



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - DECO

MEGGIE KAROLINE SILVA NASCIMENTO

**Análise preliminar da toxicidade aguda do tolueno
em misidáceo *Mysidopsis juniae*
(MYSIDACEA:CRUSTACEA)**

São Cristóvão

2014/2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - DECO**

MEGGIE KAROLINE SILVA NASCIMENTO

**Análise preliminar da toxicidade aguda do tolueno
em misidáceo *Mysidopsis juniae*
(MYSIDACEA:CRUSTACEA)**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jeamylle Nilin

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de
Ecologia da Universidade Federal de
Sergipe como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Ecologia.

São Cristóvão

2014/2

Nome: Meggie Karoline Silva Nascimento

Título: **Análise preliminar da toxicidade aguda do tolueno em misidáceo *Mysidopsis juniae* (MYSIDACEA:CRUSTACEA)**

Trabalho de Conclusão do Curso de Ecologia apresentado a Universidade federal de Sergipe-UFS, como requisito exigido para obtenção do título Bacharel em Ecologia

Área de concentração: Ecologia

Data da defesa:

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior _____

Universidade Federal de Sergipe

Prof^a. Dr^a. Andrea Novelli _____

Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr^a. Jeamyllé Nilin _____

Universidade Federal de Sergipe

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu amado Deus, que sempre foi meu alicerce, me mantendo firme e guiando meus passos nesses anos.

Aos meus pais, que estiveram sempre ao meu lado me ajudando a passar por essa etapa de minha vida. A vocês dedico essa conquista!

Aos meus irmãos, Carla e Lucas, pelo apoio constante. À minha princesa, Mariana que, mesmo sem entender, fez meus dias mais alegres. Agradeço também a todos meus familiares pelo carinho.

Ao meu querido Antonio Carlos, pela ajuda, carinho, companheirismo e paciência ao longo desses anos.

A todos meus colegas de turma que foram sobreviventes desta seleção natural, persistindo até o fim. Agradeço, também, por ter encontrado em meu caminho anjos que fizeram essa estrada parecer mais leve e que estarão comigo em novas jornadas: Arivania Santos e Philippe Correia.

À Jeamylle Nilin, minha orientadora, pelo acolhimento, apoio e confiança que me ajudaram na execução deste trabalho.

Agradeço a minha banca, a prof^a. Dr^a. Andrea Novelli e ao prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior pela disponibilidade e pelas sugestões de melhoria desse estudo.

A todos os mestres, pelo conhecimento adquirido nesses 4 anos. Em especial, Dr^a. Marcus Cruz, Dr^a. Yana Reis, Dr^a. Ana Paula Marques e Msc. Tacyana Amora que, ao abrirem as portas, ajudaram-me em meu crescimento acadêmico.

Ao pessoal do LESE, Bruno, Priscyla, Anderson, Camila e Josi pela cooperação, ajuda e apoio ao longo desse tempo. Além de todos queridos da Entomologia e da Embrapa que tanto me auxiliaram e contribuíram para meu desenvolvimento profissional.

E claro que não poderiam faltar os meus amores! A família que pude escolher, que sempre me apoia e torce pela minha felicidade: Thaís, Thamara, Cris, Sandrinha, Jadson, Luciana, Camile, Pamela, Ana Paula, Larissa e Carol.

E àqueles que não citei, mas que me ajudaram direta ou indiretamente, meu muito OBRIGADA.

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé. 2 Timóteo 4:7”

RESUMO

Os hidrocarbonetos monoaromáticos conhecidos como BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e os Xilenos) podem ser encontrados no ar a partir da combustão de derivados de petróleo e da volatilização durante a comercialização da gasolina, podendo atingir o meio aquático por deposição atmosférica, ou ainda, pela solubilização em meio aquoso (lençol freático, rios e oceanos) por meio do lançamento de água produzida, dos acidentes e vazamentos de petróleo. Apesar da rápida volatilização diversos estudos tem mostrado que podem causar efeitos adversos nos organismos aquáticos. O misidáceo *Mysidopsis juniae* é um microcrustáceo que representa o grupo do zooplâncton de grande importância na cadeia alimentar marinha, e no Brasil, vem sendo utilizado no monitoramento ambiental das atividades petrolíferas. Contudo, os efeitos das substâncias presentes no petróleo e seus derivados para essa espécie ainda são poucos estudados. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a sobrevivência dos misidáceos expostos ao tolueno. Juvenis de *M. juniae* (1 a 8 dias de vida) foram expostos à diversas concentrações de tolueno diluído em água do mar artificial, durante 96 h, sem renovação do meio ou aeração. Foram realizados quatros experimentos em faixas de concentração variadas (1º experimento de 0,1 a 0,8 mg L⁻¹, 2º experimento de 1,07 a 4,29 mg L⁻¹, 3º experimento de 6,45 a 10,72 mg L⁻¹, e 4º experimento de 50 a 200 mg L⁻¹). Nos três primeiros ensaios não houve mortalidade significativa, sendo então necessário o aumento das concentrações, que por sua vez causou a mortalidade de 100% dos organismos. Dessa forma, ainda não foi possível determinar a concentração letal a 50% dos organismos (CL₅₀), e novos ensaios devem ser realizados na faixa de concentração de 10 a 50 mg L⁻¹. Ensaios realizados com outras espécies de microcrustáceos (*Metamysidopsis elongata atlântica*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*) mostraram que concentrações menores (µg L⁻¹) de tolueno causaram efeitos adversos, sugerindo que o *Mysidopsis juniae*, é o menos sensível ao tolueno que tais espécies.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, BTEX, Poluição Marinha, Petróleo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 REAGENTES	11
2.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO ORGANISMO TESTE.....	11
2.3 TESTES DE TOXICIDADE	13
2.4 ANÁLISES DOS DADOS	13
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

A formatação do corpo do trabalho seguiu as normas da revista *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* (ANEXO A)

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a crescente demanda energética tem requerido um aumento na produção, transporte e consumo de petróleo. Os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos (BTEX) constituem um importante parcela da produção de petróleo nas refinarias, compondo derivados de importância econômica e social como encontrados na gasolina (Cunha & Leite, 2000).

