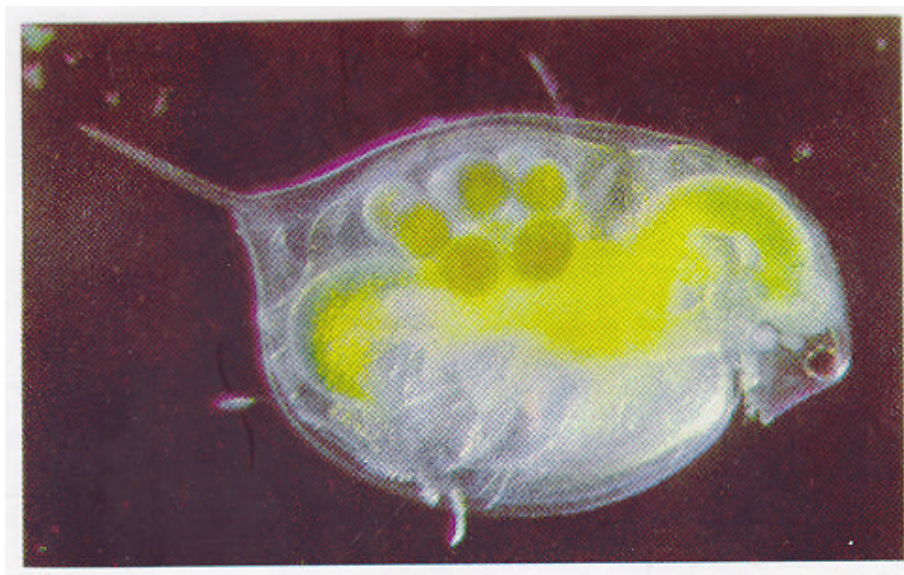




UNISANTA  
UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA  
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA



**TESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA  
NO CONTROLE DA POLUIÇÃO**

**AUTORES:**

***AUGUSTO CESAR***

***SERGIO LUIZ R. DA SILVA***

***ALDO RAMOS SANTOS***

**Santos SP, Fevereiro de 1997 - 4ª Edição**

Home Page: [www.stcecilia.br](http://www.stcecilia.br)

E.mail .....: [lecotox@usc.stcecilia.br](mailto:lecotox@usc.stcecilia.br)

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Cesar, Augusto

Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição / Augusto Cesar, Sérgio Luíz Rodrigues da Silva & Aldo Ramos Santos - Universidade Santa Cecília - UNISANTA - Santos, São Paulo, Brasil, fevereiro de 1997.

37 pág. 28cm.

- |                     |                 |                                 |
|---------------------|-----------------|---------------------------------|
| 1. Análises de Água | 2. Toxicidade   | 3. Teste de Toxicidade Aquática |
| 4. Daphnia          | 5. Ceriodaphnia | 6. Lytechinus                   |

## APRESENTAÇÃO

Com o advento gradual da integração do Laboratório de Ecotoxicologia, junto às diversas atividades educacionais da Universidade Santa Cecília, surgiu a crescente preocupação na transferência de informações e experiências adquiridas por nossa equipe, ao longo do desenvolvimento dos trabalhos realizados nos últimos 7 anos, desde a inauguração do Laboratório.

Durante esses anos, com o intuito de atualizar constantemente essas informações, foram realizadas diversas revisões da primeira apostila, cujo título era “ AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES LIQUIDOS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DE TESTE DE TOXICIDADE “, as quais nos conduziram a esta quarta edição, que possui uma abrangência maior, como consequência da evolução natural do nosso trabalho.

O título atual, “ TESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA NO CONTROLE DA POLUIÇÃO“, constitui uma síntese de algumas das principais metodologias e atividades desenvolvidas, rotineiramente, no Laboratório de Ecotoxicologia, através de uma abordagem simples e didática, voltada à universitários, representantes de indústrias e a todos que tenham interesse na preservação ambiental.

Os Autores.

