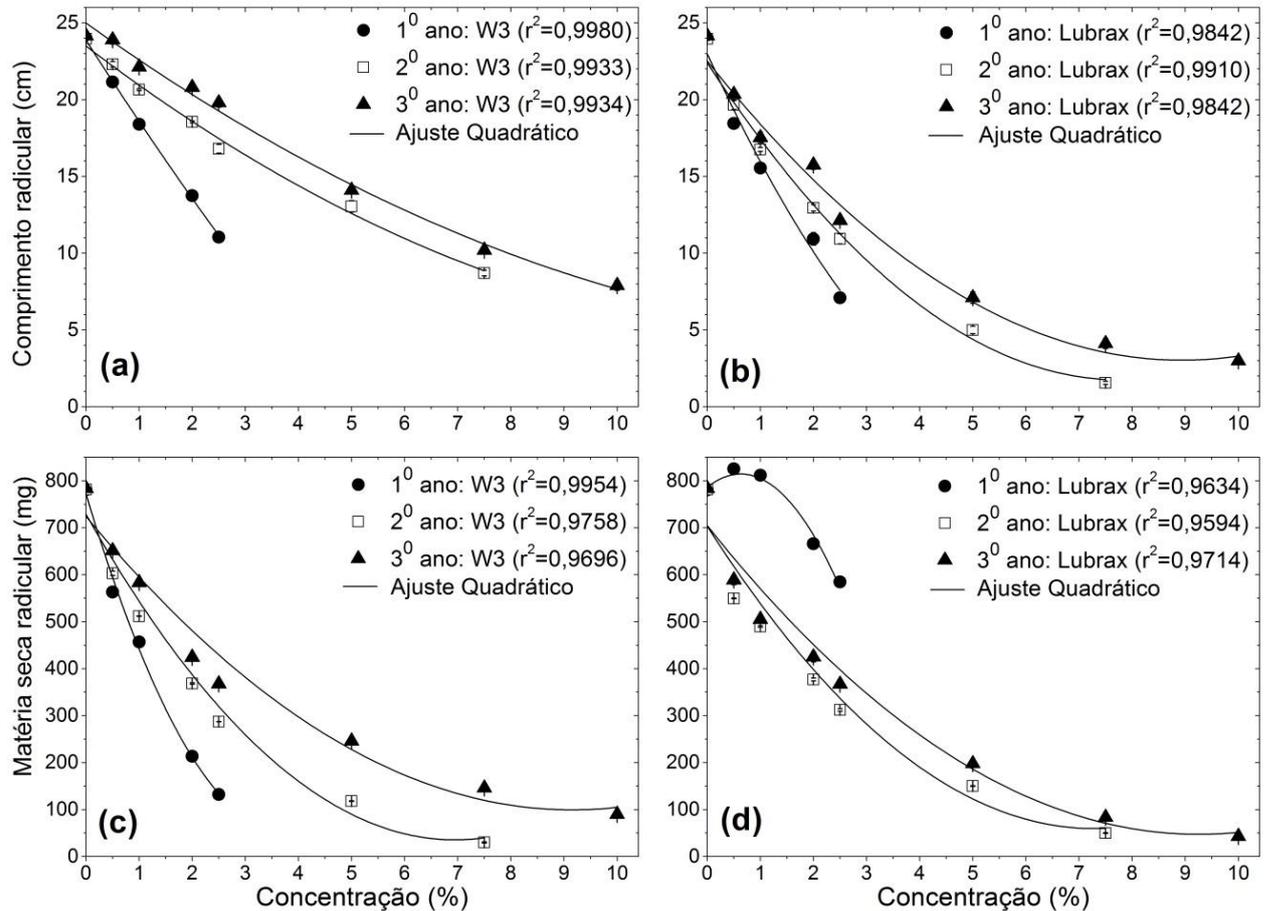
Em trabalhos relatados por PEZESHKI *et al.* (2000), HERNANDEZ-VALENCIA & MAGER (2003), para avaliar o efeito do petróleo nas plantas, constatou-se a formação

de uma película de óleo na região cortical e da epiderme da raiz, caule e folhas. De acordo com HERNANDEZ-VALENCIA & MAGER (2003), a formação de película de óleo no sistema radicular promoveu mudanças nas taxas de absorção de água e nutrientes. Além disso, os hidrocarbonetos penetraram nos tecidos das plantas e podem ocorrer danos às membranas celulares, resultando em perda de conteúdo celular, bloqueio de espaços intercelulares e redução do transporte de metabólitos e culminando em mudanças nas taxas de processos celulares vitais, como respiração e fotossíntese.

A quantificação da massa seca foi uma ferramenta importante para entender o comportamento de crescimento, uma vez que vários processos fisiológicos que afetam o desenvolvimento da planta foram relacionados a este parâmetro. Com exceção da água, a massa seca consiste em tudo o que se encontra na planta, incluindo carboidratos, proteínas, lipídios e nutrientes minerais. Para uma boa produção de matéria seca, é necessário um metabolismo equilibrado e, com desenvolvimento sem impedimento, macro e micronutrientes devem estar disponíveis em solução e também devem ser absorvidos em proporções equilibradas. Os nutrientes no solo melhoraram as propriedades físicas e químicas do solo através da promoção do crescimento das plantas (BRANDELERO *et al.*, 2002; BENINCASA, 2003).

Para os três anos de colheita a análise de variância mostrou que ocorreram interações ( $p \leq 0,01$ ) entre a matéria seca das raízes em relação às concentrações, tipos de fluidos e o controle (Tabela 4.16) e a função quadrática se ajustou melhor para a produção de matéria seca radicular das plantas (Figuras 4.24c e d). Observou-se que no primeiro ano de colheita, a produção de matéria seca das plantas em contato com o solo contaminado com o Lubrax apresentou uma inversão na concavidade em relação às demais, atingindo seu ponto máximo na concentração de 0,5% (Figura 4.24d). Este fenômeno ocorreu devido a maior produção de massa seca ocasionada pelas anomalias na morfologia das raízes, que tiveram um aumento de ramificações laterais como uma resposta a uma deficiência hídrica, como visto anteriormente. Embora o teor de matéria seca das plantas em solo contaminado com o Lubrax tenha sido superior ao W3, observou-se que as plantas em contato com o Lubrax apresentaram menor desenvolvimento fisiológico, que pode ter sido causado pelo estresse no sistema radicular, pois quando as raízes são afetadas o metabolismo da planta fica comprometido. Os valores de matéria seca radicular das plantas, no segundo ano, em solo contaminado com W3 foram superiores aos do Lubrax. A diminuição acentuada no acúmulo de matéria seca das plantas com Lubrax deveu-se a mudanças em seu sistema

radicular. No terceiro ano de colheita, a massa seca da raiz foi maior do que o segundo ano e o W3 apresentou melhores resultados.



**Figura 4.24** - Comprimento de raízes e produção de matéria seca radicular de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) e (c) W3 e (b) e (d) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita

Pelo estudo da análise de variância detectou-se interação ( $p \leq 0,01$ ) entre a emergência, altura da planta, diâmetro do caule, comprimento radicular e produção de matéria seca das raízes da soja em relação às diferentes concentrações, diferentes tipos de fluidos dielétricos e o controle para os três anos de colheita em solo contaminado e a função quadrática foi a que se ajustou melhor.

Todas as concentrações de W3 e Lubrax no primeiro ano de colheita influenciaram na fisiologia e morfologia da soja. O segundo ano apresentou resultado divergente em relação ao primeiro ano. Porém, no terceiro ano, em solo contaminado com os fluidos

dielétrico, os resultados das avaliações fitotécnicas tiveram um comportamento semelhante ao controle e o W3 apresentou melhores resultados do que o Lubrax.

A emergência de solos contaminados com W3 e Lubrax no terceiro ano foi maior que a do segundo ano de plantio, e ocorreu emergência em todas as concentrações e todas as suas plantas completaram seu ciclo de vida. Verificou-se uma redução na altura das plantas, no diâmetro do caule, no comprimento da raiz e na produção de matéria seca radicular das plantas à medida que as concentrações de fluidos nos solos aumentaram e os resultados mostraram que o solo contaminado com Lubrax causou maior efeito na estrutura da soja.

A análise de variância realizada para o primeiro, segundo e terceiro ano de condução do experimento mostrou que a interação ( $p \leq 0,01$ ) ocorreu através do teste F, em relação aos anos de colheita, entre diferentes tratamentos e tipos de fluidos dielétricos, interferindo no número de vagens por planta, número de grãos por planta e massa de mil grãos. As médias das testemunhas foram superiores às médias das que crescem na presença de W3 e Lubrax durante os três anos, conforme Tabela 4. 17.

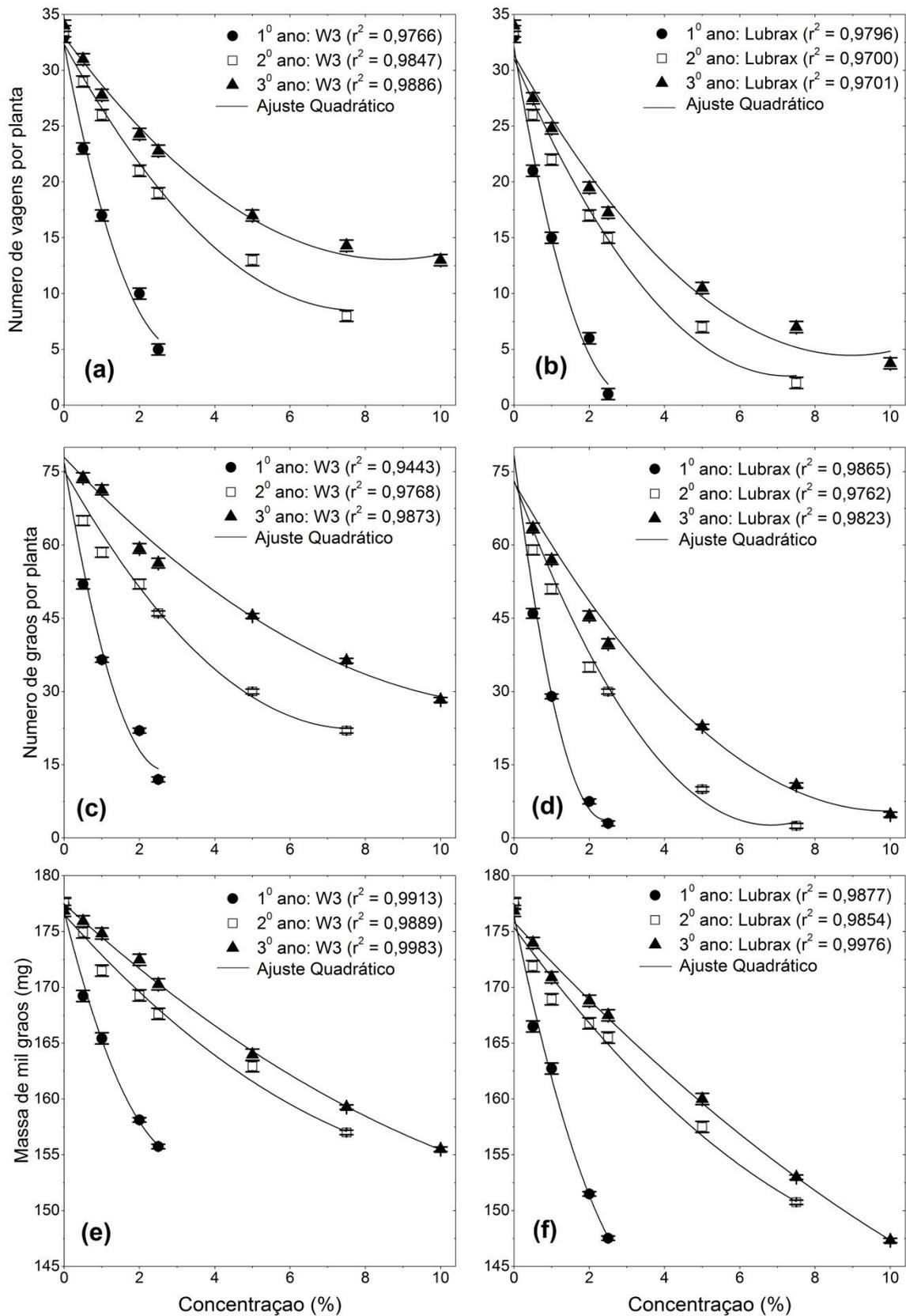
**Tabela 4.17** - Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro ano de colheita do número de vagem por planta (VP), número de grãos por planta (GP) e massa de mil grãos (M1000) da soja em solo contaminado com diferentes concentrações de fluido dielétrico W3 e Lubrax.

Parâmetros	Graus de liberdade	Quadrados médios - Ano 01 (2014/2015)			Graus de liberdade	Quadrados médios - Ano 02 (2015/2016)			Graus de liberdade	Quadrados médios - Ano 03 (2016/2017)		
		VP	GP	M1000		VP	GP	M1000		VP	GP	M1000
		(mg)				(mg)				(mg)		
<b>Tratamentos</b>	8	300.92**	2210.19**	348.24**	12	308.70**	1932.60**	219.07**	14	314.71**	2073.03**	332.95**
<b>Fatorial (AxB)</b>	7	134.34**	875.64**	235.63**	11	236.40**	1485.24**	190.83**	13	270.72**	1842.37**	320.04**
<b>Controle</b>	1	1467.01**	11552.00**	1136.45**	1	1104.01**	6853.56**	529.66**	1	886.63**	5071.54**	500.81**
<b>Resíduos</b>	27	0.75926	1.98148	0.705	39	2.21795	2.8141	0.9075	45	2.45	4.07222	2.06956
<b>Médias</b>												
<b>Controle</b>		33.00	81.50	177.48		33.50	81.25	177.55		34.00	80.75	176.85
<b>Vegetal (W3)</b>		14.25	31.94	162.13		19.25	46.46	167.59		21.43	52.93	167.46
<b>Mineral (Lubrax)</b>		11.12	17.06	157.06		13.17	29.88	163.56		15.75	34.86	163.07
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		6.87	5.74	0.53		9.19	4.40	0.58		8.42	4.60	0.87

\*\* - significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F; A – W3 (vegetal); B – Lubrax (mineral)

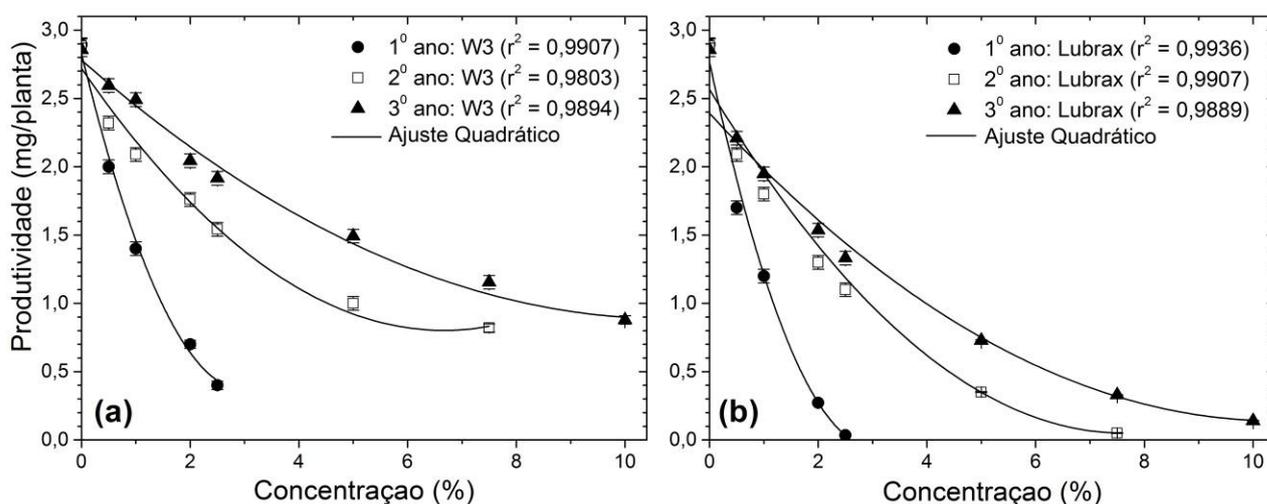
O número de vagens por planta, grãos por planta e massa de mil grãos ajustaram-se ao modelo de regressão quadrática nos três anos de estudo para os dois fluidos analisados, como mostrado nas Figuras 4.25a, b, c, d, e e f. O aumento da concentração do W3 e do Lubrax diminuiu a resposta dessas variáveis, evidenciando uma redução na produtividade e o Lubrax apresentou resultados inferiores. Os números médios superiores de vagens por planta, grãos por planta e massa de mil grãos foram observados nas concentrações 0,5%, 1%, 2%, e 2,5%, para os dois fluidos dielétricos testados. O terceiro ano de colheita foi superior em relação aos outros anos estudados para as variáveis analisadas devido a biodegradabilidade dos fluidos no solo.

O número de vagens produzido pela planta é uma das principais características em relação aos componentes de produtividade e é diretamente influenciado pelos fatores que afetam o crescimento e a ramificação da planta durante a floração e o início da formação de vagens (MANCIN *et al.*, 2009). A redução no número total de vagens afeta diretamente o número de grãos, bem como o inverso (HEIFFIG *et al.*, 2006), observou-se neste experimento que o número total de grãos teve correlação com o número de vagens.



**Figura 4.25** - Número de vagens por planta, número de grãos por planta e massa de mil grãos de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a), (c) e (e) W3 e (b), (d) e (f) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita

A produtividade de grãos (mg/planta) encontrada no controle foi maior do que em todos os solos contendo fluidos dielétricos, e as plantas no solo contaminado com W3 apresentaram maior produção que os obtidos no solo contaminado com o Lubrax. Os valores médios de produtividade dos três anos de colheita apresentaram uma resposta de regressão quadrática. O aumento da concentração dos fluidos dielétricos causou redução na produção (em mg/planta). Analisando o comportamento geral das plantas entre os diferentes tratamentos, observou-se maior produtividade nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 2,5%, para o qual ambos os fluidos testados apresentaram resultados superiores durante o terceiro ano de colheita, conforme mostrado nas (Figuras 4.26a e b).



**Figura 4.26** - Produtividade (em mg/planta) de acordo com as diferentes concentrações de fluidos dielétricos (a) W3 e (b) Lubrax no primeiro (●), segundo (□) e terceiro (▲) ano de colheita

A produtividade da soja foi significativamente afetada pelas diferentes concentrações de W3 e Lubrax. As plantas que estavam em solo contaminadas com o W3 apresentaram valores maiores do que as plantas que estavam no solo contaminado com Lubrax.

Neste trabalho, foi possível avaliar a biodegradabilidade e toxicidade de fluidos dielétricos de transformadores a fim de contribuir para uma melhor compreensão dos riscos ambientais em solo e no meio aquático. A biodegradabilidade dos fluidos dielétricos de

crambe, W3, W6 e W9 mostraram ser facilmente biodegradáveis enquanto que o fluido dielétrico Lubrax mostrou ser mais resistente a biodegradação.

Os testes de toxicidade aguda forneceram dados que permitiram mensurar os efeitos toxicológicos causados pelo fluido dielétrico W3 e Lubrax nas primeiras horas de um derramamento, comparar os efeitos toxicológicos causados pelos diferentes fluidos dielétricos definindo qual é mais tóxico para o meio aquático e comparar a sensibilidade dos diferentes organismos expostos. Os resultados obtidos no presente estudo revelam que o contato direto dos organismos *Danio rerio* e *Artemia salina* com o fluido dielétrico W3 causa maior mortalidade do que com o Lubrax, podendo estar associado à presença de óleo na superfície da água, depleção de oxigênio ou propriedades de revestimento que levaram a asfixia dos organismos. Derrames de óleos vegetais e seus efeitos nocivos no meio aquático são relatados na literatura (MCKELVEY *et al.*, 1980; GROENEWOLD *et al.*, 1982; MUDGE *et al.*, 1993; MUDGE, 1995; RIGGER, 1997, BUCAS & SALIOT, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; WINCELE *et al.*, 2004, SALAM *et al.*, 2012). Tais derrames foram prejudiciais para os pássaros, peixes e outros organismos aquáticos.

Já os resultados com a fração solúvel em água, o fluido dielétrico Lubrax mostrou ser mais tóxicos que o W3, sugerindo que os componentes existentes na estrutura no óleo mineral apresentam elevada toxicidade. Em relação aos efeitos toxicológicos causados pela fração solúvel em água do fluido dielétrico Lubrax, estudos tem revelado que a fração solúvel de produtos derivados do petróleo contém muitos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e BTEX, sendo os principais compostos responsáveis pela toxicidade aquática, podendo causar lesões e estresse oxidativo nos organismos (SIMONATO *et al.*, 2008; ACHUBA & OSAKWE, 2003; VAN DER OOST *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003 e ZHANG *et al.*, 2004).

O derramamento de óleo no solo pode retardar a germinação das sementes, diminuir a altura da planta, o diâmetro do caule, a taxa fotossintética e a biomassa, ou causar mortalidade completa das plantas. A intensidade do dano causado pelo óleo depende de uma série de fatores como o tipo e volume do óleo derramado, a sensibilidade das plantas, as espécies e a extensão da cobertura vegetal, a idade da planta, as condições climáticas predominantes e época do derramamento (PEZESHKI *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2002; PARADA & DE VIANA, 2005). Logo, os resultados de toxicidade dos fluidos dielétricos no solo mostraram que o aumento da concentração dos fluidos diminuiu a resposta aos atributos fitotécnicos da soja, diferindo do controle. No entanto, todas as

características avaliadas na soja apresentaram melhor desempenho, tanto qualitativa quanto quantitativamente durante os anos de colheita. Estes resultados revelaram que as plantas, além de ter mecanismos de defesa contra os efeitos adversos causados por esses compostos também foram influenciadas pelo cultivo sucessivo de soja, onde a redução dos efeitos nocivos sobre o crescimento e desenvolvimento da planta foi influenciada pela taxa de degradação. Os testes de degradação dos fluidos dielétricos mostraram que houve redução no TOG e no teor de carbono durante os anos agrícolas em todas as concentrações estudadas e a taxa de degradação dependia principalmente do composto e da concentração do fluido dielétrico.

Assim, os estudos comparativos da biodegradabilidade e da toxicidade desses fluidos dielétricos no solo e no meio aquático mostraram que o fluido dielétrico vegetal pode ser usado como fluido dielétrico e possui potencial para substituir o mineral.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo foram investigados os efeitos deletérios do fluido dielétrico vegetal e mineral, através de ensaios de biodegradabilidade, toxicidade aguda utilizando os organismos *Danio rerio* e *Artemia salina*, ensaios dos atributos químicos e degradação (óleos e graxas) do solo e das avaliações das características fitotécnicas da soja.

- Os resultados da biodegradabilidade imediata mostraram que os fluidos dielétricos vegetais (W3, W6, W9 e Crambe) são biodegradáveis num período de incubação inferior a 14 dias, enquanto o óleo mineral (Lubrax) é difícil de ser biodegradado.
- O fluido dielétrico W3 apresentou uma concentração letal média (CL<sub>50</sub>) menor do que o fluido dielétrico Lubrax, causando maior mortalidade nos organismos *Danio rerio* e a *Artemia salina*.
- A fração solúvel em água do fluido dielétrico Lubrax causou uma toxicidade maior do que o fluido dielétrico W3, em ambos os bioindicadores testados.
- As análises cromatográficas da fração solúvel em água dos fluidos dielétricos usados nos testes com o *Danio rerio*, não foram conclusivas. Apenas sugerem que a toxicidade causada pelo fluido dielétrico mineral (Lubrax) pode estar relacionada à solubilidade de todas as substâncias presentes em sua estrutura e não apenas com a solubilidade dos n-alcanos.
- A recuperação do meio aquático contaminado com fluido dielétrico vegetal deve ser realizada de imediato e na camada superficial, pois a mortalidade pode estar associada à presença de óleo na superfície da água, causando asfixia dos organismos que vivem na superfície, depleção de oxigênio e formação de polímeros não degradáveis em água. A fração solúvel em água não se apresentou tóxica.
- De acordo com as análises realizadas no solo, os fluidos dielétricos não interferiram nos atributos químicos (pH, P, K, Ca, Mg, CTC e V) do solo contaminado. Apenas o carbono apresentou variação crescente em relação às concentrações de fluidos dielétricos.

- Os resultados obtidos no processo de degradação das diferentes concentrações e dos diferentes tipos de fluidos dielétricos mostraram que houve redução do teor de óleos e graxas durante os anos agrícolas. Os solos em presença do W3 apresentaram maior degradação do que os solos contaminados com o Lubrax.
- Durante os anos de colheita, as características fitotécnicas avaliadas apresentaram desenvolvimento e reações diferenciadas, em resposta a diferentes concentrações dos fluidos dielétricos W3 e Lubrax.
- O aumento da concentração dos fluidos dielétricos ocasionou redução na emergência, altura da planta, diâmetro do caule, comprimento radicular, produção de matéria seca radicular das plantas, número de vagens por planta, grãos por planta e massa de mil grãos e produtividade.
- À medida que as concentrações de fluidos nos solos aumentaram os resultados mostraram que o solo contaminado com Lubrax causou maior efeito na estrutura da soja.
- O estudo mostrou que a intensidade do dano causado depende do tipo e do volume de óleo derramado. As plantas que estavam em solos contaminados com o Lubrax obtiveram resultados inferiores as que foram cultivadas em solo com W3, esse comportamento foi observado nos três anos de colheita.
- O estudo revelou que as plantas, além de ter mecanismos de defesa contra os efeitos adversos causados por esses compostos também foram influenciadas pelo cultivo sucessivo de soja, onde a redução dos efeitos nocivos sobre o crescimento e desenvolvimento da planta foi influenciada pela taxa de degradação.
- Por meio dos estudos comparativos da biodegradabilidade e da toxicidade dos fluidos dielétricos no solo e no meio aquático os resultados mostraram que o fluido vegetal pode ser usado como fluido dielétrico em transformadores e possui potencial para substituir o fluido mineral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMALIK, A. A.; ABBOTTB, A.P.; FOTHERGILL, J. C.; DODDA,S.; HARRISB, R. C. **Synthesis of a base-stock for electrical insulating fluid based on palm kernel oil.** *Industrial Crops and Products*, v. 33, n. 2, p. 532–536, Mar., 2011.

ABDELMALIK, A.A. **The feasibility of using a vegetable oil-based fluid as electrical insulating oil.** Thesis of Doctor the Department of Engineering the University of Leicester. UK. 2012. 182 f.

ABDULLAHI, U. U.; BASHI, S. M. **The potentials of palm oil as a dielectric fluid.** *National Power & Energy Conference*, p. 224–228, 29-30 Nov. 2004.

ABEYSUNDARA, D. C.; WEERAKOON, C.; LUCAS, J.R.; GUNATUNGA, K. A. I.; OBADAGE, K. C. **Coconut oil as an alternative to transformer oil.** *ERU Symposium*, p. 1–8, Nov., 2001.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes.** Rio de Janeiro, 2004.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15422: Óleo Vegetal Isolante para Equipamentos Elétricos.** Rio de Janeiro, 2015a.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15469: Ecotoxicologia Aquática preservação e preparo de amostras.** Rio de Janeiro, 2015b.

ACHUBA, F. I.; OSAKWE, S. A. **Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*).** *Fish physiology and Biochemistry*, 29(2), 97-103, 2003.

ADAM, G. AND DUNCAN, H. J. **Effect of diesel fuel on growth of selected plant species.** *Environmental geochemistry and health* 21(4):353-357, 1999.

AGBIO, 2017, **AGBIOELETRIC®** óleo vegetal isolante. (accessed at 08/11/2017), <http://www.agbioeletric.fag.edu.br/produtos.php>

AGUIAR, C.R.C., LOPES, B.C., BARBOSA, M.V.D., BALIEIRO, F.C. AND GOMES M.M. **Fitorremediação de Solos Contaminados por Petróleo.** *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 6(1):3, 2012.

AHMED E.B. ABU-ELANIEN.; SALAMA. M.M.A. **Asset management techniques for transformers.** *Electric Power Systems Research*, v. 80, n. 4, p. 456–464, April, 2010.

AL-AMIN, H.; O'BRIEN, J.; LASHBROOK, M. **Synthetic ester transformer fluid: A total solution to windpark transformertechnology.** *Renewable Energy*, v. 49, p. 33 e 38, 2013.

AL-AMMAR, E. A. **Evaluation of seed oils based on statistical breakdown data for their application as insulating fluids in distribution transformers.** *European Journal of Scientific Research*, v. 40, n. 1, p. 15–26, jan., 2010.

ALVARENGA, P. **Utilização de Resíduos Orgânicos Biodegradáveis na Remediação de Solos Degradados por Atividades Mineiras.** Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, 2009. 15-99 pp.

AMAKIRI, J. O.; ONOFEHARA, F. A. **Effects of crude oil on the germination of Zea mays and Capsicum frutescens.** *Environmental Pollution. Kidlington*, v. 35, p. 159- 167, 1984.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados.** *Eclética Química*, v. 35, n. 5, p. 17-43, set., 2010.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS. Resolução nº 36, de 5 de dezembro de 2008. Especificações dos óleos minerais isolantes tipo A e tipo B, de origem nacional ou importada, comercializados em todo o território nacional, consoante às disposições contidas no Regulamento Técnico ANP nº 4/2008, parte integrante desta Resolução. Disponível em:

<[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2008/dezembro/ranp%2036%20-%202008.xml](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/dezembro/ranp%2036%20-%202008.xml)> Acesso em: 04 set. 2014.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis.** 19 ed., Washington, D. C, 2012.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22<sup>o</sup> ed. Washington, 2012.

ARAGÃO, M. A., ARAÚJO, R. P. A. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos.** In: Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: RiMa., p. 117-152, 2008

ARANTES, J. G. **Diagnóstico de Falhas em Transformadores de Potência pela Análise de Gases Dissolvidos em Óleo Isolante Através de Redes Neurais**. Universidade Federal de Itajubá, Itajubá. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado).

ARMILIATO, N.; AMMAR, D.; NEZZI, L.; STRALIOTTO, M.; MULLER, Y. M.; NAZARI, E. M. **Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate**. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 77, n. 7, p. 405-414, 2014.

ARAZOE, S.; SARUHASHI, D.; SATO, Y.; YANABU, S.; UETA, G.; OKABE, S. **Electrical characteristics of natural and synthetic insulating fluids**. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, v. 18, n. 2, p.506–512, 2011.

ASSIS, M. L. V. **Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado).

AZIS, N, JASNI, J, AB KADIR, M. Z. A, MOHTAR, M. N. **Suitability of Palm Based Oil as Dielectric Insulating Fluid in Transformers**. *Journal of Electrical Engineering & Technology*, v. 9, n. 2, p. 662-669, 2014.

BAGLIANO, R. V. **Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais**. *Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 2, n. 1, p.24-40, 2012.

BAKER, J.M. **The effects of oils on plants**. *Environmental Pollution*, Kidlington, v. 1, n. 1, p. 27-44, 1970.

BARBEE, G. C., MILES, M. S., UMEJURU, O.; HALL, S. G. **Acute Toxicity (LC50) of South Louisiana Crude Oil, Mineral Oil and Peanut Oil to the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii* LC**. *Freshwater Crayfish*, 17, 227-233, 2010.

BARZOTTO, F. **Nitrogênio e água como fatores de produtividade da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado).

BASHI, S. M.; ABDULLAHI, U. U.; YUNUS, R.; NORDIN, A. **Use of natural vegetable oils as alternative dielectric transformer coolants**. *Journal of the Institution of Engineers*, v. 67, n. 2, p. 4-9, Jun., 2006.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas.** Jaboticabal: Funep, 2003.

BERAN, E. **Experience with evaluating biodegradability of lubricating base oils.** *Tribology International*, 41(12), 1212-1218, 2008.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry.** 6. ed. New York: W.H. Freeman, 2006.

BLISS, C. I. (1935). **The calculation of the dosage-mortality curve.** *Annals of Applied Biology*, 22(1), 134-167.

BLUM, W. E. **Functions of soil for society and the environment.** Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, v.4, n.3, p.75-79. 2005.

BRANDELERO, E., PEIXOTO, C. P., SANTOS, J. M. B., MORAES, J., PEIXOTO, M. AND SILVA, V. Índices fisiológicos e rendimento de cultivares de soja no Recôncavo Baiano. *Magistra, Cruz das Almas* 14:77-88, 2002.

BRASIL. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, 365p. Brasília: Departamento Nacional de Produção Vegetal, 1992.

BRUZZONITI, M. C.; DE CARLO, R. M.; SARZANINI, C.; MAINA, R.; TUMIATTI, V. **Determination of copper in liquid and solid insulation for large electrical equipment by ICP-OES: application to copper contamination assessment in power transformers.** *Talanta*, Amsterdam, v. 99, p. 703-711, Sep., 2012.

BUCAS, G.; SALIOT, A. **Sea transport of animal and vegetable oils and its environmental consequences.** *Marine pollution bulletin*, 44(12), 1388-1396, 2002.

BUJOKAS, W.M. **Impacto da poeira de cimento em *Schinus terebenthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*).** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado).

BUTLER, J., PARKERTON, T., LETINSKI, D., BRAGIN, G., LAMPI, M., COOPER, K. **A novel passive dosing system for determining the toxicity of phenanthrene to early life stages of zebrafish.** *Sci. Total Environ.* 463, 952–958, 2013.

BURATINI, S. V. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos.** In: Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: RiMa, 2008

BURIOLA PRANDO, M., OLIBONE, D., ENCIDE OLIBONE, A. P. AND ROSOLEM, C. A. **Infiltração de água no solo sob escarificação e rotação de culturas.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(3):693-700, 2010.

CAMPO, P., ZHAO, Y., SUIDAN, M. T., VENOSA, A. D., SORIAL, G. A. **Biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil triacylglycerols under aerobic conditions.** *Chemosphere*, 68(11), 2054-2062, 2007.

CARDOSO E. J. B. N.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BINI, D.; MIYAUCHI, M. Y. H.; SANTOS, C. A.; ALVES, P. R. L.; PAULA, A. M.; NAKATANI, A. S.; PEREIRA, J. M.; NOGUEIRA, M. A. **Soil health: Looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health?** *Scientia Agricola*, v. 70, n. 4, p. 274-289, jul/aug., 2013.

CASTRO, D. N. B. **Estudo em modelo físico 1D e 3D de remediação eletrocinética com uso de surfactante em solo argiloso contaminado com óleo cru.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado).

CECUTTI, C., AGIUS, D. **Ecotoxicity and biodegradability in soil and aqueous media of lubricants used in forestry applications.** *Bioresource technology*, 99(17), 8492-8496, 2008.

CELLA, A. J. S. **Métodos uni e multivariados para estudo de adaptabilidade e estabilidade em soja.** Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado).

CHAPELLE, F. H. **Ground-water microbiology and geochemistry.** 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 477 p.

CHATTERJEE, A.; BHATTACHARJEE, P.; ROY, N.K. **Mathematical model for predicting the state of health of transformers and service methodology for enhancing their life.** *International Journal of Electrical Power & Energy Systems*, London, v. 43, p. 1487-1494, Aug., 2012.

CHATTERJEE, A.; BHATTACHARJEE, P.; ROY, N.K.; KUMBHAKAR. P. **Usage of nanotechnology based gas sensor for health assessment and maintenance of transformers by DGA method.** *International Journal of Electrical Power & Energy Systems*, London, v. 45, n. 1, p. 137-141, Feb., 2013.

CHEN, L., LIU, X., ZHANG, X., LIU, S., WEI, J. AND XU, G. **Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress.** *Plant and soil* 368(1-2):355-363, 2013.

CHERUBIN, M. R.; EITELWEIN, M. T.; FABBRIS, C.; WEIRICH, S. W.; SILVA, R. F.; SILVA, V. R.; BASSO, C. J. **Qualidade física, química e biológica de um latossolo com diferentes manejos e fertilizantes.** *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 39:615-625, p. 615-625, 2015.

CHUPAKHINA, G. N.; MASLENNIKOV, P. V. **Plant adaptation to oil stress.** *Russian Journal of Ecology, Moscou*, v. 35, n. 5, p. 290-295, 2004.

CIURIUC, A.; DUMITRAN, L.M.; NOTINGHER, P.V. **Dielectric properties of paper insulation aged in the presence of vegetable transformer oil.** *Solid Dielectrics (ICSD)*, 2013. *IEEE International Conference on* , v., n., p.549-552, June 30 2013-July 4 2013.

CLAIBORNE, C. C.; CHERRY, D. B. **A status update on the use of natural ester (vegetable oil) dielectric fluids in transformers.** *Anais do 74th Doble International Client Conference*, Boston, MA, 2006.

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

COUTO, M. G. **Determinação da toxicidade aguda e crônica de hexavalente [Cr(VI)] para a biomassa em sistemas de lodo ativado, aplicando a respirometria como técnica de avaliação.** Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado).

CRUZ, C.D. **Programa Genes.** Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, Editora UFV, 1997. 442p.

CRUZ, R. G. **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico.** Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado).

CUNHA, L. S. **Toxicidade aguda sobre *Daphnia similis* decorrente de contaminação aquática recente e antiga por gasolina, etanol e suas misturas: Simulações em escala de bancada.** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado).

DA SILVA OLIVEIRA, L., BONA, C., DE OLIVEIRA SANTOS, G. AND KOEHLER, H. S. **Crescimento de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em solo contaminado com petróleo.** *Revista Acta Ambiental Catarinense* 5(1/2):21-33, 2008.

DARWIN, A.; PERRIER, C.; FOLLIOT, P. **The use of natural esters in transformers,** in: *MATPOST Conference*, 2011.

DANG, V.H.; BEROUAL, A.; PERRIER, C. **Comparative study of statistical breakdown in mineral, synthetic and natural ester oils under AC voltage.** *IEEE International Conference on Dielectric Liquids*, p. 1–4, 2011.

DEON, M. C.; ROSSI, A.; MAGRO, C. D.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. **Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural.** *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, jan./jun., 2012.

DEUTSCHER, M.P.; SIMON, M.I.; ABELSON, J.N. **Guide to protein purification.** Ed. Academic Press, Inc., Cap. IV: Buffers: Principles and Practice. STOLL, V.S.; BLANCHARD, J.S., 1990, 24-38p.

DEZOTTI, M. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos.** 1 ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2008. 360 p., v. 5 (Série Escola Piloto de Engenharia Química)

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. **Seleção, manutenção e cultivo de organismos Aquáticos.** Cap. 7, p: 153 – 184. 2006. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

EBERHARDT, R.; MUHR, H. M.; LICK, W.; WIESER, B.; SCHWARZ, R.; PUKEL, G. **Partial discharge behaviour of an alternative insulating liquid compared to mineral oil.** *IEEE International Symposium on Electrical Insulation*, p. 1–4, 2010.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2 ed. Rio de Janeiro, 2006.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** 2ª ed. rev. ampl. – Brasília: Embrapa informação Tecnológica, 2009. 627p.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants.** Report EPS 1/RM/12. p. 85, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada, 1992.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS): Method 8260C.** Washington, DC. Revision 3. Aug. 2006.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Nonhalogenated Organics Using GC/FID: Method 8015C.** Washington, DC. Revision 3.Feb. 2007a.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ultrasonic Extraction: Method 3550C.** Washington, DC. Revision 3.Feb. 2007b.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Volatile Organic Compounds in Various Sample Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis: Method 5021A.** Washington, DC. Revision 2. Jul. 2014.

EPIFÂNIO, L.C. **Contribuição para o Estudo da Influência de Dióxido de Carbono no Processo de Biodegradação (Reactor Fed-Batch Proporcional).** Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2003. 244 f. Dissertação (Mestrado).

FERNANDES, M. **Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina.** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. 213 f. Tese (Doutorado).

FERNÁNDEZ, I.; ORTIZ, A.; DELGADO, F.; RENEDO, C.; PÉREZ, S. **Comparative evaluation of alternative fluids for power transformers.** *International Journal of Electric Power Systems Research*, v. 98, p.58– 69, 2013.

FERRO, V. R. H. **Desenvolvimento de um método expedito para avaliação da biodegradabilidade do couro.** Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2013. 143 F. Dissertação (Mestrado).

FOFANA, I.; WASSERBERG, V.; BORSI, H.; GOCKENBACH, E. **Challenge of mixed insulating liquids for use in high voltage transformers. Part 1: investigation of mixed liquids.** *IEEE Electrical Insulation Magazine*, v. 18, n. 3, p. 18–31, Jul., 2002.

FOFANA, I.; N'CHO, J. S.; OLIVARES-GALVAN, J. C.; ESCARELA-PEREZ, R.; GEORGILAKIS, P.S. **Comparative studies of the stabilities to oxidation and electrical discharge between ester fluids and transformer oils,** In: *43rd North American Power Symposium*, 2011, p. 1–4, 2011.

FRANCH. V. S. **Avaliação da compatibilidade de óleos vegetais isolantes com materiais internos do transformador.** Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado).

FREITAS, C. E. L.; PAVANIN, L. A.; NISHIYAMA, L.; SANTOS, F. C. **Estudo de espécies que podem ser usadas como fitorremediadoras em solos contaminados com**

**óleo mineral isolante.** 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Florianópolis, 23-26 maio, 2011.

FRITSCHÉ, W.; HOFRICHTER, M. **Aerobic degradation by microorganisms.** In: JÖRDENING, H. J.; WINTER, J. *Biotechnology: environmental processes II.* 2 ed. Volume 11b, Published Online, 2005.

FURTADO, M. **Remediação de solos: Hidrogeologia define concepção do projeto - Estudo das condições naturais do solo define técnica ideal para recuperar área contaminada.** *Revista Química e Derivados*, n. 446, fev., 2006.

GALVAN, D.; ORIVES, J. R.; COPPO, R. L.; RODRIGUES, C. H. F.; SPACINO, K. R.; PINTO, J. P. P.; BORSATO, D. **Estudo da cinética de oxidação de biodiesel B100 obtido de óleo de soja e gordura de porco: Determinação da energia de ativação.** *Revista Química Nova*, v. 37, n. 2, p. 244-248, abr., 2014.

GEIGER, D. L.; BROOKE, L. T.; CALL, D. J. **Acute Toxicities of Organic Chemicals to Fathead Minnows**, Vol. 5 Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin, Superior, WI: 332 p. 1990.

GOGOSZ, A. M., BONA, C., SANTOS, G. O. AND BOTOSSO, P. **Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.(Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil.** *Brazilian Journal of Biology* 70(4):977-986, 2010.

GOMES JR., S. B. **Avaliação técnica e econômica da aplicação de óleo vegetal de crambe como isolante elétrico em comparação com óleo de soja.** Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento e Instituto de Engenharia do Paraná, Curitiba. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado).

GONÇALVES, R. A. **Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre ao organismo marinho *Mysidopsis juniae*.** Universidade da Região de Joinville, Joinville. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado).

GRANATO, R.C. **Transformadores.** *Revista Eletricidade Moderna*, São Paulo, n 336, p. 38 – 45, março, 2002.

GROENEWOLD, J. C., PICO, R. F., WATSON, K. S. **Comparison of BOD relationships for typical edible and petroleum oils.** *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 398-405, 1982.

HAMMER, M.; BADENT, R.; SCHWAB, A. J. **Electrical properties of rape-seed oil.** *Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, p. 83–86, 2002.

HAO. J.; LIAO. R; CHEN, G.; MA. Z.; YANG, L. **Quantitative analysis ageing status of natural ester-paper insulation and mineral oil-paper insulation by polarization/depolarization current.** *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on* , v.19, n.1, p.188-199, Feb. 2012.

HASAN, S.D.M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de Drechslera (Helminthosporium) monoceras obtida por fermentação em estado sólido.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. Tese (Doutorado).

HEATHCOTE M. J. *J & P Transformer Book*, 2011.

HEIFFIG, L. S., CÂMARA, G. D. S., MARQUES, L. A., PEDROSO, D. B. AND PIEDADE, S. D. S. **Fechamento e índice de área foliar da cultura da soja em diferentes arranjos espaciais.** *Bragantia* 65(2):285-295, 2006.

HELENO, F. F.; LIMA, A. C.; AFONSO, R. J. C. F.; COUTRIM, M. X. **Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida.** *Química Nova [online]*, v.33 (2), p. 329-336, 2010.

HERNÁNDEZ-VALENCIA, I. AND MAGER, D. **Uso de Panicum maximum y Brachiaria brizantha para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano.** *Bioagro* 15(3):149-155, 2003.

HODGSON, E. Em **A Textbook of Modern Toxicology**; Hodgson, E., ed.; 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2004, cap. 1.

HORNING, M.; KELLY, J.; MYERS, S.; STEBBINS, R. **Transformer Maintenance Guide.** 3 ed., Transformer Maintenance Institute, S. D. Myers Inc., 2004.

HUANG. Q.; WANG. B; LI. J; YANG. L.; LIAO. R. **The compatibility tests between vegetable insulating oil and mineral insulating oil.** *High Voltage Engineering and Application (ICHVE)*, 2014. *International Conference on* , v., n., p.1,4, 8-11 Sept. 2014.

IMAD-U-KHAN, WANG, Z., COTTON, I. **Dissolved gas analysis of alternative fluids for power transformers.** *IEEE Electrical Insulation Magazine*, v. 23, n. 5, p. 5-14, sep/oct., 2007.

JALBERT J, DUCHESNE S, RODRIGUEZ-CELIS E, TÉTREAULT P, COLLIN P. **Robust end sensitive analysis of methanol and ethanol from cellulose degradation in mineral oils.** *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1256, p. 240- 245, sep., 2012.

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água do sedimento do Rio Corumbataí, SP.** Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. 119 p. Dissertação (Mestrado).

JIMENEZ, R. L.; GONÇALVES, W. G.; ARAÚJO FILHO, J. V.; ASSIS, R. L.; PIRES, F. R.; SILVA, G.P. **Crescimento de plantas de cobertura sob diferentes níveis de compactação em um latossolo vermelho.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, UFCA*, v.12, n.2. p.116-121, 2008.

JOVALEKIC, MM.; KOLB, D.; TENBOHLEN, S.; BATES, L.; SZEWCZYK, R. **A methodology for determining water saturation limits and moisture equilibrium diagrams of alternative insulation systems.** *IEEE International Conference on Dielectric Liquids*, p. 1–5, 2011.

KAMAL, M. S. A.; BASHIR, N.; MUHAMAD, N. A. **Insulating properties of vegetable oils and their blends.** *IEEE Power Engineering and Optimization Conference (PEOCO)*, p. 455-458, 3-4 June 2013.

KANO, T.; SUZUKI, T. OBA, R.; KANETANI, A.; KOIDE, H. **Study on the oxidative stability of palm fatty acid ester (PFAE) as an insulating oil for transformers.** *IEEE International Symposium on Electrical Insulation (ISEI)*, p. 22-25, 10-13 June 2012.

KHAN, N., WARITH, M. A., LUK, G. **A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms.** *Journal of the Air & Waste Management Association*, 57(3), 286-296, 2007.

KHAYAM, U.; RAJAB, A.; SUWARNO. **Dielectric properties, partial discharge properties, and dissolved gas analysis of ricinus oils as biodegradable liquid insulating materials.** *Condition Monitoring and Diagnosis (CMD), 2012 International Conference on* , v., n., p.1249,1252, 23-27 Sept. 2012.

KIASATINA, K.; KAMAROL, M.; ZULHILMEY, M.; ARIEF, Y. A. **Breakdown characteristics of RBDPO and soybean oil mixture for transformer application.** *International Conference on Electrical, Control and Computer Engineering*, p. 219–222, 21-22 Jun., 2011.

KLEINE, T. **Cinética da toxicidade aguda da fração solúvel de compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) oriundas do petróleo em microcrustáceos marinhos.** Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville, 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado).

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA: GTZ, 2004. p 84-106.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal.* São Carlos: RiMa, 2000.

LEMOS, J. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; BARROS, C. A.; SCHLITTLER, L. A. F. S. **Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), propriedades e fatores que afetam sua degradação.** *Diálogos e Ciência*, Salvador, ano 3, n. 11, p. 79-87, 2009.

LIAO, R.; HAO, J.; CHEN, G.; MA, Z.; YANG, L. **A comparative study of physicochemical, dielectric and thermal properties of pressboard insulation impregnated with natural ester and mineral oil.** *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, v. 18, n. 5, p.1626–1637, 2011.

LIMA, A. C. R.; BRUSSAARD, L.; TOTOLA, M. R.; HOOGMOED, W. B.; GOEDE, R. G. M. **A functional evaluation of three indicator sets for assessing soil quality.** *Applied Soil Ecology*, v. 64, p. 194-200, feb., 2013.

LI, X.; LI, J.; SUN, C. **Properties of transgenic rapeseed oil based dielectric liquid.** *Proceedings of the IEEE SoutheastCon*, p. 81–84, March 31- April 2, 2006.

LI, Z., WRENN, B. A., VENOSA, A. D. **Anaerobic biodegradation of vegetable oil and its metabolic intermediates in oil-enriched freshwater sediments.** *Biodegradation*, 16(4), 341-352, 2005.

LIN, Q., MENDELSSOHN, I. A., SUIDAN, M. T., LEE, K. AND VENOSA, A. D. **The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*.** *Marine Pollution Bulletin* 44(9):897-902, 2002.

LIU, R.; TÖRNKVIST, C.; CHANDRAMOULI, V.; GIRLANDA, O.; PETTERSSON, L. A. A. **Ester fluids as alternative for mineral oil: the difference in streamer velocity and LI breakdown voltage.** *IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, p. 543–548, 2009.

LIU, Q.; WANG, Z.D. **Breakdown and withstand strengths of ester transformer liquids in a quasi-uniform field under impulse voltages.** *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions*, v. 20, n.2, p.571-579, April., 2013.

LOUREIRO, S. (2004). **Ecotoxicity Assessment of Soils: a Case Study from Mina de Jales.** PhD Thesis, Universidade de Aveiro, Aveiro. 176 pp.

LOZADA, C. M. C. **Índice de qualidade do solo para a avaliação do impacto de diferentes usos e manejos e sua aplicação em uma área rural de Planaltina (DF)**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado).

LUZ JÚNIOR, G. E. da; GUIMARÃES NETO, J. M.; MOITA NETO, J. M. **Ação adsorvente da bauxita sobre óleo isolante novo**. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 535-538, Maio/Jun., 2005.

MACHADO, V. V. B. **Análise ecotoxicológica e química da estação de Tratamento de efluentes de uma indústria de laticínios em Goiás**. Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado).

MAGALHÃES, L. A.; QUITÉRIO, G. C. M.; SOUZA FILHO, C. R.; ALMEIDA, T. I. R.; ALVES, M. N.; OLIVEIRA, W. J.; RABACO, L. M. L.; ROCHA, R. **Imagens ProSpecTIR-VS e espectroscopia de reflectância aplicados na caracterização espectral dos dosséis de cinco culturas vegetais cultivadas em solo com vazamentos controlados de hidrocarbonetos**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR), 15, 2011b, Curitiba. Anais... São José dos Campos: INPE, 2011. p. 8567-8574. Disponível em:< <http://www.dsr.inpe.br/sbsr2011/files/p1596.pdf>>. Acesso em 30.out. 2017.

MALALLAH, G.; AFZAL, M.; GULSHAN, S.; KURIAN, M.; DHAMI, M. S. I. **Vicia faba as a bioindicator of oil pollution**. *Environmental Pollution, Kidlington*, v. 92, n. 2, p. 213-217, 1996.

MALALLAH, G; AFZAL, M.; KURIAN, M.; GULSHAN, S.; DHAMI, M.S.I. **Impact of oil pollution on some desert plants**. *Environment International, New York*, v. 24, n. 8, p. 919-924, 1998.

MANCIN, C.R., SOUZA, L.C.F., DE NOVELINO, J.O., MARCHETTI, M.E. AND GONÇALVES, M.C. **Desempenho agrônômico da soja sob diferentes rotações e sucessões de culturas em sistema plantio direto**. *Acta Scientiarum: Agronomy* 31(1):71-77.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; VILLASEÑOR, R.; RÍOS, G.; ESPINOSA-CHAVEZ, F. **Toxicity of the crude oil water-soluble fraction and kaolin-adsorbed crude oil on *Daphnia magna* (Crustacea: Anomopoda)**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, n. 4, p. 444-449, 2005.

MATSINHE, C.C. 2011. **Studies on the influence of organic waste biodegradability in the composting process**. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado).

MCKELVEY, R. W., ROBERTSON, I., WHITEHEAD, P. E. **Effect of non-petroleum oil spills on wintering birds near Vancouver.** *Marine Pollution Bulletin*, 11(6), 169-171, 1980.

McSHANE, C.P.; GAUGER, G.; LUKSICH, J. **Fire resistant natural ester dielectric fluid and novel insulation system for its use.** *IEEE/PES Transmission & Distribution Conference*, v. 2, p. 890 – 894, 11-16 Apr. 1999.

McSHANE, C. P. **Vegetable-oil-based dielectric coolants,** *IEEE Industry Applications Magazine*, v. 8, n. 3, p. 34-41, may/jun., 2002.

McSHANE, C. P.; CORKRAN, J.; RAPP, K.; LUKSICH, J. **Natural ester dielectric fluid development.** *IEEE/PES Transmission and Distribution Conference and Exhibition*, p. 18-22, 21-24 May, 2006.

MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R. AND INFANTE, C. **Phytoremediation in the tropics—the effect of crude oil on the growth of tropical plants.** *Bioremediation Journal* 8(3-4):177-184, 2004.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., McI. AUGHLIN, J. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, jan., 1982.

MILASCH, M. **Manutenção de transformadores em líquido isolante.** 5ª Reimpressão. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. Volume 1.

MILDEMBERGER L. **Avaliação do desempenho de indicadores de degradação de sistemas isolantes papel/óleo usados em transformadores de potência.** Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado).

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Gestão de óleo lubrificante automotivo usado em oficinas automotivas.** Projeto programa piloto para a minimização dos impactos gerados por resíduos perigosos. Pernambuco, 46p., 2006

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais.** São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 1998. 150 p.

MUDGE, S. M., SALGADO, M. A., EAST, J. **Preliminary investigations into sunflower oil contamination following the wreck of the MV Kimya.** *Marine Pollution Bulletin*, 26(1), 40-44, 1993.

MUDGE, S. M. **Deleterious effects from accidental spillages of vegetable oils.** *Spill Science & Technology Bulletin*, 2(2), 187-191, 1995.

MÜLLER, J.B. **Avaliação da toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5).** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. 112f. Dissertação (Mestrado).

NASCIMENTO, I.A.; SOUZA, E.C.; NIPPER, M. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil.** São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo. 2002.

NATERA, J. R. M., BLANCO, C. F. M. AND MORALES, F. B. P. **Efecto de la contaminación con petróleo sobre los caracteres de la nodulación en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en dos suelos del estado Monagas,** 2005.

N'CHO, J.S.; FOFANA, I.; BEROUAL, A.; AKA-NGNUI, T.; SABAU, J. **The gassing tendency of various insulating fluids under electrical discharge.** *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, v.18, n. 5, p. 1616 - 1625 (2011).

NIPPER, M. **Avaliação de toxicidade de efluentes.** Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, São Paulo, 2002.

NOBRE, M.M; NOBRE, R.C. **Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho.** *Revista Química e Derivados*, n. 417, jul., 2003.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for Testing of Chemicals. **Fish, Acute Toxicity Test:** n. 203. Paris, 1992.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for Testing of Chemicals. **Ready Biodegradability:** n. 301. Paris, 1992.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for Testing of Chemicals. **Ready Biodegradability - CO<sub>2</sub> Evolution Test:** n. 301B. Paris, 1992

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for Testing of Chemicals. **Inherent Biodegradability - Zahn-Wellens/EMPA Test:** n. 302B. Paris, 1992.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for Testing of Chemicals. **Inherent Biodegradability - Modified MITI Test (II):** n. 302C. Paris, 1992.

OKABE, S.; UETA, G.; TSUBOI, T. **Investigation of aging degradation status of insulating elements in oil-immersed transformer and its diagnostic method based on field Measurement Data.** *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, New York, v. 20, n. 1, p. 346-355, feb., 2013.

OLIVEIRA, M. **Estudo fitoquímico e das atividades biológicas de *Temnadenia stellaris* (Lindl.) Miers (Apocynaceae).** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado).

OOMMEN, T. V. **Vegetable oils for liquid-filled transformers.** *IEEE Electrical Insulation Magazine*. v. 18, n. 1, p. 6–11, Jan/Fev., 2002.

ORTA, A., LEAL, A. AND MICHELENA, V. A. **Evaluación ecotoxicológica de suelos contaminados con petróleo mediante la simbiosis rizobio–frijol.** *Revista de Agricultura y Biología de Suelos, RABSU* 1(1):34-36, 1999.

PARADA, G. L. AND DE VIANA, M. L. **Germination and survival of *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) in soils containing petroleum hydrocarbon contaminants. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.** *Ecología Austral* 15:177-181, 2005.

PENA, H. W. A; HOMMA, A. K. O; SILVA, F.L. **Análise de viabilidade econômica: um estudo aplicado a estrutura de custo da cultura do dendê no estado do Pará-Amazônia-Brasil,** 2010. Observatório Iberoamericano del Desarrollo Local y la Economía Social, *Revista académica, editada y mantenida por el Grupo EUMED.NET de la Universidad de Málaga*, Año 5 – n. 11 – Diciembre, 2011.

PEREIRA, M. G., MUDGE, S. M., LATCHFORD, J. **Consequences of linseed oil spills in salt marsh sediments.** *Marine pollution bulletin*, 44(6), 520-533, 2002.

PEREIRA, E. M.; FILHO, M. T. L.; MENDES, F. A.; MARTINS, A. N. A.; ROCHA, A. P. T. **Potencial toxicológico frente *Artemia salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande-PB.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável (Revista Verde)*, Pombal, v. 10, n.1, p. 52 - 56, jan/mar., 2015.

PEZESHKI, S. R., HESTER, M. W., LIN, Q. AND NYMAN, J. A. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental pollution* 108(2):129-139, 2000.

PINTO, V. B. **Aplicação do óleo vegetal de andiroba (*Carapa Guianensis*) como fluido isolante dielétrico em transformadores de distribuição de energia.** Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará, Belém. 2014. Dissertação (Mestrado).

PUKEL, G.J.; EBERHARDT, R.; MUHR, H. M.; BAUMANN, F.; LICK, W. **Large power transformers for alternative insulating fluids.** *Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Symposium on High Voltage Engineering*, p. 1–4, 2009.

QUITÉRIO, G. C. M. **Uso da Reflectância da vegetação como ferramenta de auxílio na detecção de anomalias geobotânicas causadas pela presença de hidrocarbonetos líquidos.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010, 177 p. Tese (Doutorado).

RAMALHO, V. C; JORGE, N. **Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos.** *Revista Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul/ago., 2006.

RAMLI, M. R.; ARIEF, Y. Z.; AZLI, S. A.; MUHAMAD, N. A.; LAU, K.Y.; FARHAN, M.; BASHIR, N.; MOHD, N. K. ; HUEY, L.W.; KIAT, Y. S. **Partial discharge characteristics of palm fatty acid ester (PFAE) as high voltage insulating material.** *Power Engineering and Renewable Energy (ICPERE)*, 2014. International Conference on , v., n., p.262-266, 9-11 Dec. 2014.

RATUSHNYAK, A.A.; ANDREEVA, M.G.; LATYPOVA, V.Z.; SHAGIDULLIN, R.R.; TRUSHIN, M.V. **Toxicity of Oil and Products of its Refinement to *Daphnia magna*: Time and Temperature Dependences.** *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v. 5, n. 4, p. 545-549, 2009.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químico e avaliação sensorial.** Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.114 f. Dissertação (Mestrado).

RIGGER, D. **Edible oils: are they really that different?.** In: *International Oil Spill Conference* (Vol. 1997, No. 1, pp. 59-61). American Petroleum Institute.

RISER-ROBERTS, V. **Remediation of petroleum contaminated soil: biological, physical, and chemical process.** Lewis Publishers, 1998. 542 p.

RISTIC, O.; MIJAILOVIC. V. **Method for determining optimal power transformers exploitation strategy.** *International Journal of Electric Power Systems Research*, v. 83, p. 255 – 261, 2012.

RODGHER, S. **Ecotoxicological analysis of the water and sediment from middle and low Tietê River Cascade Reservoirs (State of São Paulo, Brazil)**. *Acta Limnol. Bras.*, v. 15, n. 3, p. 81-93, 2003.

RODRIGUES, R.V.; MIRANDA-FILHO, K.C.; GUSMÃO, E.P.; MOREIRA, C.B.; ROMANO, L.A.; SAMPAIO, L.A. **Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae**. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 2054-2059, 2010.

ROSA, G. S. **Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado).

ROZGA, P. **Properties of new environmentally friendly biodegradable insulating fluids for power transformers**. *1<sup>st</sup> Annual International Interdisciplinary Conference, AIIC*, 24-26 April, Azores, Portugal, 2013.

RUBINGER, C.F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado).

SALAM, D. A., NAIK, N., SUIDAN, M. T., VENOSA, A. D. **Assessment of aquatic toxicity and oxygen depletion during aerobic biodegradation of vegetable oil: effect of oil loading and mixing regime**. *Environmental science & technology*, 46(4), 2352-2359, 2012.

SALAM, D. A., SUIDAN, M. T., VENOSA, A. D. **Biodegradation and toxicity of vegetable oils in contaminated aquatic environments: Effect of antioxidants and oil composition**. *Science of The Total Environment*, 547, 95-103, 2016.

SALAZAR, V. L. P. **Estudo da biodegradação das fibras de coco e de sisal visando às aplicações na indústria automotiva**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2005. 144 f. Tese (Doutorado).

SANTOS, F. C. S. **Resíduos impregnados com óleo mineral isolante na CEMIG: Avaliação das técnicas de compostagem, fitorremediação e processo oxidativo para seu tratamento**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013. 306 F. Tese (Doutorado).

SHIMP, R. J.; LARSON, R. J. BOETHLING, R. S. 1990. **Use of biodegradation data in chemical assessment**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 1369-1377.

SIMONEIT, B. R. T. 1993. **Hidrothermal alteration of organic matter in marine and terrestrial systems**. In: Organic Geochemistry – Principles and Applications (M. H. Engel & S. A. Macko, eds) Topics in Geobiology. Plenum Press. New York, V. 11, p. 397-418.

SILVA, F. L. N.; SANTOS JR., J. R.; MOITA NETO, J. M.; SILVA, R. L. G. N.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E. **Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí**. *Química Nova* [online], v.32 (1), p. 56-60, 2009.

SILVA, S. M.; CORREA, F. J. **Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica**. *Semestre Económico*, v.12, n.23, p.13-34. 2009.

SILVA, C. R.; CARVALHO, M. W. N. C.; CONRADO, L. S.; FOOK, M. V. L.; LEITE, K. P. S. **Caracterização físico-química e dielétrica de óleos biodegradáveis para transformadores elétricos**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 16, n. 2, p. 229-234, feb., 2012.

SILVA, D. C. **Avaliação da interação de materiais internos do transformador com fluidos isolantes tipo éster natural e óleo mineral** Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013a, 86 f. Dissertação (Mestrado).

SILVA, M. A. **Ensaio de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd + Cu) em Tilápias do Nili (*Oreochromis niloticus*)**. Centro da Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013b, 125 f. Dissertação (Mestrado).

SIMONATO, J. D., GUEDES, C. L., MARTINEZ, C. B. **Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(1), 112-120, 2008.

SOUZA, G. C. **Estudo da toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico (NPOH) sobre zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**. Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá, 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado).

STOCCO, M. B. C. **Avaliação do potencial de aplicação de óleos vegetais como fluidos isolantes em transformadores de distribuição da rede elétrica**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado).

SULEIMAN, A. A., MUHAMAD, N. A. B.. **Feasibility Study on the Use of Vegetable Oil (NaturalEster) in Malaysia Power System Transformers**. *Transactions on Electrical and Electronic Materials* v. 15, n. 3, p. 113-116, June 25, 2014.

TAIZ L. AND ZEIGER E . Plant physiology. Porto Alegre: Artmed., 2013.

TRIGUEROS, D. E. G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008. 179 f. Dissertação (Mestrado).

TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; KROUMOV, A. D. **The evaluation of benzene and phenol biodegradation kinetics by applying non-structured models.** *Water Science & Technology—WST*, v. 61, n. 5, p. 1289 – 1298, 2010.

UHREN, W. **Aplicação de óleo vegetal como meio isolante em equipamentos elétricos, em substituição ao óleo mineral.** Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento e Instituto de Engenharia do Paraná, Curitiba. 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado).

USEPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, **BTEX.** BTEX is the term used for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene-volatile aromatic compounds typically found in petroleum product, such as gasoline and diesel fuel. 2010.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149, 2003.

VAN GESTEL, C. A. M., VAN DER WAARDE, J. J., DERKSEN, J. G.M., VAN DER HOEK, E. E., VEUL, M. F. X. W., BOUWENS, S., RUSCH, B., KRONENBURG, R., STOKMAN, G. N. M. **The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils.** *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (7): 1438-1449, 2001.

VANNI, S.M. **Modelos de regressão: estatística aplicada.** São Paulo: Legmar Informática & Editora, 1998. 177p

VARTANIAN, P. F. **The Chemistry of modern petroleum product additives.** *Journal of Chemistry Education*, v. 12, n. 68, p. 1015 – 1019, Dec., 1991.

VELASQUEZ, J. L.; SANZ, M. A.; ARELLANO, S. G. **General asset management model in the context of an electric utility: Application to power transformers.** *International Journal of Electric Power Systems Research*, v. 81, p. 2015 – 2037, Jul., 2011.

VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. **Uma visão sobre qualidade do solo.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v.33, n.4, p.743-755, Viçosa, jul/ago., 2009.

WALKER, C. H. **Principles of ecotoxicology**. 3. ed. New York: CRC Press, 2006.

WANDERLEY, E. L. **Tratamento biológico de água de produção de petróleo pré-oxidada com ozônio**. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado).

WANG. X.; WANG, Z. D. **Study of dielectric behavior of ester transformer liquids under ac voltage**. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, v. 19, p. 1916-1925, 2012.

WANG. B.; LI. J. **Thermal aging results between oil-paper insulation impregnated by mineral and vegetable insulating oil**. **High Voltage Engineering and Application (ICHVE)**, 2014. *International Conference on* , v., n., pp.1-4, 8-11 Sept. 2014.

WARRICK, A.W.; NIELSEN, D.R. **Spatial variability of soil physical properties in the field**. In: HILLEL, D. (Ed.). *Applications of soil physics*. New York: Academic, 1980. Cap.2, p.319-344.

WATTS, R.J.; HALLER, D. R.; JONES, A. P.; TEEL, A. L. **A foundation for the riskbased treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions**. *Journal of Hazardous Materials B*, v.76, 73-89, 2000.

WERNER, D., NEUMANN, H., SCHEIDEMANN, P., BODE-KIRCHHOFF, A. AND WETZEL, A. **Bioassays for soil contamination using the legume root nodule symbiosis**. *Martínez E, Hernández G Highlights of nitrogen fixation research, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London*, 231-235, 1999.

WILHELM, H. M.; TULIO, L.; UHREN, W. **Produção e uso de OVI's no setor elétrico**. *Revista Brasil Engenharia*, n. 592, p. 120-124, 2009. Disponível em: [http://www.brasilengenharia.com/portal/images/stories/revistas/edicao592/Art\\_Eng\\_Eletrica\\_2.pdf](http://www.brasilengenharia.com/portal/images/stories/revistas/edicao592/Art_Eng_Eletrica_2.pdf). Acesso em: 04 set. 2014.

WILLIAN, A.; PATTERSON, I.I.I. & OLSON, J.J. 1982. **Effects of heavy metals on radicle growth of selected woody species germinated on filter paper, mineral and organic soil substrates**. *Canadian Journal For Res.* 13:233-38.

WINCELE, D. E., WRENN, B. A., VENOSA, A. D. **Sedimentation of oil-mineral aggregates for remediation of vegetable oil spills**. *Journal of environmental engineering*, 130(1), 50-58, 2004.

YASSIN, N., MORAIS, A.R. DE., MUNIZ, J. A. **Análise de variância em um experimento fatorial de dois fatores com tratamento adicional.** *Ciências e Agrotecnologia*, Lavras, Edição Especial, p. 1541-1547, 2002.

ZAGGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações.** 2 ed. São Paulo: RiMa, 2008. 486 p.

ZHANG, J. F., SHEN, H., XU, T. L., WANG, X. R., LI, W. M., & GU, Y. F. **Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish.** *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 71(2), 234-239, 2003.

ZHANG, J. F., WANG, X. R., GUO, H. Y., WU, J. C., XUE, Y. Q. **Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1), 110-116, 2004.

ZHANG, Z.; LI, J.; ZOU, P.; GRZYBOWSKI, S. **Electrical properties of nano-modified insulating vegetable oil.** *Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, p. 1-4, 17-20 Oct., 2010.

ZHANG, Z.; LI, J.; LIAO, R.; GRZYBOWSKI, S. **Moisture diffusion in vegetable oil-paper insulation.** *IEEE International Conference on Dielectric Liquids*, p. 1-4, 2011.

ZHONGDONG, W.; XIAO, Y.; JINPING, H. ; HINSHAW, J. V.; NOAKHES, J. **Fault gas generation in natural-ester fluid under localized thermal faults.** *IEEE Electrical Insulation Magazine*, v. 28, p. 45-56, 2012.

ZOU, P.; LI, J.; SUN, C.; CHEN, X.; ZHANG, Z. **Dielectric and partial discharge properties of insulating rapeseed oil.** *International Conference on High Voltage Engineering and Application*, p. 728-731, 9-12 nov., 2008.

ZUCKER, E. **Hazard evaluation division: Standard evaluation procedure - Acute toxicity test for freshwater fish.** Washington: USEPA, Publication 540/9-85-006, 1985.

# **ANEXOS**

# 01 - Análise cromatográfica da fração solúvel em água

## Limpeza de materiais

Todas as vidrarias utilizadas no procedimento experimental foram previamente lavadas com detergente neutro, enxaguadas com água destilada e ambientadas com uma sequência de solventes: metanol, acetona, diclorometano, éter de petróleo e *n*-hexano e colocados em estufa a 100°C por uma hora, para eliminar uma possível contaminação. Como a análise é de traços e para evitar possíveis contaminações, tomou-se o cuidado de usar sempre uma ponteira limpa para cada amostra nos pipetadores automáticos.

## Análise dos *n*-alcanos

### Materiais, solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados para o experimento foram: acetona, *n*-hexano, metanol, diclorometano, éter de petróleo, dimetilsulfóxido e sulfato de sódio anidro, todos grau PA da AppliChem Panreac. O sulfato de sódio anidro utilizado para o processo de secagem durante o método de extração foi calcinado em mufla a 400°C por 24h, sendo armazenado em dessecador. A água ultrapura utilizada foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore da Bedford, MA, USA).

As fases inorgânicas utilizadas na etapa de clean up dos extratos foram sílica gel 60 da Merck, alumina 90 neutra da Macherey-Nagel, florisil (0,150–0,250 mm) da Merck, aerosil R 816 e aerosil R 106 da Evonik Industries, zeólita beta da Zeolyst International.

Os gases utilizados nas análises cromatográficas foram os gases hidrogênio, nitrogênio e ar comprimido. O gás hidrogênio e o gás nitrogênio, ambos com pureza de 99,9999%, foram adquiridos da Linde. Já o ar comprimido utilizado passa por dois filtros diferentes, DDx 11 e PDx 11 da Atlas Copco.

## **Padrão e solução**

O padrão de *n*-alcanos (C<sub>08</sub>–C<sub>40</sub>), com grau de pureza acima de 99,5%, foi adquirido da AccuStandard®, Inc. Foi preparada uma solução estoque de *n*-alcanos (C<sub>08</sub>–C<sub>40</sub>) em diclorometano, na concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup>. A validade dessa solução é de aproximadamente 6 meses. Em seguida, a partir dessa solução estoque, foram preparadas as soluções usadas para a construção da curva de calibração e para a fortificação das matrizes.

## **Extração por Ultrassom**

Em recipiente de vidro foi colocado aproximadamente 50 mL de amostra e 30 g de sulfato de sódio anidro calcinado e, adicionados 100 mL de diclorometano. A mistura foi submetida ao banho de ultrassom (Transsonic 460/H Elma) por 30 minutos. A extração foi repetida mais duas vezes recolhendo as fases orgânicas em um mesmo frasco passando por filtro de papel Whatman nº 41 (ou equivalente). O extrato foi recolhido em um balão de redução de volume adicionando-se 10 gotas de dimetilsulfóxido. Realizou-se a redução do volume até aproximadamente 2 mL em concentrador apropriado (temperatura aproximadamente de 45 °C). Após a redução do volume, transferiu-se o volume resultante para a coluna de *clean up*, quantitativamente, lavando o frasco com 3 alíquotas de 1 mL de *n*-hexano.

## **Instrumentação**

Para o desenvolvimento desse trabalho foi utilizado um cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC 2010, utilizando detector do tipo FID. Foi utilizada uma coluna capilar ZB-1 (fase estacionária contendo 99% de dimetil polisiloxano e 1% de grupamentos fenila), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,49 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 280 °C e 325 °C, respectivamente. O tipo de ionização empregado foi por ionização de chama (FID), operando sob ar comprimido e hidrogênio gasoso. O volume de injeção foi de 1 µL

no modo *split*, sendo esse, 10:01. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada a 325 °C com taxa de aquecimento de 20 °C/min, onde permaneceu por 12 minutos. Para o tratamento dos dados, foi utilizado o *software* GC Solution da Shimadzu.

## **02 - Análise dos atributos químicos do solo**

### **1. Preparo da amostra**

As amostras de solo de cada tratamento foram secas em estufa com circulação de ar forçada modelo CE - 220, marca CIENLAB, à temperatura de 40<sup>0</sup>C por 48 horas. Após a secagem as amostras foram espalhadas sobre uma folha de papel em um tabuleiro e destorrou-se, manualmente, os torrões existentes, com um rolo de madeira. Na sequência as amostras foram passadas por uma peneira com malha de 2 mm e foram transferidas para um recipiente apropriado, devidamente identificado.

### **2. Determinação do pH pelo método de CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol/L**

#### **2.1. Preparo das soluções**

- a) Solução padrão pH 4,00, marca Digimed.
- b) Solução padrão pH 7,00, marca Digimed
- c) Solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup>: Dissolveu-se 1,47 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O p.a., em água destilada, agitou-se para dissolver o sal, completado o volume para 1 litro. O pH da solução foi ajustado para 5,5 com ácido acético.

#### **2.2. Procedimento analítico**

Colocou-se 10 mL de solo de cada um dos tratamentos em béqueres de 100 mL, devidamente numerados. Adicionou-se 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol/L, em uma relação 1:2,5 (proporção de solo e CaCl<sub>2</sub>). Agitaram-se as misturas com bastão de vidro e deixou em repouso por 15 minutos para molhamento completo da amostra. Depois de transcorrido esse tempo, agitou-se novamente cada mistura com agitador de hélice, modelo AE – 40, marca Gehaka por 5 minutos a 220 rpm. As amostras foram deixadas em repouso durante 30 minutos para o equilíbrio e a decantação da suspensão.

Efetuuou-se a calibração do potenciômetro com solução padrão de pH 7,0 e pH 4,0, as soluções foram retiradas da geladeira com antecedência de forma a estarem à temperatura ambiente no instante da calibração. Decorridos 30 minutos efetuou-se a leitura do pH através do potenciômetro com eletrodo combinado, modelo DM - 22, marca Digimed, mergulhando o eletrodo na suspensão homogeneizada, sem nova agitação.

### **3. Determinação de pH pelo método da solução tampão SMP - Análise do Hidrogênio mais Alumínio ( $H^+$ + $Al^{3+}$ )**

#### **3.1.Preparo das soluções**

- a) Solução padrão pH 4,00, marca Digimed.
- b) Solução padrão pH 7,00, marca Digimed
- c) Solução-tampão SMP (para 4 L): SMP são as iniciais dos pesquisadores que desenvolveram o método (Shoemaker, Mclean & Pratt). Pesou-se 14,58 g de p-nitrofenol que foram transferidos para um béquer de 1000 mL e dissolvidos em 400 mL de água destilada quente (50° a 60°C). Colocou-se 500 mL de água destilada em béquer de 4000 mL e, agitou-se com um bastão de vidro e colocou-se água destilada gradativamente entre um reagente e outro, adicionou-se na sequência: 20,0 mL (com proveta) de trietanolamina; 24,0 g de cromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ); 8,0 g de acetato de cálcio ( $Ca(CH_3COO)_2$ ); e 424,0 g de cloreto de cálcio -  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Adicionou-se a solução de p-nitrofenol preparada. Juntou-se água destilada até aproximadamente 3000 mL. Misturou-se bem com um bastão de vidro e ajustou-se o pH para 7,5. Completou-se o volume do balão para 4000 mL e agitou-se. A solução foi guardada por 7 dias antes do uso, agitando de vez em quando, e depois acertou novamente o pH.

#### **3.2.Procedimento analítico**

Na mesma amostra em que foi feito o pH  $CaCl_2$  0,01 mol/L, adicionou-se imediatamente após a leitura do pH, 5 ml de solução SMP. Agitaram-se as misturas de cada um dos tratamentos em agitador de hélice, modelo AE – 40, marca Gehaka a 220 rpm, por 15 minutos, deixando em repouso por 1 horas.

Foi efetuada a calibração do potenciômetro com as soluções padrão de pH 7,0 e pH 4,0, antes de iniciar as determinações. Procedeu-se à leitura do pH de equilíbrio da suspensão tampão, denominada pH SMP, através do potenciômetro com eletrodo combinado, modelo DM - 22, marca Digimed.

#### **4. Extração com KCl 1 mol L<sup>-1</sup>: cálcio, magnésio e alumínio**

O Ca e o Mg trocáveis são extraídos por KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, em conjunto com o Al trocável, titulando-se, numa fração do extrato, o alumínio com NaOH, na presença de azul de bromotimol como indicador.

##### **4.1.Extração do Ca, Mg e Al**

###### **4.1.1. Preparo da solução**

- a) Solução de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>: 745,57 g de KCl p.a foram pesados e transferidos para um balão aferido de 10 L. Adicionou-se 5 L de água destilada e agitou-se para dissolver o sal. Completou-se o volume com água destilada (10 L).

###### **4.1.2.Procedimento analítico**

Para a extração do Ca, Mg e Al, colocou-se 10 mL de solo de cada um dos tratamentos em erlenmeyers de 125 mL. Adicionou-se 100 mL de solução de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Agitaram-se as amostras em agitador orbital modelo DSR - 10, marca Global Trade Technology por 15 min a 220 rpm e deixou decantar durante 12 horas.

#### **5. Determinação do cálcio + magnésio trocáveis - Método complexométrico com o emprego do EDTA**

##### **5.1.Preparo das soluções**

- a) Solução de KCN a 100 g L<sup>-1</sup>: Pesou-se 100 g de KCN que foram transferidos para um balão aferido de 1 L. Completou-se o volume com água destilada.

- b) Solução-tampão: 67,50 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foram pesados e transferidos para um balão aferido de 1 L. Colocou-se 150 mL de água destilada e agitou-se para dissolver o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Adicionou-se na sequência: 600 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado, 0,616 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,930 g de EDTA (sal dissódico). A solução foi agitada para a homogeneização e completar o volume com água destilada (1 L).
- c) Coquetel: Colocou-se, em proveta graduada de 1 L, 600 mL de solução tampão, 300 mL de trietanolamina e 100 mL de solução de KCN a  $100 \text{ g L}^{-1}$ . Homogeneizou com bastão de vidro e guardou em frasco tampado.
- d) Solução de EDTA  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesou-se 18,6126 g de EDTA (sal dissódico) com pureza igual a 100% e transferiu para um balão aferido de 1 L. Adicionou-se água destilada e agitou-se para dissolver o EDTA, completando o volume.
- e) Solução de EDTA  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ : Pipetou-se 250 ml da solução de EDTA  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e transferiu-se para um balão aferido de 1 L. Completou-se o volume com água destilada.
- f) Solução de  $\text{CaCO}_3$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesou-se 5,0040 g de  $\text{CaCO}_3$ , p.a e colocou-se em béquer de 400 mL, onde foram umedecidos com água destilada. Adicionou-se, gota a gota,  $\text{HCl}$  p.a. concentrado, até cessar a efervescência. Aqueceu-se ligeiramente, para facilitar a dissolução. Após a solução ter sido esfriada, transferiu-se para balão volumétrico de 1 L, lavou-se o béquer, várias vezes, com jatos de água provenientes de uma pisseta. Completou-se o volume com água destilada.
- g) Indicador negro de eriocromo-T: Pesou-se 0,2 g de negro de eriocromo-T que foram dissolvidos em 50 mL de solução de álcool metílico com bórax.
- h) Solução de álcool metílico com bórax: Pesou-se 4 g de bórax e dissolveu-se em 250 mL de álcool metílico.

## 5.2.Procedimento analítico

Pipetou-se 25 mL do sobrenadante do extrato de cada tratamento e transferiu para erlenmeyers de 125 mL. Adicionou-se 4 mL do coquetel de cianeto de potássio, trietanolamina e solução-tampão. Juntou-se 30 mg de ácido ascórbico e três gotas do indicador negro de eriocromo-T. O indicador foi colocado imediatamente antes do início da titulação. A titulação com sal dissódico de EDTA  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$  foi realizada com um

titulador automático modelo Dosimat 665, marca Metrohm. A viragem se deu do róseo para o azul puro. O teor de  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$  existente nas amostras foi dado pela seguinte igualdade:

$$\text{cmol}_c \text{ de } \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} / \text{dm}^3 \text{ de solo} = \text{mL de EDTA } 0,0125 \text{ mol L}^{-1} \text{ gastos na titulação}$$

## **6. Determinação do cálcio trocável - Método complexométrico com o emprego do EDTA e ácido calcon carbônico.**

### **6.1. Preparo das soluções**

Além dos já relacionados no item 5.1:

- a) Solução de KOH a  $100 \text{ g L}^{-1}$ : Pesou-se 100 g de KOH e transferiu-se para um balão volumétrico de 1 L. Completou-se o volume com água destilada.
- b) Indicador ácido calcon carbônico + sulfato de sódio: 99,0 g de sulfato de sódio anidro p.a. foram pesados e colocados em gral de porcelana. Adicionou-se 1,0 g de ácido calcon carbônico ( $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Triturou-se bem a mistura até obter um pó fino e homogêneo. A mistura foi guardada em frasco escuro.

### **6.2. Procedimento analítico**

Pipetou-se 25 mL do sobrenadante do extrato de cada tratamento e transferiu para erlenmeyers de 125 mL. Adicionou-se 3 mL de KOH a  $100 \text{ g L}^{-1}$ , 30 mg de ácido ascórbico e 30 mg do indicador ácido calcon carbônico + sulfato de sódio. A titulação com EDTA  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$  foi realizada com um titulador automático modelo Dosimat 665, marca Metrohm. A viragem se deu do vermelho intenso para o azul intenso. puro. O teor de  $\text{Ca}^{2+}$  existente nas amostras foi dado pela seguinte igualdade:

$$\text{cmol}_c \text{ de } \text{Ca}^{2+} / \text{dm}^3 \text{ de solo} = \text{mL de EDTA } 0,0125 \text{ mol L}^{-1} \text{ gastos na titulação}$$

## 7. Determinação do magnésio trocável

O magnésio é obtido por diferença entre as duas titulações anteriores descritas nos itens 5 e 6.

O teor de  $Mg^{2+}$  existente nas amostras foi dado pela seguinte igualdade:

$cmol_c$  de  $Mg^{2+}/dm^3$  de solo = ( $cmol_c$  de  $Ca^{2+} + Mg^{2+}/dm^3$  de solo) – ( $cmol_c$  de  $Ca^{2+}/dm^3$  de solo).

## 8. Determinação do alumínio trocável - Método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio, após a extração do $Al^{3+}$ do solo por $KCl$ 1 mol L<sup>-1</sup>

### 8.1. Preparo das soluções

- Solução de  $NaOH$  1 mol L<sup>-1</sup>: Pesou-se 40 g de  $NaOH$  p.a e transferiu-se para um balão volumétrico de 1 L, onde foram dissolvidos em água destilada fervida. Completou-se o volume com água destilada e corrigiu-se o título com padrão primário (biftalato ácido de potássio).
- Solução de  $NaOH$  0,1 mol L<sup>-1</sup>: Pipetou-se 100 mL da solução de  $NaOH$  1 mol L<sup>-1</sup> e transferiu-se para balão volumétrico de 1 L. Completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se.
- Solução de  $NaOH$  0,025 mol L<sup>-1</sup>: 25 mL da solução de  $NaOH$  1 mol L<sup>-1</sup> foram pipetados e transferidos para balão volumétrico de 1 L. Completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se.
- Indicador azul de bromotimol a 1 g L<sup>-1</sup>: Pesou-se 0,1 g do indicador, colocou-se em gral e adicionou-se 1,6 mL de  $NaOH$  0,1 mol L<sup>-1</sup>. Triturou-se bem até a mistura ficar azul esverdeado. Transferiu-se para balão aferido de 100 mL, lavou-se bem o gral com auxílio de uma pisseta. Completou-se o volume com água destilada e guardou o indicador em frasco escuro.

### 8.2. Procedimento analítico

Pipetou-se, sem filtrar, 25 mL do extrato de cada tratamento e transferiu-se para erlenmeyer de 125 mL. Adicionar 3 gotas do indicador azul de bromotimol a 1 g L<sup>-1</sup>.

Titulou-se com solução de NaOH 0,025 mol L<sup>-1</sup> usando um titulador automático modelo Dosimat 665, marca Metrohm. A viragem se deu do amarelo para o verde, indicando o final da reação. O teor de Al<sup>3+</sup> existente nas amostras foi dado pela seguinte igualdade:

$$\text{cmol}_c \text{ de Al}^{3+}/\text{dm}^3 \text{ de solo} = \text{mL de NaOH } 0,025 \text{ mol L}^{-1} \text{ gastos na titulação}$$

## **9. Extração com solução de Mehlich 1: fósforo e potássio**

A solução extratora de Mehlich 1, também chamada de solução duplo-ácida ou de Carolina do Norte, é constituída por uma mistura de HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125 mol L<sup>-1</sup>. O emprego dessa solução como extratora de fósforo e potássio do solo baseia-se na solubilização desses elementos pelo efeito de pH, entre 2 e 3, sendo o papel do Cl<sup>-</sup> o de restringir o processo de readsorção dos fosfatos recém-extraídos.

### **9.1.Extração de P e K**

#### **9.1.1. Preparo da solução**

- a) Solução extratora duplo-ácida (HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125 mol L<sup>-1</sup>):  
Adicionou-se 43 mL de ácido clorídrico p.a. e 6,9 mL de ácido sulfúrico p.a. em aproximadamente 5 L de água destilada, contidos em balão aferido de 10 L. Agitou-se e completou-se o volume com água destilada

#### **9.1.2. Procedimento analítico**

Para a extração do P e K, colocou-se 10 mL de solo de cada tratamento, em erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 100 mL de solução extratora duplo-ácida (HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125 mol L<sup>-1</sup>). Agitaram-se as amostras em agitador orbital modelo DSR - 10, marca Global Trade Technology por 15 minutos a 220 rpm (não foi necessário tampar os erlenmeyers) e deixou decantar durante 12 horas.

## 10. Determinação do fósforo disponível – Método espectrofotométrico

### 10.1. Preparo das soluções

- a) Solução ácida de molibdato de amônio (concentrada): 2 g de subcarbonato de bismuto foram pesados e colocados em balão aferido de 1 L contendo aproximadamente 250 mL de água destilada. Adicionou-se, rapidamente, 150 mL de ácido sulfúrico concentrado p.a. e agitou-se até a dissolução completa do sal de bismuto e deixou esfriar. Preparar a solução de molibdato de amônio pesou-se 20 g em 200 mL de água destilada e transferiu-se esta solução para o balão um 1 L. Agitou-se e completou-se o volume com água destilada.
- b) Solução ácida de molibdato de amônio (diluída): Colocou-se 300 mL da solução concentrada em balão aferido de 1 L e completou-se o volume com água destilada.
- c) Solução padrão de fósforo (50 mg de P/L): Pesou-se 0,2195 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a., previamente seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$  que foram dissolvidos em água destilada contida em balão aferido de 1 L. Adicionou-se 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado para assegurar a perfeita dissolução do fosfato e completou-se o volume com água destilada.
- d) Soluções padrão de fósforo (1, 2, 3 e 4 mg de P/L): Pipetou-se 5, 10, 15 e 20 mL da solução de 50 mg de P/L. As soluções foram colocadas em balões aferidos de 250 mL e completou-se o volume com solução extratora. Essas quatro soluções têm, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 mg de P/L. Guardou-se em frascos tampados e identificou-se cada um deles com a concentração da solução.

### 10.2. Preparo da curva de calibração dos padrões

Colocou-se 5 mL de cada solução padrão diluída (1, 2, 3 e 4 mg de P/L) em erlenmeyers de 125 mL. Adicionou-se 10 mL de solução ácida de molibdato de amônio e 30 mg de ácido ascórbico. O mesmo procedimento foi feito para a determinação do fósforo no extrato do solo de cada tratamento. Foi realizado três repetições de cada padrão. Decorrido o tempo para o completo desenvolvimento da cor, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro modelo Genesys 10S UV – VIS, marca Thermo Scientificda

comprimento de onda de 660 nm e anotaram-se as leituras, em absorbância, correspondentes a cada padrão.

Com o espectrofotômetro bem regulado, as leituras desses quatro padrões guardou proporção constante e foram plotadas em um gráfico, fornecendo uma reta que passa pela origem. Dessa forma foi possível estabelecer, com segurança, um único fator (Fp) para as interpolações. O fator Fp é o coeficiente angular da reta obtida grafando-se os valores de concentração de fósforo dos padrões no eixo das abcissas e as respectivas leituras no eixo das ordenadas.

### **10.3. Procedimento analítico**

Pipetou-se, sem filtrar, 25 mL do sobrenadante da extração Mehlich de cada tratamento (após o repouso de 12 horas) e colocou-se em cadinhos apropriados de aproximadamente 30 mL. Exatamente, 5 mL da extração de cada tratamento foram pipetados e transferidos para erlenmeyer de 125 mL. O restante foi reservado para determinação de  $K^+$ . Adicionou-se 10 mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída em todos os tratamentos e juntou-se 30 mg de ácido ascórbico em pó. As soluções foram agitadas durante dois minutos no agitador orbital modelo DSR - 10, marca Global Trade Technology a 220 rpm. Na sequência, deixou-se desenvolver a cor durante uma hora. Após esse período, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro modelo Genesys 10S UV – VIS, marca Thermo Scientificda comprimento de onda de 660nm.

### **10.4. Cálculo do teor de fósforo no solo**

Considerando que a concentração de fósforo na amostra sofreu diluição de 1:10 na extração, para a obtenção direta da concentração de fósforo no solo o fator Fp foi multiplicado por 10. Assim, o cálculo do teor de fósforo assimilável na amostra foi obtido convertendo-se a leitura efetuada no aparelho em mg de  $P/dm^3$  de solo através da reta padrão e de acordo com a Equação 1:

$$\text{mg de } P/dm^3 \text{ no solo} = \text{leitura} \times 10 \text{ Fp} \quad (1)$$

## **11. Determinação do potássio trocável - Método direto pelo fotômetro de chama.**

### **11.1. Preparo das soluções**

- a) Solução padrão de potássio (10,0 mmol de  $K^+/L$ ): Pesou-se 0,7460 g de KCl p.a., previamente seco em estufa a 105 °C e transferiu para balão aferido de 1 L. Dissolveu e completou o volume com água.
- b) Solução padrão de potássio (1,0 mmol de  $K^+/L$ ): Pipetou-se 100 mL da solução de 10,0 mmol de  $K^+/L$ , transferiu para balão aferido de 1L e Completou o volume com água.
- c) Soluções padrão de potássio (0,1; 0,2; 0,3; e 0,4 mmol de  $K^+/L$ ): Foram pipetados 50, 100, 150 e 200 mL da solução padrão de 1,0 mmol de  $K^+/L$  e colocados em balões aferidos de 500 mL. Completou-se o volume com solução extratora e transferiu para frascos apropriados. Identificou cada um deles com a concentração correspondente: 0,1; 0,2; 0,3; e 0,4 mmol de  $K^+/L$ .

### **11.2. Preparo da curva de calibração dos padrões**

Selecionou-se o filtro próprio para potássio e aferir o fotômetro com água destilada para o ponto zero. Levaram as quatro soluções padrão diluídas (0,1; 0,2; 0,3; e 0,4 mmol de  $K^+/L$ ) ao fotômetro de chama modelo B 262, marca Micronal e efetuaram-se as leituras correspondentes. Elaborou-se um gráfico onde as concentrações dos padrões são colocadas no eixo das abcissas e as leituras no eixo das ordenadas. Uniram-se os pontos, para a obtenção da reta padrão, passando pela origem. O fator  $F_k$  é o coeficiente angular dessa reta padrão.

### **11.3. Procedimento analítico**

Utilizar a parte do extrato de cada tratamento (20 mL) que foi reservada para as determinações de  $K^+$ , quando da retirada da alíquota para determinação do fósforo. Antes de proceder à leitura da amostra, selecionou-se o filtro próprio para potássio. Aferiu o fotômetro com água destilada para o ponto zero e com a solução padrão de 0,2 mmol de

$K^+$ /L no valor correspondente ao centro da escala. Levou o extrato de cada tratamento ao fotômetro de chama modelo B 262, marca Micronal e efetuou a leitura na escala do aparelho.

#### **11.4. Cálculo do teor de potássio no solo**

Em razão da diluição de 1:10 na extração, as concentrações de  $K^+$  nos padrões em mmol/L correspondem aos teores de potássio da amostra em,  $cmol_c/dm^3$ . Assim, o cálculo do teor de potássio trocável na amostra é dado pela Equação (2):

$$mg \text{ de } K^+/dm^3 \text{ no solo} = \text{leitura} \times Fk \times 390 \quad (2)$$

#### **12. Determinação da matéria orgânica através do carbono**

O carbono da matéria orgânica da amostra é oxidado a  $CO_2$  e o cromo (Cr) da solução extratora é reduzido da valência +6 ( $Cr^{+6}$ ) à valência +3 ( $Cr^{3+}$ ). Na seqüência, faz-se a titulação do excesso de bicromato de potássio pelo sulfato ferroso amoniacal.

##### **12.1. Extração do C**

###### **12.1.1. Preparo da solução**

- a) Solução de bicromato de potássio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesou-se 39,22 g de  $K_2Cr_2O_7$  p.a., previamente seco em estufa a  $130^\circ C$ , durante uma hora. Colocou em balão aferido de 2 L e adicionou 500 mL de água destilada para dissolver o sal. Juntou uma mistura, já fria, de 100 mL de ácido sulfúrico concentrado e 500 mL de água destilada. Agitou bem para dissolver o sal e deixou esfriar, completando o volume do balão com água destilada.

### 12.1.2. Procedimento analítico

Pesou-se com balança analítica de precisão modelo ML204, marca Mettler Toledo, 20 g de solo de cada tratamento, triturou e passou em peneira de 80 mesh. Pesou-se 0,5 g do solo triturado de cada tratamento e transferiu para erlenmeyer de 250 mL. Pipetou-se 10 mL da solução de bicromato de potássio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e adicionou as amostra de solo a serem analisadas. Colocou-se um tubo de ensaio de 25 mm de diâmetro e 250 mm de altura, cheio de água e protegido com papel alumínio, na boca do erlenmeyer, que funcionou como condensador e aqueceu, em placa aquecedora modelo AA-2050, marca Gehaka, até a fervura branda, durante 5 minutos.

## 13. Determinação do carbono - Método volumétrico pelo bicromato de potássio

### 13.1. Preparo das soluções

- a) Solução de sulfato ferroso amoniacal  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesou 40 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  cristalizado (sal de Mohr) e colocou em balão aferido de 1 L. Juntou, 500 mL de água destilada contendo 10 mL de ácido sulfúrico concentrado para dissolução do sal. Agitou bem e completou o volume do balão com água destilada.
- b) Indicador difenilamina a  $10 \text{ g L}^{-1}$ : Pesou 1 g de difenilamina e dissolveu em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- c) Ácido ortofosfórico: Utilizou o produto ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) concentrado (85%), p.a.

### 13.2. Procedimento analítico

Deixou as amostras esfriarem e juntou 80 mL de água destilada, 1mL de ácido ortofosfórico e 3 gotas do indicador difenilamina a  $10 \text{ g L}^{-1}$ . As amostras foram tituladas com solução de sulfato ferroso amoniacal  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , usando um titulador automático modelo Dosimat 665, marca Metrohm. A viragem ocorreu quando a cor azul desapareceu, dando lugar ao verde. Anotou-se o número de mililitros gastos. Efetuou-se uma prova em branco com 10 mL da solução de bicromato de potássio. Anotou-se o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na prova em branco.

#### 14. Cálculo do teor de carbono orgânico no solo (CTC)

A percentagem de carbono orgânico existente na amostra é dada pela Equação 3:

$$\text{g de carbono/kg de solo} = 0,06 \times V [40 - (V_a \times f)] \times "f" \quad (3)$$

em que:

V = volume de bicromato de potássio empregado

V<sub>a</sub> = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra

f = 40/volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da prova em branco

0,06 = fator de correção, decorrente das alíquotas tomadas

"f" = fator de correção para solo

#### 15. Soma de bases (\*S)

O valor \*S, que é a soma de bases trocáveis, é calculado em cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup> de solo, de acordo com a Equação 4:

$$*S = \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ \quad (4)$$

#### 16. Capacidade de troca de cátions (\*T)

O valor \*T, ou capacidade de troca de cátions, que corresponde à soma das bases trocáveis mais a acidez potencial, é calculado em cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup> de solo, de acordo com a Equação 5:

$$*T = *S + (\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}) \quad (5)$$

#### 17. Índice de saturação por bases (\*V)

O valor \*V, ou índice de saturação por bases, é calculado em percentagem, de acordo com a Equação 6:

$$*V = \frac{100 \times *S}{*T} \quad (6)$$

### 18. Saturação por alumínio (\*Al)

O valor  $Al^{3+}$ , ou índice de saturação por alumínio trocável ou % de  $Al^{3+}$  é calculado em percentagem, de acordo com a Equação 7:

$$Al^{3+} = \frac{100 \times Al^{3+}}{*S + Al^{3+}} \quad (7)$$

#### Observação:

Os resultados numéricos do valor \*S e do valor \*T são expressos com uma casa decimal. Os resultados do valor \*V e do valor \*Al são expressos em números inteiros.

### 03 - Solubilidades em água para os componentes puros

COMPOSTOS	SOLUBILIDADE	REFERÊNCIA
n-Octano (C8)	0.66 mg/L 25 ° C	Yalkowsky, S.H., He, Yan., Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL dATABaSE. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 2003., p. 536
n-Nonano (C9)	0.220 mg/L 25 ° C	Riddick, J.A., W.B. Bunger, Sakano T.K. Techniques of Chemistry 4th ed., Volume II. Organic Solvents. New York, NY: John Wiley and Sons., 1985., p. 123
n-Decano (C10)	5.20X10 <sup>-2</sup> mg/L 25 ° C	Yalkowsky, S.H., He, Yan, Jain, P. Handbook of Aqueous Solubility Data Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL 2010, p. 745
n-Undecano (C11)	0.0044 mg/L 25 ° C	Yalkowsky, S.H., He, Yan, Jain, P. Handbook of Aqueous Solubility Data Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL 2010, p. 806
n-Dodecano (C12)	3,7 x 10 <sup>-3</sup> mg / L 25 ° C	Kertes AS; Hidrocarbonetos com água e água salgada Parte II. Hidrocarbonetos C8 a C31. Série de Dados de Solubilidade Vol 38; Shaw PC ed; Pergamon Press, UK: 553 pp (1989)
n-Pentadecano (C15)	4,0 x 10 <sup>-5</sup> mg / L 25 ° C	Yalkowsky, SH, He, Yan, Jain, P. Manual de Dados de Solubilidade Aquosa Segunda Edição. CRC Press, Boca Raton, FL 2010, p. 806
n-Hexadecano (C16)	2,1 x 10 <sup>-5</sup> mg / L 25 ° C	Coates M et al; Environ Sci Technol 19: 628-32 (1985)
n-Heptadecano (C17)	2,3 x 10 <sup>-3</sup> mg / L 25 ° C	Wakeham SG ET al; Canadian J Fish Aqua Sci 40: 304-21 (1983)
n-Octadecano (C18)	6,0 x 10 <sup>-3</sup> mg / L 25 ° C	Yalkowsky, SH, He, Yan, Jain, P. Manual de Dados de Solubilidade Aquosa Segunda Edição. CRC Press, Boca Raton, FL 2010, p. 1184
n-Nonadecano (C19)	3,7 x 10 <sup>-5</sup> mg / L 25 ° C	US EPA; Suite de interface de programa de estimativa (EPI). Ver. 4.1. Novembro de 2012. Disponível a partir de 17 de novembro de 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>

n-Eicosano (C20)	$1,9 \times 10^{-3}$ mg / L 25 ° C	Mackay D, Shiu WY; J Phys Chem Ref Data 19: 1175-99 (1981)
n-Heneicosano (C21)	$2,9 \times 10^{-8}$ mg / L 25 ° C	Coates M et al; Environ Sci Technol 19: 628-32 (1985)
n-Docosano (C22)	$7,77 \times 10^{-7}$ mg / L 25 ° C	Daubert TE, Danner RP; Propriedades físicas e termodinâmicas da compilação de dados de produtos químicos puros. Washington, DC: Taylor e Francis (1989)
n-Tricosano (C23)	$2.317 \times 10^{-7}$ mg / L 25 ° C	US EPA; Suite de interface de programa de estimativa (EPI). Ver. 4.1. Novembro de 2012. Disponível a partir de 17 de novembro de 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Tetracosano (C24)	$6,44 \times 10^{-8}$ mg / L 25 ° C	US EPA; Suite de interface de programa de estimativa (EPI). Ver. 4.1. Novembro de 2012. Disponível a partir de 17 de novembro de 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n- Pentacosano (C25)	$2.046 \times 10^{-8}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 17, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Hexacosano (C26)	$6.2 \times 10^{-9}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Heptacosano (C27)	$2.8 \times 10^{-9}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Octacosano (C28)	$5.6 \times 10^{-10}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Nonacosano (C29)	$1.6 \times 10^{-10}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n- triacontano (C30)	$5.04 \times 10^{-11}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Hentriacontano (C31)	$1.52 \times 10^{-11}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>

n-dotriacontano (C32)	$4.62 \times 10^{-12}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-tritriacontano (C33)	$1.41 \times 10^{-12}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
n-Hexatriacontano (C36)	$3.9 \times 10^{-14}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 10, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
Fitano (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	$1.7 \times 10^{-5}$ mg/L 25 ° C	US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from, as of Nov 7, 2016: <a href="http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools">http://www2.epa.gov/tsca-screening-tools</a>
Bezeno (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	$1.79 \times 10^3$ mg/L 25 ° C	May WE et al; J Chem Ref Data 28: 197-0200 (1983)
Tolueno (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> ou C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> )	526 mg/L 25 ° C	Sanemasa I et al; Bull Chem Soc Japan 55: 1054-62 (1982)
Etilbenzeno (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ou C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	169 mg/L 25 ° C	Sanemasa I et al; Bull Chem Soc Japan 55: 1054-62 (1982)
p-xileno (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ou C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> )	$1.62 \times 10^2$ mg/L 25 ° C	Sanemasa I et al; Bull Chem Soc Jpn 18: 1111-230 (1982)
m-xileno (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ou C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> )	$1.61 \times 10^2$ mg/L 25 ° C	Sanemasa I et al; Bull Chem Soc Jpn 18: 1111-230 (1982)
o-xileno (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> or C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> )	$1.78 \times 10^2$ mg/L 25 ° C	Sanemasa I et al; Bull Chem Soc Jpn 18: 1111-230 (1982)