Estes hidrocarbonetos são caracterizados por possuírem um anel aromático que estabelece entre si ligações ressonantes. São substâncias altamente voláteis e apresentam baixa polaridade, sendo pouco solúveis em água (Baird, 1995).

Podem ser encontrados no meio ambiente através dos gases de veículos motorizados que utilizam combustíveis derivados do petróleo, em perdas durante a comercialização da gasolina e nos derrames e vazamentos de petróleo. Esses compostos estão entre os produtos químicos mais produzidos no mundo, chegando em média de 8 a 10 milhões de toneladas de benzeno e 5 a 10 milhões de toneladas de tolueno produzido por ano (ATSDR, 2000; NTP, 2005).

O tolueno, de fórmula C_7H_8 , é um líquido incolor, inflamável e com odor doce. Possui uma ampla escala de utilização que vai desde a fabricação de derivados químicos e solventes a constituinte de matéria-prima para a produção de pesticidas, produtos farmacêuticos, polímeros e tintas (International Programme on Chemical Safety IPCS/INCHEM, 1986). Apresenta grau de toxicidade moderada a humanos, e a inalação de grandes doses desse composto pode resultar em alterações no sistema nervoso, fraqueza muscular e arritmias cardíacas (Hamilton & Hardy, 2004).

Os BTEX podem ser encontrados na atmosfera, por meio do processo de evaporação durante a venda de gasolina nos postos, no uso de solventes e na evaporação da gasolina dos carros (Silva, et al., 2002). As concentrações do tolueno, em especial, na atmosfera podem variar de 1,3 a 6,6 ppb em áreas urbanas e suburbanas, já em áreas muito industrializadas pode chegar a 350 ppb (IPCS 1985, ATSDR 2000).

No ambiente aquático dulcícola essas substâncias podem ser encontradas a partir do lançamento de efluentes industriais (Heleno et al., 2010; Sousa, 2011), pelo vazamento em tanques de armazenamento subterrâneo de postos gasolina, como foi observado em amostras de água de poços no Bairro Brisa Mar, Itaguaí, Rio de

Janeiro em que os valores do benzeno e tolueno nos poços mais próximos aos postos apresentaram valores de $398 \mu\text{g L}^{-1}$ e $524 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, muito acima do valor máximo permitido pela resolução CONAMA 357/05 (Silva, 2002).

Além disso, é possível detectar a presença dos BTEX no ambiente marinho através de deposição atmosférica (Andrade, et al, 2010). Mas uma das fontes principais destes compostos no mar é por acidentes durante os processos de extração, produção e transporte de petróleo que acabam por lançar essas substâncias direto no mar. Alguns casos foram bastante preocupantes, como o vazamento do oleoduto OSBAT da Petrobras/Transpetro em 2004, na região de São Paulo e o acidente com derrame de óleo combustível no navio Prestige, em 2002, contaminando o norte da Espanha e França (Cetesb, 2007).

Um estudo feito no Mar do Norte revelou que cerca de 15 a 30% do óleo derramado neste local (aproximadamente 19.000 toneladas) foi consequência de operações *offshore* e, desse total, 7% foi causado por derramamentos acidentais, 21% devido ao despejo oriundo das águas de produção ou água produzida e, 72% por resíduos de fluidos de perfuração (Nihoul & Ducroty 1994).

Em 2014, cerca de 4.000 toneladas de óleo derramado foi parar no meio aquático, por meio de navios carregados de petróleo. O mais grave ocorreu em janeiro no Mar do Sul da China, um grande derramamento despejou aproximadamente 700 toneladas no mar (ITOPF, 2014).

Segundo a International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF, 2014), os acidentes que mais causam danos ao ambiente são aqueles que acontecem próximos à zona costeira. Ainda segundo a ITOPF, os vinte maiores acidentes, em especial com navios petroleiros, ocorreram em áreas de mar profundo, causando pouco dano ambiental.

Outra fonte de lançamento de BTEX no ambiente marinho é por meio da água utilizada no processo de prospecção e injeção do petróleo, conhecida como água produzida, que após sua utilização, é devolvida ao mar muitas vezes com resíduos de petróleo. Atividades como lavagens dos reservatórios de navios, despejos dos efluentes oriundos de refinarias e esgotos municipais também são causas de contaminação marítima (Oliveira & Oliveira, 2000).

Conforme a resolução nº357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (Brasil, 2005), que classifica a água de acordo com os usos e estabelece limites para o lançamento de substâncias nos corpos d'água, apresenta para águas salinas o valor máximo de 215 $\mu\text{g L}^{-1}$ tolueno (classe 1 e 2 para águas salinas). Em estudo realizado por Almeida (2006), foram encontrados valores de tolueno na Enseada de Fortaleza que variaram de 0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ até 1,67 $\mu\text{g L}^{-1}$, abaixo do limite máximo estipulado pelo CONAMA. Ele ainda observou a relação das concentrações encontradas nas diferentes estações e a relação concentração e profundidade da Enseada, e percebeu que o tolueno apresentou as maiores concentrações no verão e próximo a sub-superfície na maioria das amostragens.

Existe uma preocupação em torno desses compostos por serem conhecidos como nocivos ao meio ambiente (Silva et al., 2009). Devido a sua característica hidrofóbica, os BTEX tendem a acumular-se na porção lipídica dos organismos, facilitando assim seu transporte através das membranas biológicas, favorecendo sua entrada no organismo desses indivíduos (Neff, 2002; Buratini & Brandelli, 2008).

Com a intenção de estudar mais profundamente a toxicidade e os efeitos de substâncias potencialmente nocivas ao ambiente e aos organismos, foi criada a Ecotoxicologia. Atualmente, os órgãos governamentais nacionais e internacionais têm estabelecido o uso de testes ecotoxicológicos para determinar valores admissíveis para o BTEX e outras substâncias (Brasil, 2005).

Para o ambiente marinho e estuarino, os ensaios ecotoxicológicos normalizados pela Associação Brasileira de Normas Técnica (ABNT) sugerem a utilização dos seguintes organismos: os misidáceos *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile*, a bactéria marinha *Vibrio fisheri* e os ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*. No entanto, a espécie mais utilizada no Brasil para ensaios de toxicidade aguda com hidrocarbonetos do petróleo é o *M. juniae*, recomendada pela NBR 15308 (ABNT, 2011). Este organismo apresenta grande importância na cadeia alimentar, pois fazem parte do zooplâncton, atuando com papel importante no fluxo de energia. São animais onívoros que se alimentam de partículas, além de outros organismos zooplanctônicos (Barnes, 1996), e são organismo teste comumente utilizados em ensaios ecotoxicológicos, a exemplo de: monitoramento de atividades petrolíferas, avaliação da toxicidade de efluente de carcinicultura (Aragão, 2006)

industrial e da pesca (Nicodemo, 2010) e na análise de toxicidade de metais como zinco e níquel (Figueiredo, 2013).

Contudo, ainda são escassos estudos envolvendo os efeitos de substâncias presentes no petróleo, de forma isolada no *M. juniae*. Já para o misidáceo *Metamysidopsis elongata atlantica* avaliando a toxicidade do benzeno e tolueno, apresentou como resposta a $CL_{50,48\text{ h}}$ encontrada para o tolueno de $235 \pm 5,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (Vieira, 2004).

Tendo em vista os riscos de poluição que os ambientes aquáticos podem estar sofrendo devido a exposição ao BTEX, assim como conhecer os efeitos causados pela ação dessa substância, este estudo foi desenvolvido com o objetivo avaliar a toxicidade aguda do tolueno no misidáceo *Mysidopsis juniae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

O tolueno adquirido e utilizado no presente estudo foi da marca Neon. As soluções foram feitas em água do mar artificial (salinidade 35 ± 2) preparada pela adição de sal marinho (*Blue Treasure*) em água destilada. Foram realizados quatro experimentos com as seguintes concentrações: 0,1; 0,2, 0,4 e 0,8 mg L^{-1} (1º experimento); 1,07, 2,14 e 4,29 mg L^{-1} (2º experimento); 6,45, 8,58 e 10,72 mg L^{-1} , (3º experimento); e por fim um experimento com 50, 100 e 200 mg L^{-1} . Todas as exposições foram realizadas em triplicata e em paralelo com controle negativo (água do mar artificial).

2.2 Cultivo e manutenção do Organismo teste

Os misidáceos utilizados nos testes foram oriundos do cultivo do Laboratório de Estudos Ecotoxicológicos (LESE) da Universidade Federal de Sergipe, e os procedimentos de cultivo e manutenção seguiram a NBR 15308/2011 (ABNT, 2011).

Os misidáceos (Figura 1) foram mantidos em aquários de vidro com volume variável de acordo com a quantidade de indivíduos (100 mL por misidáceo), com renovação parcial semanal da água, juntamente com a remoção dos juvenis (1 a 8

dias) para serem utilizados nos testes, e renovação total uma vez por mês juntamente com pareamento dos organismos (3 ♀ : 1 ♂). Diariamente os animais foram alimentados *ad libitum* com náuplios de *Artemia* sp. (48h) enriquecidos com óleo de fígado de bacalhau e o óleo de peixe. O cultivo foi mantido em sala climatizada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com fotoperíodo de 12 h luz : 12 h escuro e aeração constante (Figura 2).



Figura 1. Exemplo de um macho de *Mysidopsis juniae*. Fonte: Acervo do autor



Figura 2: Aquário do cultivo dos misidáceos *Mysidopsis juniae*. Fonte: Acervo do autor

2.3 Testes de toxicidade

Ensaios de toxicidade com *Mysidopsis juniae* seguiram a norma NBR 15.308 (ABNT, 2011) sobre testes de toxicidade aguda de 96 h. Organismos de 1 a 8 dias de vida foram expostos às concentrações de tolueno, em béqueres de vidro com volume final de 250 mL, com triplicata, sendo adicionados a cada béquer 10 indivíduos (Figura 3).



Figura 3: Exposição ao tolueno para avaliação da toxicidade aguda em *Mysidopsis juniae*

Os ensaios foram realizados do tipo estático, sem aeração ou renovação da solução, mantidos em temperatura constante de 24 ± 2 °C, e alimentados diariamente *ad libitum* com náuplios de *Artemia* sp. (48 h) sem adição de óleos. A cada 24 h, foram realizadas contagens dos indivíduos vivos e mortos com a retirada dos indivíduos mortos. Os dados de pH, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.) e temperatura foram analisados. (Marca e modelo do equipamento utilizado)

2.4 Análises dos dados

Após 96 h de exposição os testes foram encerrados com a contagem final seguido do cálculo da concentração letal a 50% dos organismos testados (CL_{50}) pelo programa “*Trimmed Spearman-Kärber*” (Hamilton et al., 1977), com o intervalo de confiança de 95%.

Foi avaliada também a porcentagem de sobrevivência dos organismos ao final de cada teste. Para a validação dos testes, foi adotado como critério de aceitabilidade somente os ensaios em que a mortalidade dos organismos no controle foi menor ou igual a 20%.

3. RESULTADOS

Ao avaliar a toxicidade do tolueno através do teste de toxicidade aguda com o misidáceo *Mysidopsis juniae* foram observados que os parâmetros físico-químicos obtidos nos ensaios apresentaram valores de temperatura entre 23,8 e 25,5 °C; pH entre 7 e 8, a salinidade manteve-se em 35 e oxigênio dissolvido apresentou variações entre 6,11 e 7,35 mg L⁻¹.

No primeiro ensaio realizado, não foi possível determinar a CL₅₀ nas concentrações testadas, pois a porcentagem de sobrevivência dos organismos foi acima de 80% (Figura 4a). Apesar do aumento das concentrações do tolueno no segundo e no terceiro experimentos, não houve mortalidade significativa (Figura 4b). No terceiro ensaio realizado, os organismos apresentaram baixa sobrevivência no controle, ficando abaixo do limite permitido para a validação do teste (menor que 80%).

No quarto experimento, com concentrações mais elevadas (50 a 200 mg L⁻¹) foi observado após uma hora de exposição alta mortalidade em quase todas as concentrações, sendo que a 50 mg L⁻¹ os organismos permaneceram vivos com os movimentos lentos por aproximadamente uma hora e meia.

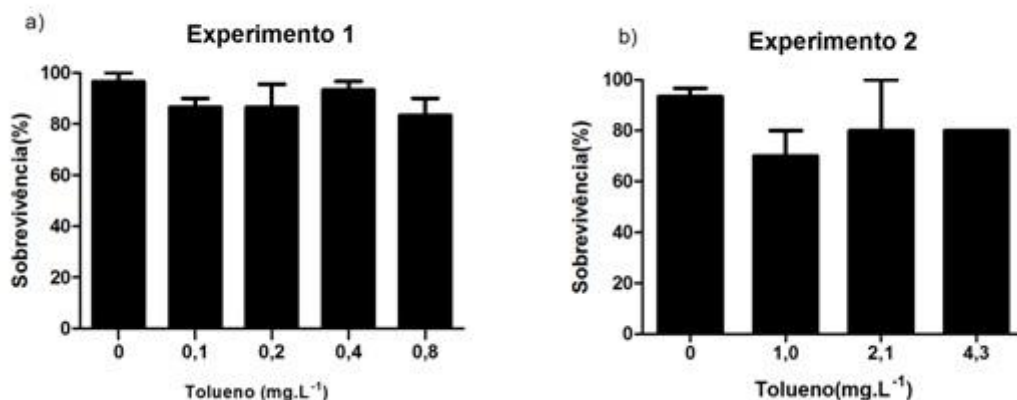


Figura 4: Porcentagem de sobrevivência dos *Misidopsis juniae* sob efeito de diferentes concentrações de tolueno (mg L^{-1}).

Dessa forma, com os resultados obtidos nesse trabalho não foi possível estabelecer a CL_{50} para o tolueno, porém é bastante provável que esse valor esteja entre 10 e 50 mg L^{-1} .

4. DISCUSSÃO

Apesar das características químicas dos BTEX indicarem baixa solubilidade e alta volatilidade, diversos estudos vem demonstrando os efeitos danosos aos organismos aquáticos em diferentes níveis de organização biológica.

Em ambiente marinho, Gusmão (2009) avaliou a sobrevivência (96 h), o crescimento e os efeitos histopatológicos (21d) em larvas do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* em diversas concentrações da fração solúvel do petróleo em água, e observou redução da sobrevivência na exposição aguda ($CL_{50} 55 \pm 5,5\%$). Além disso, concluiu que em concentrações subletais ($\sim 20\%$) danos irreversíveis foram observados nas larvas na exposição em longo prazo, tais como alterações histopatológicas nas brânquias (hemorragia, telangiectasia lamelar, necrose, hipertrofia e hiperplasia), no fígado (basofilia, hipertrofia, cariopcnose) e nos rins (alterações nucleares e alargamento dos glomérulos).

Experimentos com exposição de misidáceos ao petróleo e seus derivados tem demonstrado a sensibilidade destes organismos em testes de toxicidade. No estudo realizado por Barron et. al. (1998) ao avaliarem os efeitos no crescimento e sobrevivência da espécie *Mysidopsis bahia* (96 h) expostos a três tipos de óleos, com diferentes teores de compostos aromáticos, coletados num campo de petróleo no litoral da Califórnia, observou uma inibição de 50% (na concentração de 0,5 mg L⁻¹) no crescimento dos misidáceos no óleo com menor teor de aromáticos, e uma CL₅₀, 96h de 1,6±0,83, 0,90±0,38 e 0,92±0,42 mg L⁻¹ em cada óleo testado, respectivamente. Os resultados demonstraram que o óleo de baixo teor de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pode ser altamente tóxico em relação ao de alto teor aromático e que os hidrocarbonetos alifáticos não eram o principal determinante da toxicidade dos três óleos.

Essa mesma espécie foi utilizada por Cleveland et. al. (2000) para avaliar a sobrevivência e o crescimento (7d) em exposição a fração solúvel do óleo testada sobre três diferentes intensidades de radiação solar simulada. Os autores perceberam que os efeitos foram potencializados à medida que a radiação aumentava (comprimento de onda de 280-700 nm), a CL₅₀ encontrada foi de 0,92±0,42 mg L⁻¹. Os resultados deste estudo indicam que os efeitos provocados através da interação do óleo e a radiação solar poderá aumentar substancialmente a toxicidade do óleo.

Perkins et. al., 2005, testaram a sensibilidade de três espécies (larvas do caranguejo *Chionocetes bairdi*, larvas do peixe estuarino *Menidiac beryllina* e o misidáceo de água salgada *M. bahia*) em exposição ao óleo cru e ao óleo tratado com dispersante. E os resultados demonstraram que o misidáceo apresentou maior sensibilidade em relação aos demais organismos em ambos os tratamentos, demonstrando assim a sensibilidade do misidáceo em testes com petróleo e seus derivados.

Estudos das alterações biológicas em organismos aquáticos mediante exposição ao tolueno também demonstram a elevada toxicidade (Tabela 1). Segundo a Ficha de Informação de Produto Químico (FISPIQ) para o tolueno, foi observado a toxicidade deste composto a diferentes organismos: peixes (*Carassius auratus*), DL₅₀ (24 h) de 58 mg L⁻¹ e a CL₅₀ (96 h) de 22,8 ppm. Em crustáceos

(*Palaemonetes pugio*) a CL₅₀ (96 h) foi de 9,5 ppm e em *Crangon franciscorum* a CL₅₀ (96 h) foi de 4,3 ppm.

Xuefeng, et. al. (2013) investigaram a toxicidade aguda do TEX (tolueno, etilbenzeno e xileno), isolados e em misturas, a larvas do inseto *Chironomus plumosus* em bioensaio semi-estático (48 h), utilizando o solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Foi observado nas análises dos compostos isolados que o etilbenzeno (CL₅₀ 64,9 mg L⁻¹) apresentou maior toxicidade seguido do xileno (CL₅₀ 37,8 mg L⁻¹) e tolueno (CL₅₀ 42,0 mg L⁻¹). Nos ensaios com a mistura binária das substâncias, a interação entre tolueno e etilbenzeno, xileno e etilbenzeno, e tolueno e xileno foi observado um efeito aditivo assim como na interação da mistura terciária.

Para avaliar a diferença de sensibilidade entre as espécies Marchini et al.(1993), compararam a sensibilidade de três espécies, sendo dois microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* (24 h), *Daphnia magna* (48 h), e a larva do peixe *Pimephales promelas* (96 h), com análise do efeitos agudo após exposição ao benzeno e oito benzenos monossustituídos (incluindo o tolueno) em sistema estático. Foi observado que o efeito agudo encontrado para tolueno em *C. dubia* (CL₅₀ 9.0±3 mg L⁻¹) e larvas de peixes (CL₅₀ 17±4 mg L⁻¹) foi semelhante para o produto químico testado. A comparação entre *C. dubia* e *D. magna* foi feita mediante o efeito de mortalidade e imobilização e mostrou uma tendência similar entre a sensibilidade das duas espécies.

Berton (2003) também registrou a mortalidade e imobilidade em diferentes espécies (o microcrustáceo *Daphnia magna* e a bactéria marinha *Vibrio fischeri*) sobre um padrão comercial do BTEX em mistura, o benzeno e tolueno (isolados), utilizando o solvente metanol. Os resultados mostraram que os testes com *D. magna* a toxicidade foi maior nas substâncias isoladas com os valores de CE₅₀,48 h, para BTEX-Mix, benzeno e tolueno de 1.187,27, 73,23 e 81,58 µg L⁻¹, respectivamente. Segundo o autor, as soluções de benzeno e tolueno apresentaram maior toxicidade quando isolados do que em misturas conferindo assim o efeito antagônico.

Ribeiro (2007) observou os efeitos em concentrações subletais dos compostos BTX no peixe *Sphoeroides testudineus* e percebeu após 168 horas de exposição que o fígado apresentou um aumento no tamanho dos hepatócitos e alterações morfológicas do núcleo, além de algumas lesões nas brânquias. Para

calcular as concentrações subletais, primeiramente o autor determinou a CL_{50} dos compostos e observou um valor de 246 mg L^{-1} para o tolueno.

Ainda analisando os mesmos compostos aromáticos, Tosato et. al. (1993) avaliaram a toxicidade para *D. magna* em exposição aos derivados do benzeno e os valores de CE_{50} , 24 h referente ao tolueno foi $6,37 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$. Vieira (2004) estudou a toxicidade aguda do benzeno e tolueno, ao microcrustáceo marinho *Metamysidopsis elongata atlântica* em um sistema estático, utilizando o solvente metanol, e o valor da CL_{50} , 48 h para o tolueno de $235 \pm 5,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e o benzeno de $95 \pm 4,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

De acordo com Vieira (2004) existem poucos trabalhos na literatura sobre testes de toxicidade com compostos monoaromáticos utilizando misidáceos e poucos são os estudos que determinem a toxicidade de aromáticos e que possam ser comparativas. Todavia, em comparação com ensaios realizados com outras espécies de microcrustáceos citadas acima (*Metamysidopsis elongata atlântica*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*) mostraram que concentrações menores ($\mu\text{g L}^{-1}$) de tolueno causaram efeitos adversos, sugerindo que o *Mysidopsis juniae*, é o menos sensível ao tolueno que tais espécies. Este fato pode estar intimamente ligado à adição de solventes em alguns destes estudos, pois ao utilizar um solvente, para deixar as substâncias mais solúveis, pode acabar aumentando o efeito tóxico da substância a ser estudada em concentrações mais baixas da mesma (Hutchinson, et. al.,2006).

De acordo com Hutchinson et. al. (2006) em ensaios de toxicidade deve-se evitar o uso de solventes, e caso haja a necessidade do uso é recomendado um estudo prévio das máximas concentrações permitidas para não afetar o estudo. Para o etanol, em organismos aquáticos, a concentração máxima seria de $78,9 \text{ mg L}^{-1}$ e para o metanol de $79,2 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 1: Toxicidade do tolueno a organismos aquáticos. (*)Trabalhos que utilizaram solvente.

Organismo	Ambiente	Efeito	CL_{50}/CE_{50}	Autor
<i>Metamysidopsis elongata atlântica</i> (Crustáceo)	Marinho	Mortalidade	$235 \pm 5,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1*}$ (48h)	Vieira, 2004

<i>Palaemonetes pugio</i> (Crustáceo)	Marinho	Mortalidade	9,5 ppm (96 h)	FISPIQ
<i>Crangon franciscorum</i> (Crustáceo)	Marinho	Mortalidade	4,3 ppm (96 h)	FISPIQ
<i>Sphaeroides testudineus</i> (Peixe)	Água doce	Mortalidade Alteração no fígado	246 mg.L ⁻¹ (4 e 7 dias)	Ribeiro, 2007
<i>Daphnia magna</i> (Crustáceo)	Água doce	Imobilidade	81,58 ± 6,1 µg.L ^{-1*} (168h)	Berton, 2013
	Água doce	Imobilidade	6,37 ± 2,3 mg.L ⁻¹ (24h)	Tosato et. al. (1993)
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Crustáceo)	Água doce	Mortalidade	9.0 ± 3 mg.L ⁻¹ (24h)	Marchini et. al. (1993)
<i>Chironomus plumosus</i> (Inseto)	Água doce	Mortalidade	42,0 mg.L ^{-1*} (48h)	Xuefeng et. al. (2012)
<i>Carassius auratus</i> (Peixe)	Água doce	Mortalidade	22,8 ppm (96 h)	FISPIQ

Normalmente, o metanol é o principal solvente encontrado nos padrões comerciais do BTEX e muito utilizado em laboratórios analíticos. Em estudos para análise da toxicidade de solventes, foram selecionados cinco solventes orgânicos: metanol, etanol, N-dimetilformamida, acetona e DMSO em ensaios com nove espécies de microalgas marinhas, a toxicidade dos solventes variou de acordo com o organismo teste, porém foi possível estabelecer a ordem crescente de toxicidade: DMSO, DMF, metanol ou acetona e etanol (Okumura et al. 2001).

Outro fator que deve ser avaliado é o ambiente em que estes organismos estão inseridos. Segundo Neff (2002), a solubilidade em água marinha é menor do que em água doce, pois os compostos orgânicos apolares tendem a diminuir sua solubilidade de acordo com o aumento das concentrações de sais inorgânicos. Sendo assim, as espécies dulcícolas tendem ter uma maior exposição a substância, podendo assim ocasionar um efeito em concentrações menores em relação a espécies marinhas.

Os resultados obtidos no presente estudo, embora sejam preliminares, podem ajudar como base para futuros trabalhos que determinem os efeitos do tolueno em misidáceos, pois embora os ensaios de toxicidade aguda com estes organismos sejam frequentemente realizados no monitoramento ambiental de atividades petrolíferas, ainda são escassos os estudos que apresentem os efeitos deste composto presente no petróleo. Portanto, novos estudos devem ser realizados a fim de determinar a CL_{50} que servirá de base para os demais ensaios envolvendo os efeitos com *Mysidopsis juniae*. Assim, o estudo da toxicidade do tolueno é importante para avaliação dos efeitos do mesmo na biota aquática.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo faz parte de um projeto “Estudo da toxicidade do BTEX utilizando uma abordagem múltipla com *Mysidopsis juniae*” que tem como objetivo avaliar a toxicidade (aguda e crônica) desses hidrocarbonetos monoaromáticos isolados e em mistura.

Os dados obtidos nesse trabalho indicam que a concentração letal a 50% dos organismos (CL_{50}) do tolueno possivelmente deve-se encontrar na faixa de concentração de 10 a 50 mg L⁻¹. Novos ensaios serão realizados, a fim de determinar a CL_{50} que servirá de base para os demais ensaios envolvendo os efeitos sub-letais (crescimento, peso seco e fecundidade) nos misidáceos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Associação Brasileira de Norma Técnicas. NBR15308: Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea). 2011. p.19.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological profile for xylene. Update. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2000. Toxicological profile for toluene. Update. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.

Almeida, K.C.S. 2006. Avaliação da contaminação da água do mar por benzeno, tolueno e xileno na região de Ubatuba, litoral norte (SP) e estudo da degradação destes compostos por radiação ionizante. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo - USP. 84p.

Andrade, M.V.F.; Fontenele, D.P.; Oliveira, L.D.M.; Cavalcante, R.M. & Marins, R.V.2010. Distribuição superficial de BTEX na enseada do Mucuripe, Fortaleza-CE. III Congresso Brasileiro de Oceanografia.

Aragão, J.S. 2006. Toxicidade do efluente de uma fazenda de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e do metabissulfito de sódio em juvenis de *Mysidopsis juniae*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 75p.

Baird, C.B. 1995. Environmental chemistry. W.H. Freeman and CO. 517p.

Barnes, R.D. 1984. Zoologia dos invertebrados. Livraria Roca. 1179p.

Barron, M.G.; Podrabsky, T.; Ogle, S.& Ricker, R.W. 1998. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? Aquatic Toxicology. 46: 253–268.

Berton, S.M.H. 2013. Estudo da toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos utilizando *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*. Tese de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. 156p.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 17 de março de 2005.

Buratini, S.V. & Brandelli, A. 2008. Análise Estatística in Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. Zagatto, P.A. & Bertoletti (org.).E. São Carlos: RiMa. 55-88pp.

CESTEB, Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo, 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2001.

Cleveland, L.;Little, E.E.;Calfee, R.D. & Barron, M.G. 2000. Photoenhanced toxicity of weathered oil to *Mysidopsis bahia*. Aquatic Toxicology. 49: 63–76.

Cunha, C.D. & Leite, S.G.F. 2000. Gasoline biodegradation in different soil microscoms. Braz. J. Microbiol. 31: 45–49.

Figueiredo, LP. 2013. Uso de *Mysidopsis juniae* na análise da toxicidade dos metais zinco e níquel. Universidade Estadual do Ceará- UFC. 83p.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science & Technology. 11(7): 714-719.

Hamilton, A. & Hardy H.L. 2004. Industrial Toxicology. 3° ed. Acton, Mass: Publishing Sciences Group, Inc.

Heleno, F.F.; Lima, A.C.; Afonso, R.J.C.F.& Coutrim, M.X. 2010. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. Química Nova. 33 (2): 329-336.

Hutchinson, T.H.; Shillabeer, N.; Winter, M.J. & Pickford, D.B. 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Aquatic Toxicology. 76(1): 69-92.

International Programme on Chemical Safety (IPCS/INCHEM, 1986). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc52.htm>. Acessado em 14/12/2014.

ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. 2014. Accidental Tanker Oil Spill Statistics. International Tanker Owners Pollution Federation Ltd., London.

Marchini, S.; Hoglund, M.D.; Borderius, S.J. & Tosato, M.L. 1993. Comparison of the Susceptibility of Daphnids and Fish to Benzene Derivatives. Sci.Total Environ. (Suppl.). 134(1): 799-808.

Neff, J.M. 2002. Bioacumulação em organismos marinhos. 1º Edição. Elsevier Science. 460p.

Nicodemo, S.C.T.S. 2010. Diagnóstico ecotoxicológico dos efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiá/Potengi, Natal-RN. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. 96p.

Nihoul, C. & Ducroty, J.P. 1994. Impact of Oil on The Marine Environment: Policy of the Paris Commission on Operation Discharges from Off-Shore Industry, Marine Pollution Bulletin. 29(6): 323-329.

NTP, National Toxicology Program. 2005. Carcinogens listed the eleventh report, Research Triangle Park, NC, 11th report on carcinogens (RoC). Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov> Acessado em 04/11/2014.

Okumura, Y.; Koyama, J.; Takaku, H. & SATOH, H. 2001. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. Archives of Environmental Contaminat Toxicology. 41: 123–128

Oliveira, R.C.G. & Oliveira, M.C.K. 2000. Remoção de contaminates tóxicos de efluentes líquidos oriundos da atividade de produção de petróleo no mar. Boletim técnico Petrobrás, Rio de Janeiro, v.43, n 2, p. 129-136.

Perkins, R.A.; Rhoton, S. & Behr-Andres, C. 2005. Comparative marine toxicity testing: A cold water species and standard warm-water test species exposed to crude oil and dispersant. Cold Regions Scienc and technology. 42: 226- 236.

Ribeiro, E.A. 2007. Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe *Sphaeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos. Tese de Mestrado. Universidade Federal Paraná – UFPR. 61p.

Silva, R.L., Barra, C.M., Monteiro, T.C.N. & Brilhante, O.N. 2002. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 18(6):1599-1607.

Silva, F.L.N.; Santos JR., J.R.; Moita Neto, J.M.; Silva, R.L.G.N.; Flumignan, D.L. & Oliveira, J.E. 2009. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. Química Nova. 32 (1): 56-60.

Sousa, F.W. 2011. Estimativa da exposição e risco de câncer a compostos carbonílicos e btex em postos de gasolina na cidade de Fortaleza-Ce. Tese de mestrado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 187p.

Sturve, J.; Hasselberg L.; Falth, H.; Celander, M. & Förlin, L. 2006. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat Toxicol* 78: 73-78.

Tosato, M. L; Pino, A; Passerini, L; Marchini, S. M.; Vigano, L. & Hoglund, M. 1993. Updating and validation of a daphnia toxicity model for benzene derivatives. *Science Total Environmental*. 134: 1479-1490.

Vieira, F.C.S. 2004. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea, Mysidacea). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC 83p.

Xuefeng, L.; Luo, Y.; Yang, G. & Zhou, T. 2013. Joint action and lethal levels of toluene, ethylbenzene, and xylene on midge (*Chironomus plumosus*) larvae. *Environ Sci Pollut Res*. 20:957–966.

ANEXO A

O presente trabalho teve como base as normas de formatação da revista Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology – BJASt.

O texto deve ser digitado com tamanho de folha A4, margens superior e inferior de 2,5 cm e esquerdo e direito de 3,0 cm, espaço duplo, letra arial 12, linhas numeradas, e todas as páginas numeradas. Todos os cabeçalhos das seções (Introdução, Materiais e Métodos, etc.) deverão estar em negrito (e.g. **Introdução**). Se forem utilizados cabeçalhos para níveis inferiores, estes deverão ser colocados em itálico (e.g. *Área de Estudo*).

Abreviações de origem latina ('e.g.', 'et al.') não devem estar em itálico. As expressões 'e.g.' e 'i.e.' não devem ser seguidas de vírgula. Nomes de espécies devem ser dados por extenso na primeira vez que forem mencionados, incluindo o nome do descritor (e.g. '*Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)'). Posteriormente o nome completo pode ser utilizado ou não à critério dos autores. Em todas as ocasiões deverão ser escritos em itálico.

Números, datas e referências a mapas: Os numerais quando utilizados isoladamente devem grafados por extenso até dez. De 11 até 999, usam-se os algarismos arábicos. A partir do milhar (mil), são grafados de forma mista (e.g. 150 mil, 15 milhões, dois bilhões). Para unidades muito elevadas sugere-se totalmente por extenso. Quando expressam dados estatísticos e matemáticos, medições específicas e de caráter preciso expressas em unidades de padrão internacional e porcentagens, deverão ser grafados em algarismos arábicos quando estiverem acompanhados do respectivo símbolo de medida (e.g. 3%, 5°C). **As frases não devem ser iniciadas com algarismos, mas com o número por extenso.** Não devem ser utilizados espaços ou pontos para separar milhares (e.g. 123654). Valores decimais devem utilizar vírgulas (e.g. 1789,25). Devem ser utilizadas as unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI). As unidades devem seguir os algarismos sem espaços (e.g. 12cm; 1,35km). Datas devem ser expressa no formato DD/MM/AAAA (e.g. 19/05/1970) ou '19 de maio de 1970'.

Tabelas e Figuras: Apresentadas no final do manuscrito com a respectiva identificação para fins de revisão do manuscrito. Devem estar em tamanho adequado para avaliar sua relevância para o artigo e qualidade do material apresentado. Para a versão final do manuscrito, após as devidas correções, as

figuras deverão ser enviadas separadamente pelos autores. Cada figura deverá ser submetida em um arquivo de imagem separado, utilizando a opção "Material Suplementar".

Gráficos e ilustrações geradas por computador devem ser enviadas preferencialmente em formato vetorial tais como Scalable Vector Graphics (.SVG), CorelDraw versão 13 (.CDR) e Windows Meta File (.WMF). Fotos e imagens escaneadas devem ser enviadas preferencialmente no formato TIFF, em resolução igual ou maior do que 600 dpi.

Citações

e

Referências

Citações no texto

- Um autor: Andrade (2001); (Andrade, 2001);
- Dois autores: Andrade & Perez (2001); (Andrade & Perez, 2001)
- Três ou mais autores: Andrade et al. (2001) e (Andrade et al., 2001).

No caso da citação de mais de uma referência deve-se seguir a ordem cronológica das mesmas: "Barreto & Resgalla (1995), Andrade et al. (2001)" ou "(Barreto & Resgalla, 1995; Andrade et al., 2001)"

Referências

Listar somente as citações do texto em ordem alfabética, segundo o modelo abaixo:

- Artigo:
Pereira Filho, J.; Rorig, L.R.; Hesse, K.; Schettini, C.A.F.; Proença, A.L. & Santos, J.E. 2009. Primary and bacterial production processes in the lower Itajaí-Açú estuary, Santa Catarina, Brazil. Braz. J. Aq. Sci. and Tech. 13(1): 1-10.
- Livro:
Parsons, T.R.; Takahashi, M. & Hargrave, B. 1984. Biological oceanographic process. 3º Edição. Pergamon Press, Oxford, 330p.
- Capítulo de livro:
Smaal, A.C. & Widdows, J. 1994. The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological monitoring. In: Kramer, K.J.M.

(ed.) Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Boca Raton. 247-267pp.

- Teses:

Godoi, S.S. 1982. Estudos das variações sazonais da frente oceânica entre a Corrente do Brasil e a Corrente das Malvinas, utilizando dados oceanográficos e dados do satélite SMS-2. Tese de Mestrado. Instituto de Pesquisas Espaciais - INPE. 123p.