# INDÍCE

1.	Introdução .....	01
2.	Principais Objetivos do Laboratório de Ecotoxicologia .....	03
2.1	Principais Atividades Desenvolvidas .....	03
3.	Terminologia .....	04
4.	Amostragem .....	06
4.1	Técnicas de Amostragem .....	06
4.2	Identificação das Amostras .....	07
5.	Testes de Toxicidade Aquática .....	08
5.1	Teste de Toxicidade Aguda .....	09
5.2	Teste de Toxicidade Crônica .....	09
5.3	Teste Preliminar .....	10
5.4	Teste Definitivo .....	10
5.5	Principais Métodos Padronizados Disponíveis .....	10
5.6	Aplicação dos Métodos: Escolha dos Testes Apropriados .....	11
5.7	Principais Equipamentos e Materiais Empregados .....	13
5.8	Testes de Toxicidade com <i>Daphnia similis</i> .....	14
5.9	Testes de Toxicidade com <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	17
5.10	Testes de Toxicidade com <i>Lytechinus variegatus</i> .....	18
6.	Organismos-Teste .....	21
6.1	Biologia e Manutenção .....	22
6.1.1	Microcrustáceos ( <i>Daphnia</i> & <i>Ceriodaphnia</i> ) .....	22
6.1.2	Coleta e Manutenção ( <i>Daphnia</i> & <i>Ceriodaphnia</i> ) .....	24
6.1.3	Ouriços-do-mar ( <i>Lytechinus</i> & <i>Echinometra</i> ) .....	26
6.1.4	Coleta e Manutenção ( <i>Lytechinus</i> & <i>Echinometra</i> ) .....	30
7.	Análise Estatística .....	31
8.	Aplicação dos Resultados .....	32
8.1	Avaliação da Carga Tóxica .....	32
8.2	Estimativa do Potencial de Impacto Ambiental .....	33
8.3	Redução de Toxicidade .....	33
9.	Legislação Pertinente .....	34
10.	Referências Bibliográficas .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

A caracterização de efluentes líquidos industriais tem sido realizada sobretudo através de análises físico-químicas, sendo que as concentrações máximas são estabelecidas na legislação vigente, por padrões numéricos de emissão. No entanto, a grande diversidade e complexidade das substâncias num mesmo efluente líquido, tornam inviável a sua completa caracterização, não só do ponto de vista analítico, como do econômico. Além disso, pesquisas têm demonstrado que os resultados obtidos através dessas análises, dificilmente fornecem informações sobre o efeito conjunto de várias substâncias que interagindo, podem afetar a biota presente no ambiente aquático. Enquanto a análise química identifica e quantifica isoladamente as substâncias em um efluente industrial, o ensaio biológico detecta a reação de organismos vivos a uma situação global; o efluente industrial como um todo ou uma amostra de água de um corpo receptor ao qual são lançados despejos industriais (CETESB-1986).

Testes de toxicidade com organismos têm sido utilizados em países desenvolvidos e em desenvolvimento, complementando as análises físico-químicas. Através desses ensaios, podem-se estabelecer padrões de emissão que permitam identificar problemas de lançamento de misturas de substâncias tóxicas, estabelecer prioridades de controle em regiões críticas, como a de Cubatão, viabilizar as ações corretivas apropriadas, bem como monitorar o ecossistema aquático, tendo em vista os usos predominantes das águas.

A Ecotoxicologia vem estudando o comportamento e as transformações desses agentes químicos no ambiente, assim como seus efeitos sobre os organismos vivos. Neste sentido, muita ênfase tem sido dada aos ecossistemas aquáticos pois, além das substâncias normalmente lançadas nesses sistemas, outras, provenientes do ar ou do solo, podem eventualmente atingir o meio aquático na sua forma original ou como produto de transformação (BERTOLETTI, 1990).

Portanto, para identificar os efeitos destas substâncias sobre a biota aquática, tem sido utilizados, nestas últimas décadas, testes de toxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo. Esses testes possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas e, ainda, avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos receptores (BERTOLETTI, 1990).

Através dos testes de toxicidade, determinam-se o tempo e as concentrações em que o agente químico é potencialmente prejudicial, pois para qualquer produto o contato com a membrana ou sistema biológico pode não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente. Concentração e tempo de exposição estão diretamente relacionados e, portanto, altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (FONSECA, 1991). Mas devemos lembrar que as pequenas concentrações geralmente produzem efeitos crônicos sub-letais e, até mesmo, letais durante longos períodos de exposição.

O controle da toxicidade em efluentes líquidos e corpos receptores através de bioensaios com organismos aquáticos é um importante instrumento que os órgãos públicos e privados de Controle Ambiental, tanto internacionais como a nível nacional e estadual, vêm colocando em prática dentro da sua sistemática de ação. No Estado de São Paulo, a CETESB já vem utilizando este procedimento há alguns anos.

A atuação da CETESB nos últimos anos tem sido crescente no monitoramento de toxicidade de efluentes líquidos industriais e corpos receptores em várias regiões do Estado de São Paulo, visando a implementação de testes de toxicidade como instrumento de controle de poluição hídrica.

Em 1990, a Refinaria Presidente Bernardes de Cubatão (RPBC) preocupada em avaliar o impacto de seus efluentes nos corpos receptores da região, decidiu monitorá-los através de um convênio com a Universidade Santa Cecília dos Bandeirantes - UNICEB (Atual UNISANTA).

Por intermédio desse documento, ficou estabelecido que a Universidade montaria um laboratório (fig. 1), capacitado para a realização de testes de toxicidade nos efluentes líquidos da RPBC que, por sua vez, pagaria pelos serviços prestados, podendo, todavia, a UNICEB atender às demais empresas do polo de Cubatão, bem como de outras regiões. Atualmente o Laboratório de Ecotoxicologia “Prof. Caetano Belliboni”, da Universidade Santa Cecília, além da prestação de serviços, também desenvolve trabalhos de pesquisas, entre outras atividades acadêmicas na área Ecotoxicológica e Ambiental.

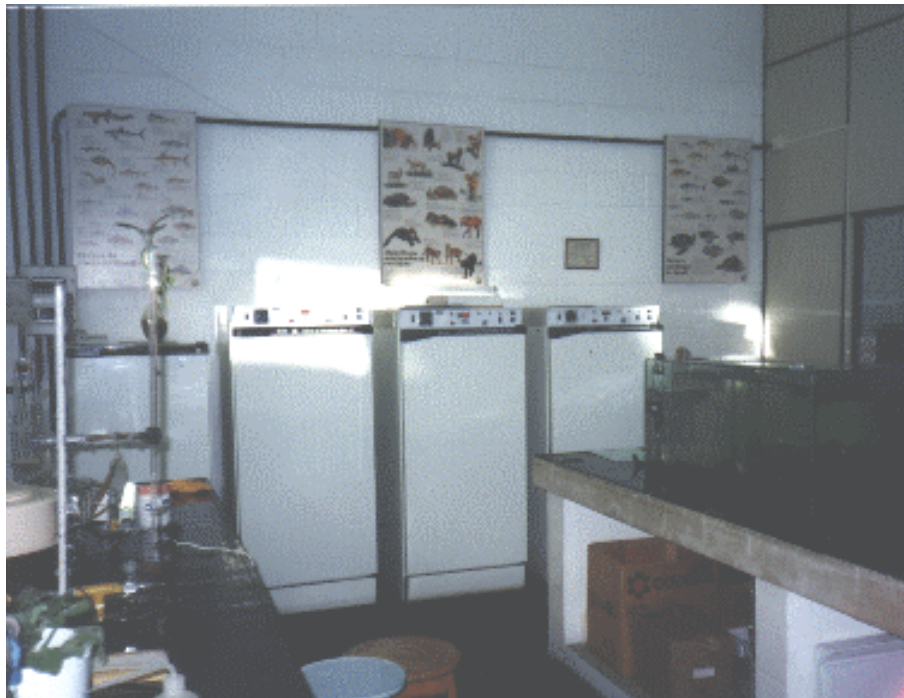


Figura 1. Laboratório de Ecotoxicologia.

## 2. PRINCIPAIS OBJETIVOS DO LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA

O Laboratório de Ecotoxicologia *Prof. Caetano Belliboni* tem como objetivos:

Avaliar e caracterizar a toxicidade em efluentes líquidos industriais, substâncias químicas solúveis em água e corpos receptores, sejam eles continentais, estuarinos ou oceânicos, através de testes de toxicidade agudos, crônicos e crônicos de curta duração, padronizados e empregados por instituições de pesquisas e de controle, com o objetivo de contribuir com o desenvolvimento da ciência e tecnologia.

Capacitar pessoal especializado para trabalho de pesquisa e consultoria, além de orientar e informar representantes de indústrias e outros interessados, quanto à importância e necessidade da utilização de testes de toxicidade no controle da poluição hídrica, entre outras atividades ligadas à área ambiental.

### 2.1 PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Dentre as principais atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Ecotoxicologia destacam-se os Trabalhos Ecotoxicológicos e as Atividades Acadêmicas.

Desde a inauguração do laboratório, vem sendo realizados e desenvolvidos trabalhos de avaliação e caracterização de efluentes líquidos industriais, produtos químicos e corpos receptores continentais ou oceânicos, através de testes de toxicidade padronizados ( item 5 ).

Juntamente com os trabalhos de pesquisa e prestação de serviços, o laboratório vem desenvolvendo as seguintes atividades acadêmicas.

- Aulas teóricas e práticas, ministradas a diversos cursos e níveis educacionais, desde o 1º- grau até a pós-graduação, tanto para alunos desta instituição bem como de outras;
- Cursos e treinamentos práticos especializados na área de ecotoxicologia;
- Apoio técnico e científico em trabalhos de pesquisa e consultoria, desenvolvidos por outras instituições, pesquisadores, professores e alunos;
- Representação no Conselho Municipal de Defesa do Meio Ambiente da Cidade de Santos (CONDEMA - Santos );
- Representação no grupo de trabalho de normatização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); entre outras atividades ligadas a área ambiental.

### 3. TERMINOLOGIA

- **AGENTE TÓXICO** : Substâncias ou outros materiais, tais como formulações químicas, efluentes líquidos e águas contaminadas continentais, estuarinas ou oceânicas , que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos -teste.
- **ÁGUA DE DILUIÇÃO** : Água natural ou artificial, de boa qualidade, utilizada para manutenção de culturas e para realização dos testes de toxicidade.
- **CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE50;...h.)** : Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo ( ex. imobilidade ou morte) a 50% dos organismos-teste, num determinado período de exposição, nas condições de teste, por exemplo CE50; 48h.
- **CONCENTRAÇÃO LETAL (CL50;...h.)** : Concentração tóxica que provoca a morte dos organismos-teste. Usualmente definida como concentração média letal (CL50), ou seja, a concentração que mata 50% dos organismos expostos a um tempo específico nas condições de teste, por exemplo, CL50;96 h.
- **CONCENTRAÇÃO DE EFEITO NÃO OBSERVADO (CENO)** : É a maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, nas condições de teste.
- **CONCENTRAÇÃO DE EFEITO OBSERVADO (CEO)** : É a menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, nas condições de teste.
- **CONCENTRAÇÃO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO (ICp)** : É a concentração que causa um percentual de inibição na reprodução ou no desenvolvimento embrionário e/ou larval em um tempo específico de exposição, nas condições de teste.
- **CONCENTRAÇÃO DO EFLUENTE NO RIO (C.E.R.)** : Quando lançado em um corpo hídrico, os efluentes sofrem um gradativo processo de diluição, em função da sua vazão e do volume do corpo receptor, resultando numa concentração final do efluente. Esta concentração pode ser calculada pela fórmula:

$$CER = \frac{\text{Vazão do Efluente} \times 100}{\text{Vazão do Efluente} + Q_{7.10}}$$

- **SOLUÇÕES-ESTOQUE** : Soluções do agente tóxico em diferentes concentrações, a partir das quais são preparadas as soluções-teste.
- **SOLUÇÕES-TESTE** : Soluções finais do agente tóxico, nas quais são expostos os organismos-teste.



- **SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA** : Substância química utilizada para avaliar a sensibilidade dos organismos -teste.
- **TEMPO DE EXPOSIÇÃO** : Período durante o qual um organismo é exposto a uma solução-teste.
- **TOXICIDADE** : Capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios aos organismos vivos.
- **TESTE DE TOXICIDADE** : Método utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios nos organismos-teste.
- **TOXICIDADE AGUDA** : Efeito observado de curta duração, que se manifesta rápida e severamente, causando a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo, num intervalo de 0 a 96 horas.
- **TOXICIDADE CRÔNICA** : Efeito de longa duração relatado como mudança no metabolismo, crescimento, reprodução, mutações e até mesmo morte dos organismos-teste.
- **VAZÃO MÍNIMA DO RIO (  $Q_{7.10}$  )** : Vazão mínima do rio, média de 7 dias consecutivos, com probabilidade de retorno de 10 anos. Obs.: Quando os dados de históricos de vazão não são conhecidos, adota-se a pluviosidade na bacia hidrográfica para determinar a  $Q_{7.10}$ .
- **VALOR CRÔNICO (VC)** : É a média geométrica dos valores de CENO e CEO.

#### 4. AMOSTRAGEM

A coleta de amostra é uma importante etapa em qualquer programa de monitoramento ecotoxicológico. Existem normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, específicas para cada tipo de programa, visando a obtenção de amostras que representem a situação real e global de um efluente, no estágio em que se encontra. Para a coleta de amostras de efluentes líquidos e águas receptoras, deve-se seguir a **ABNT NBR 9897** (Planejamento de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores) e **NBR 9898** (Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores).

##### 4.1 TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM

A amostragem de efluentes constitui parte integral e fundamental de qualquer programa de monitoramento de despejos líquidos, pois fornece a base para a avaliação das propriedades e efeitos potenciais do efluente.

Normalmente os efluentes variam em termos de vazão e de concentração de seus constituintes. Essas variações ocorrem devido a uma série de fatores como, por exemplo, mudanças nos ciclos de produção das indústrias e variações no desempenho dos sistemas de tratamento, além das alterações ambientais naturais que interferem diretamente na dinâmica destas substâncias.

Poucos efluentes permanecem estáveis durante longos períodos de tempo, mesmo indústrias que operam de forma contínua estão sujeitas a variações decorrentes das diversas atividades operacionais, que podem causar alterações nas concentrações de seus constituintes e volumes.

Assim, a decisão quanto à escolha do tipo de amostragem de efluentes líquidos, se composta ou instantânea, dependerá não só do conhecimento dos processos industriais e de tratamento, mas também dos objetivos a que se destinam os resultados dos testes.

A frequência de coleta das amostras será determinada através da investigação de cada caso, pela experiência dos profissionais responsáveis e pelo tipo de amostragem selecionado.

Para a maioria dos casos, nos quais se pretende avaliar a toxicidade média do efluente, recomendam-se amostras compostas, em períodos variados, que não devem exceder 24 horas. Em geral, esse tipo de amostragem tende a aproximar os resultados de toxicidade a valores médios, pois os picos de efeito tóxico máximo e mínimo não são detectados. Para efluentes industriais tratados por processos físico-químicos com curto tempo de retenção, recomenda-se, em especial, a coleta de amostras compostas.

As amostras instantâneas possibilitam a identificação de picos de efeitos tóxicos máximos e mínimos, dependendo da frequência de amostragem. Essa amostragem é realizada quando há limitações de ordem econômica em geral, caracterizando-se pela facilidade de operação e requerendo o mínimo de equipamento e tempo. A amostragem instantânea é recomendada para efluentes lançados em regime de intermitência; provenientes de tratamento com período de detenção superior a 14 dias e cuja variação de toxicidade ao longo do tempo já é conhecida.

É preciso observar que, se a frequência de amostragem instantânea não for adequada, é possível perder os picos de toxicidade máxima. É interessante lembrar que curtos períodos de exposição a elevados níveis de toxicidade podem gerar, no ambiente, impactos de curto período de tempo, que podem manifestar-se através de efeitos agudos.

Antes da coleta das amostras, deve-se ter conhecimento das características físicas, químicas e biológicas, bem como da sua periculosidade, a fim de se resguardar a segurança das pessoas envolvidas no manuseio e preparo das mesmas

As amostras, tanto instantâneas quanto compostas, devem ser acondicionadas em frascos limpos de polietileno, polipropileno ou de vidro borossilicato escuro. O volume a ser coletado para testes com microcrustáceos e equinodermos deve ser de 1 litro e de 20 litros para testes com peixes. Os frascos devem ser totalmente preenchidos com a amostra de maneira a evitar a presença de ar nos mesmos. O ensaio deve ser realizado o mais rápido possível, não excedendo o período de seis horas, contando a partir do início da coleta. Na impossibilidade de ser obedecido este intervalo de tempo, a amostra deverá ser mantida a 4°C (quatro graus Celsius), a partir do momento da coleta, até no máximo de 36 horas. As amostras não devem ser preservadas com produtos químicos e devem ser efetuadas de acordo com a norma ABNT NBR 9898.

#### **4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Cada amostra deve ser identificada com uma etiqueta contendo as seguintes informações: Código de identificação da amostra; Local de amostragem; Data e hora da coleta e Nome do técnico responsável pela coleta da amostra.

É importante que seja preenchido um formulário controle da amostragem na indústria contendo, além das mesmas informações das etiquetas, os seguintes dados: Data e hora do recebimento da amostra pelo laboratório; Tipo de amostra (simples ou composta); Tipo de análise a ser realizada no laboratório; Observações extras; Resultados de análises físico-químicas rotineiras referentes aos pontos que serão amostrados, a fim de estabelecer uma possível correlação entre os dados obtidos.

Como será de controle interno da indústria, esse formulário não seguirá um modelo definido, porém todos os parâmetros diretamente relacionados ao tratamento do efluente, em cada caso específico, deverão ser abordados.

## **5. TESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA**

Um teste de toxicidade aquática é um procedimento no qual as respostas dos organismos aquáticos são usadas para detectar e medir os efeitos de uma ou mais substâncias, resíduos, ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação, durante um determinado tempo.

Com estas respostas, pode-se estimar, através de métodos estatísticos, a concentração dessas substâncias, que certamente poderão causar toxicidade aos organismos representantes dos corpos receptores. Assim, a toxicidade característica inerente de uma substância ou mistura de substâncias químicas se evidencia sobre os organismos vivos e torna-se a única variável a ser controlada.

Os estudos ecotoxicológicos fornecem os elementos que representam a base para o desenvolvimento dos testes de toxicidade, levando-se em conta que nem todos os efeitos biológicos observados nos organismos vivos podem ser utilizados com um objetivo prático, pois, para que isso aconteça, torna-se necessário que os efeitos observados tenham um significado ecológico bem definido.

Sendo assim, para detecção e controle da toxicidade de efluentes industriais é importante que os testes de toxicidade sejam bem estabelecidos e padronizados, a fim de se obter uma boa reprodutibilidade dos resultados, independentemente da amostra e do laboratório responsável pela realização do mesmo.

Dependendo da sua composição química, alguns efluentes são mais tóxicos a um determinado organismo-teste, por exemplo, alguns efluentes podem ser mais tóxicos para microcrustáceos do que para peixes, ou vice-versa. Sendo assim, é recomendado sempre que possível, avaliar o efeito de um determinado efluente, no mínimo com três organismos, representantes de diferentes níveis tróficos, para se estabelecer qual o organismo mais sensível e assim, estimar com maior segurança, o impacto desse efluente num corpo receptor.

### **5.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA**

Trata-se de um teste de toxicidade que avalia uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas. (RAND & PETROCELLI, 1985). