

Ecotoxicidade aguda das Frações Solúveis em água dos combustíveis: diesel S10, S500, biodiesel e misturas comerciais, utilizando *Artemia sp.* como indicador

Acute fuel ecotoxicity: diesel S10, S500, Biodiesel and commercial blends using *Artemia sp.* as an indicator

Antonio Arañ Jambeyro Brandão

Ana Clara Silva Brandão

Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo

Taila Tamille dos Santos

Gabriel Barroso Almeida

Rafael de Lima Sales

Marlene Campos Peso-Aguiar

Recebido em 27 de dezembro, 2020 aceito em 14 de março, 2021

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol14ed2.425>



RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda das FSA dos combustíveis fósseis S500, S10, Biodiesel, e suas misturas comerciais (B10), tendo a *Artemia sp.* como organismo teste. Essa avaliação foi realizada através da exposição de náuplios fase II e III - 48 horas vida, por um período de 24 e 48h, em concentrações de 5, 10, 22, 46 e 100% de FSA e analisada a CL50 e CL90. Os resultados obtidos demonstram que os combustíveis que apresentaram maior toxicidade foram os fósseis S500 com CL50- 24h 8,5 % de FSA e CL90- 24h 29,4% de FSA, seguido do S10, que apresentaram a mesma concentração de letalidade para o CL50-24h e CL90- 24h de 12% \pm 3, seguido das misturas S10+B100 com CL 50- 24h - 15,2 % de FSA e CL90-24h 32, 6%, e do S500+B100 com CL 50- 24h 39% de FSA e CL90- 24h 64,7% FSA. O biodiesel não apresentou toxicidade significativa na exposição por 24h. Após 48h de exposição, todos os combustíveis apresentaram elevada toxicidade nos organismos avaliados. Os resultados demonstraram que em 24 horas, os combustíveis mais tóxicos são os fósseis, sendo o S500 mais tóxico que o S10, quando adicionado de biodiesel o S10+B100 torna-se mais tóxico que o S500+B. Após 48h, todos os combustíveis apresentaram toxicidade elevada.

Palavras-chave: Toxicidade. Biodiesel. Combustível fóssil. Fração Solúvel em água. *Artemia*.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the acute FSA toxicity of the fossil fuels S500, S10, Biodiesel, and commercial mixtures (B10), with *Artemia sp.* as a test organism. This evaluation was performed through the exposure of nauplii phase II and III - 48 hours life, for a period of 24-48h, in concentrations of 5, 10, 22, 46 and 100% of FSA and analyzed the LC50 and CL90. The results show that the fuels with the highest toxicity were the S500 fossils with LC50- 24h 8.5% FSA and CL90- 24h 29.4% FSA, followed by S10, which presented the same lethality concentration for the LC50 - 24h and CL90-24h of 12% \pm 3, followed by blends S10 + B100 with CL 50-24h - 15.2% FSA and CL90-24h 32.6%, and S500 + B100 with CL 50-24h 39 % FSA and CL90- 24h 64.7% FSA. Biodiesel had no significant toxicity at 24-hour exposure. After 48 hours of exposure, all fuels showed high toxicity in the evaluated organisms. The results showed that the most toxic fuels are fossil fuels in 24 hours, with S500 being more toxic than S10, when S10 + B100 is added to biodiesel, it becomes more toxic than S500 + B. After 48 hours, all fuels showed high toxicity.

Keywords: Toxicity. Biodiesel. Fossil fuel. Fraction Soluble in water. *Artemia*.



1 INTRODUÇÃO

A crise do petróleo no século passado, aliada aos estudos de demandas sobre os esgotamentos das fontes, junto às modificações climáticas ocasionadas pela queima de combustíveis fósseis e efeitos tóxicos deles no ambiente, reforçaram a necessidade de busca de fontes de energia renováveis, menos poluentes. Leite e Leal (2007), afirmam que as razões pelos interesses pelos biocombustíveis são múltiplas e variadas, mas destaca: a diminuição da dependência externa de petróleo e minimização dos efeitos das emissões de Gases de Efeito Estufa.

No Brasil, o desenvolvimento de substitutos do diesel foi tentado com muito afinco no início do Proálcool (Programa Nacional do Álcool), como forma de reduzir ainda mais o consumo de petróleo, o processo fracassou por várias razões, entre elas os baixos preços do diesel na época. O governo voltou a se interessar pelo biodiesel quando sua produção e consumo passaram a crescer na Europa, principalmente na Alemanha, onde também vislumbrou uma forma de fortalecer a agricultura familiar e assim melhorar a inclusão social, um problema muito sério no Brasil (LEITE, LEAL, 2007). Assim, o Biodiesel foi incluído na matriz energética brasileira através LEI Nº 11.097, DE 13 de Janeiro de 2005, essa lei prevê a possível substituição total ou parcial aos combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005)

Em 26 de dezembro de 2017, foi sancionada a LEI Nº 13. 576, que dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) (BRASIL, 2017), dentre os objetivos da criação da lei destaca-se: o atendimento aos compromissos do País no âmbito do Acordo de Paris sob a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima; promoção adequada da expansão da produção e do uso de biocombustíveis na matriz energética nacional com ênfase na regularidade do abastecimento de combustíveis; contribuir com previsibilidade para a participação competitiva dos diversos biocombustíveis no mercado nacional de combustíveis. Tendo como um dos instrumentos

dessa lei as adições compulsórias de biocombustíveis aos combustíveis fósseis.

Essa adição teve início em 2004, em caráter experimental e entre 2005 e 2007 foi comercializada com o percentual de 2%, e a sua comercialização foi voluntária. A obrigatoriedade se deu através da Lei nº 11.097/2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo CNPE até o atual percentual de 10% (B10).

O biodiesel é constituído de uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos derivados de fontes renováveis (gorduras animais e óleos vegetais puros ou queimados), possuindo algumas características interessantes, tais como: biodegradabilidade, ser livre de enxofre e compostos aromáticos, possuir alto número de cetanos (poder de ignição e combustão), excelente lubricidade e baixo nível de toxicidade (COSTA NETO et al., 2000; SANTOS, 2010).

A maior motivação mundial para o uso de biocombustíveis é seu potencial de reduzir a emissão de gases de efeito estufa de uma forma sustentável (LEITE, LEAL, 2007). As emissões de monóxido de carbono, enxofre e hidrocarbonetos e material particulado, são consideravelmente reduzidas em relação aos combustíveis derivados do petróleo (USEPA, 2002), mas, poucos são os estudos dos efeitos tóxicos aquáticos da Fração Solúvel em água - FSA desses biocombustíveis puros, bem como nas frações binárias que atualmente é adicionado 10% de biocombustíveis aos óleos de origem fóssil comercializadas nos postos de combustíveis de todo o Brasil.

Hoje no Brasil são comercializados, para uso rodoviário, dois tipos de óleo Diesel, o S10 e o S500, ambos com adição de 10% de biodiesel. (ANP, 2018). O S500 possui na sua composição básica os hidrocarbonetos C9 a C28, estando presente também o enxofre e o nitrogênio, para o seu desenvolvimento são realizadas misturas de diversas correntes como por exemplo o querosene, óleos, nafta pesada, diesel leve, diesel



pesado, produtos esses proveniente das diversas etapas de processamento do óleo bruto (CORTAS et al, 2015), já o S10 é classificado como gasóleo, que se trata de uma mistura complexa de petróleo, composta primariamente por hidrocarbonetos saturados ou aromáticos composta de 9 a 30 átomos de carbono. Com concentração máxima de enxofre de 10 mg/Kg, possibilitando a diminuição da emissão de materiais particulados em até 80% e 98% de óxido de nitrogênio (PETROBRÁS, 2018).

Com o aumento da demanda por esses combustíveis, tem se consequentemente um aumento na produção e transporte desses combustíveis, com isso as probabilidades de um acidente envolvendo o derramamento desses e em meio aquático ou o seu alcance aos lençóis freáticos aumentam consideravelmente. Em caso de derramamento de petróleo cru e/ou seus derivados, como medida mitigadora dos impactos, a camada superficial de óleo é retirada tanto por métodos de remoção mecânica quanto de absorção, mas ocorre uma dissolução de alguns componentes, sendo essa dissolução muito importante para o acometimento de efeitos ambientais e ecológicos naquela biota, essa fração dissolvida, denominada de Fração Solúvel em água (FSA) é ingerida por organismos da base da cadeia alimentar, assim sendo concentrada e acumulada em organismos de níveis tróficos mais elevados.

Em 1984, a USEPA implementou o uso de organismos para fins de monitoramento da qualidade do meio aquático podendo ser chamado de "Monitoramento Biológico" ou "Biomonitoramento". Na Europa a Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) elaborou uma série de protocolos de testes com organismos aquáticos como algas, microcrustáceos e peixes no mesmo ano (USEPA 1984).

Desde então os protocolos para testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controlados, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios,

organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (COSTA, 2008).

A elaboração do teste é concedida através do planejamento do tempo de exposição, o organismo a ser testado e o critério de avaliação selecionado, podendo ser utilizados testes para a avaliação da toxicidade aguda e teste de toxicidade crônica (RAND & PETROCELLI, 1985).

Avaliações de toxicidade aguda são análises experimentais feitas com organismos-teste que após administração de uma dosagem pré-estabelecida apontará se em determinado tempo indicam alterações na sua composição inicial. Nos testes de toxicidade crônica, os organismos-teste são analisados durante uma extensa parte do seu período de vida, quando ocorre a exposição ao agente-teste; os efeitos crônicos persistem por um longo período de tempo, e podem ser evidentes imediatamente após a exposição ou não (DUFFUS, 1993).

Normalmente, na toxicidade aguda, o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a anteceda, como o estado de imobilidade em invertebrados. Estes testes têm por objetivo determinar a Concentração Letal Média (CL50) ou a Concentração Efetiva Média (CE50), isto é, a concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição (RAND & PETROCELLI, 1985).

A *Artemia sp.* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas. Sendo um dos principais alimentos para peixes, seus ovos são encontrados em lojas de aquaristas (CARVALHO et al., 2009). Essa espécie de microcrustáceo marinho tem sido utilizada em experimentos laboratoriais como um Bioindicador, na exposição dos náuplios na fase II ou III durante 24 e/ou 48 horas, sob concentrações crescentes da amostra que se pretende testar por que o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo que apresenta uma resposta nítida frente a



pequenas variações na qualidade do ambiente (ABEL, 1989).

A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de respostas biológicas, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982).

Este trabalho teve como objetivo analisar a toxicidade aguda das Frações Solúveis do biodiesel, dos combustíveis fósseis, Diesel S10 e S500 e suas misturas comerciais, B10, a fim de determinar a Concentração Letal Média (CL50 e CL90) ou a Concentração Efetiva Média (CE50 e CE90), tendo como indicador o microcrustáceo *Artemia sp.*

2 METODOLOGIA

As formulações de combustível, B100, S10, S500, foram coletadas na distribuidora de combustíveis, localizada no distrito de Mataripe, Município de São Francisco do Conde, Bahia, em frascos de vidro âmbar, devidamente lacrados, encaminhados para o Laboratório de Malacologia da UFBA (LAMEB). Para a obtenção da fração solúvel em água as amostras foram tratadas de acordo com as normas de padronização internacional, obedecendo a proporção de diluição de 1/9 sendo, 100 ml do combustível e 900 ml de água do mar, sendo submetidos submetida à agitação, em agitador magnético, sob velocidade de aproximadamente 120 RPM (rotações por minuto) durante 20 horas, em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sendo descartado o sobrenadante. As soluções-testes foram preparadas em triplicata, procedendo-se às diluições de forma a se obter as concentrações de 5, 10, 22, 46 e 100% da FSA, concentrações estas que foram utilizadas nos testes realizados nesse trabalho (PAIXÃO, 2005).

Para avaliação da toxicidade aguda foram expostas as diferentes concentrações os indivíduos jovens (náuplios fase II e III - 48 horas vida), por um período de 24-48h. Para obtenção desses indivíduos foi realizada a eclosão, os cistos foram Hidratados na proporção de 0,5 g/L de água do mar em béquer de um litro, mantidos na

temperatura constante de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, com aeração suave, de forma a manter os cistos em suspensão, na ausência de luz, coberto por material opaco, após 24 horas os náuplios foram coletados transferidos para outro béquer, contendo o mesmo volume de água do mar por um período de 24 horas.

Para realização dos ensaios de toxicidade, foram realizadas triplicatas de cada concentração, cada frasco teste, contendo as FSA dos combustíveis, perfazendo um volume total de 100 ml, e foram adicionados dez organismos e colocados em incubação por 48h, sendo analisado e quantificados a morte ou imobilidade passada 24 e 48 horas, quando o teste foi finalizado. As análises de concentração de Letalidade CL50 e CL90 foram realizadas no programa GraphPad Prism.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação as frações solúveis dos combustíveis onde foi submetido a *Artemia sp.*, foram determinadas as CL50 e CL90 após 24 e 48 horas respectivamente. Ao analisar a CL50, - 24h, Tabela 1 e Figura 1, os combustíveis que apresentaram maior toxicidade por concentração foi o S500 com 8,2 %, seguido do S10 com 12%. Quando adicionado a fração de 10% de biodiesel a formulação o S10 passa a apresentar maior toxicidade com 15,2% e o S500 passa a ter uma concentração de 39% do combustível para que ele apresente letalidade suficiente para matar 50% dos indivíduos. Quando se analisa a CL90 - 24h, Tabela 1 e Figura 1, o combustível fóssil que apresenta maior toxicidade foi o S10, com 12,7%, que apresentou concentração equivalente à da CL50-24h, seguido do S500 com 29,4%. Quando adicionado à fração de 10% de biodiesel a formulação mantêm-se o mesmo padrão de toxicidade da CL50-24h, o S10 é o mais tóxico, sua concentração mínima passa a ser 32,6% e o S500 passa para 64,7%.

Tabela 1- Concentração em % das FSA dos combustíveis fósseis S500 e S10, Biodiesel e misturas



comerciais e relação com de Letalidade CL50 e CL90 das Frações Solúveis (FSA), em água após 24 horas de exposição pelo teste de toxicidade com micro crustáceo *Artemia sp.*

FSA	CL ₅₀	CL ₉₀
S500	8,2 ± 0,4	29,4 ± 2,5
S500 +B100 (10%)	39 ± 10,6	64,7 ± 9,4
S10	12 ± 3,4	12,7 ± 3
S10 + B100(10%)	15,2 ± 5,6	32,6 ± 15
B100	>100	>100

O biodiesel tanto na CL50 e CL90 no período de 24h não apresentou toxicidade significava na exposição por 24h na população de *Artemia*. Após 48h de exposição, todos os combustíveis apresentaram elevada toxicidade nos organismos avaliados, com exceção apenas do B100.

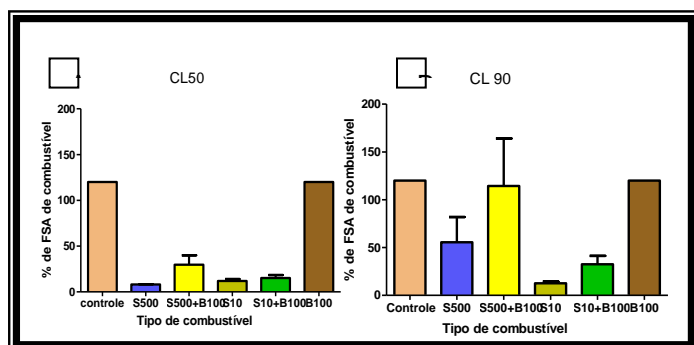


Figura 1 – Concentração da porcentagem de Fração solúvel e relação com Letalidade CL50 e CL90, no teste de toxicologia aguda com *Artemias sp.*, após exposição de 24h.

É notório que a nossa dependência e o consumo da energia de combustível fóssil aumenta ano após ano, trazendo um alerta e

chamando a atenção dos impactos do consumo desse nos impactos na natureza e na saúde do ser humano. Existe hoje no meio acadêmico artigos que descrevem a toxicidade elevada na utilização do petróleo e seus derivados podendo impulsionar problemas mutagênicos e carcinogênicos (ZINNER, 2014). Apesar de que o maior uso do derivado de petróleo seja o diesel, nele existe uma forte suspeita de que vários dos seus compostos sejam carcinogênicos, mas a carência de estudos que comprovação e a sua baixa mobilidade não o levaram ainda para a lista dos mais perigosos (FINOTTI, 2001).

O teor de Enxofre (S) é hoje um dos principais problemas do diesel e por este motivo, órgãos reguladores ambientais vêm exigindo em diversos países a diminuição da concentração de enxofre no diesel. Logo a redução dos teores de enxofre traz a reduz do teor de aromáticos (ZIMMER 2014). No estudo presente apesar da redução de teor de enxofre envolvida entre o S10 e o S500, a toxicidade aguda da FSA desses combustíveis, foi semelhante à toxicidade da FSA sua composição pura.

Cavalcante (2012), na sua pesquisa avaliou a fração solúvel do biodiesel com o objetivo de identificar possíveis efeitos biológicos de um biodiesel produzido a partir de girassol por duas diferentes rotas (Etilica e metílica) utilizando como sistema teste o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* testes esse de toxicidade aguda (6, 24 e 48h) com juvenis de *P. lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel, após realizar o teste foram encontrados que a mortalidade média dos animais foi de 5%.

Estudos feitos por (KHAN, 2007) destacou que a mistura binária do diesel com o biodiesel com sequência de menor toxicidade é a de 5, 50 e 20%, com análise a essas frações evidenciaram que quanto maior a concentração de diesel na produção das misturas comercializadas, maior é a toxicidade do combustível.

Nesse trabalho, quando comparado apenas o biodiesel, verificou-se que a FSA desse combustível, apresentou menores níveis de toxicidade quando comparado as FSA dos combustíveis fósseis, esse resultados se



assemelharam ao trabalho de (Muller, 2011) que analisou Fração Solúvel em Água do Biodiesel, Diesel e mistura binária de 5%, nesse estudo foi demonstrado os resultados utilizando o micro crustáceo aquático *Daphnia magna* e a bactéria marinha *Vibrio fischeri* como organismos-testes, destacando o biodiesel como combustível de nível tóxico agudo com porcentagem inferior as outras diluições testadas e excluindo a presença de toxicidade crônica. Além de ambos demonstrarem que as FSA do diesel e da Fração binária (combustível fóssil e biodiesel) apresentaram efeitos toxicológicos muito semelhantes, sendo ambos tóxicos em todos os testes realizados nesse trabalho.

trabalho (S500, S10 e B10) apontam toxicidades parecidas a desastres feito pelo óleo petróleo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEL, P.D. **Water Pollution Biology**. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.
2. ABHILASH, P. C.; SINGH, N. **Pesticide use and application**: na Indian scenario. *Journal of Hazardous Materials Amsterdam*, v. 165, n.15 p, 2009)
3. ANP, Biodiesel, Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acessado em: 20 out. 2018
4. BRASIL. **Lei Nº 11.097, DE 13 DE JANEIRO DE 2005**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: out. de 2018.
5. BRASIL. **LEI Nº 13.576, DE 26 DE DEZEMBRO DE 2017**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/L13576.htm>. Acesso em: out. de 2018.
6. CARVALHO, C. A. de. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers- Bignoniaceae): **Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemis salina***. *Revista Eletrônica de Farmácia Vol 6(1)*, 51-58, 2009.
7. CAVALCANTE, Dalita Gomes Silva Moraes. **Biomarcadores genéticos e bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel, por meio de bioensaios in vivo e in vitro**. 2012.
8. CETESB – **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Norma Técnica L5.021. Água do mar – Teste de toxicidade aguda com

4 CONCLUSÃO

Os testes de toxicidade aguda da FSA do Biodiesel, Diesel S500, S10 e suas misturas binárias comercializadas no Brasil (B10) foram realizados através de testes de 24 horas e 48 horas com *Artemia sp.* Os resultados obtidos no presente trabalho com a espécie *Artemia sp.* permitem concluir que:

- O Combustível fóssil S500 puro, apresentou toxicidade em todos os testes, tendo um perfil muito tóxico. A adição de biodiesel, reduziu a toxicidade aguda nos testes com *Artemia sp.*

- O combustível fóssil S10 puro, apesar de possuir na sua composição menor concentração de enxofre, apresentou elevada toxicidade, padrão semelhante ao combustível S500 puro. Quando adicionado biodiesel a sua formulação, apresentou redução de sua toxicidade.

- Dos combustíveis analisados, a FSA de Biodiesel foi o único que não apresentou toxicidade aguda.

Aconselha-se total cautela na manipulação e transporte com os combustíveis fósseis ou biocombustíveis para impedir poluição da natureza evitando consequências de efeitos tóxicos, pós os combustíveis estudados nesse



- Artemia: método de ensaio. São Paulo, 1991.
9. CORTAS, Laila C.; TEIXEIRA, Roberta M.; VISCARDI, Sergio LC. AVALIAÇÃO DA TENDÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE ÁGUA DO DIESEL S10 E DIESEL S500 E SUAS MISTURAS COM BIODIESEL ATRAVÉS DO MÉTODO DA DEMULSIBILIDADE. **Blucher Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 28-38, 2015.
 10. COSTA, Carla Regina et al. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
 11. DUFFUS, J. **Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993)**. *Pure and applied chemistry*, v. 65, n. 9, p. 2003-2122, 1993.
 12. FINOTTI, Alexandra R.; CAICEDO, Nelson O. Luna; RODRIGUEZ, Maria Teresa Raya. **Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira**. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 6, n. 2, p. 29-46, 2001.
 13. KHAN, N.; WARITH, M.; LUK, G. **A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms**. *Journal of the Air and Waste Management Association*, London, v. 57, n. 3, p. 286-296, 2007.
 14. LEE, Jason S.; RAY, Richard I.; LITTLE, Brenda J. **An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions**. *Biofouling*, v. 26, n. 6, p. 623-635, 2010.
 15. LEITE, Rogério Cezar de Cerqueira; LEAL, Manoel Régis LV. **O biocombustível no Brasil**. **Novos estudos-CEBRAP**, n. 78, p. 15-21, 2007.
 16. MEYER, B.N. et al. **A convenient general bioassay for active plant constituents**. *Planta Medica*, v.45, p.31-34, 1982.
 17. MULLER, Juliana Braun et al. **Avaliação da toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5%(B5)**. dissertação mestrado- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 2011
 18. NETO, Pedro R. Costa et al. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras**. **Química nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.
 19. PAIXÃO, Joana Fídelia **Avaliação Ecotoxicológica de gasolinas e componentes: subsídios à seleção de formulações mais ecocompatíveis**. 2005. Dissertação de Mestrado.
 20. PEREIRA, C.A.; MARQUES, M.R.C. (2009) **Avaliação da potencialidade de processos pseudo-fenton para remediação de solos contaminados por diesel**. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2200-2202.
 21. PETROBRÁS. **Ficha de Informação de segurança de Produto Químico – FISPQ**. Disponível em: <http://www.br-petrobras.com.br/wcm/connect/f7fcb00a-b9a5-4984-ab82-1e3af48e5bae/fispq-comb-oleodiesel-auto-oleodiesel-s10.pdf?MOD=AJPERES&CVID=mbeHnRv&CVID=mbeHnRv&CVID=mbeHnRv>. Acesso em: out. 2018
 22. OLIVEIRA, D. G. S. de. **Toxicidade em peixes submetidos à fração**



- solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado. 2013.** 78 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
23. PRATES C.P.; PIEROBON E.C.; COSTA R.C. (2007) **Formação do mercado de biodiesel no Brasil.** BNDES Setorial, n. 25, p. 39-64.
 24. RAND, G.M.& PETROCELLU, S.R (1985) **Fundamentals of Aquatic Toxicology.** Mc Graw Hill International Book Company, pp. 666.
 25. SANTOS, Fernando A. Biocombustíveis: prós e contras. **UTAD Publicações**, 2010. SANTOS, 2013).
 26. USEPA – Environmental Protection Agency. 1984. **Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control.** EPA-Washington D.C., 135p. https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/27395/2/daniele_magalhaes_aloyioferrao_IOC_2008.pdf
 27. USEPA - United States Environmental Protection Agency. A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions. Air and Radiation – EPA 420-P-02-001, 2002.
 28. ZIMMER, Adriane Ramos. **Monitoramento e controle da contaminação microbiana durante o armazenamento simulado de misturas diesel/biodiesel com uso de biocida.** Tese de doutorado, 2014.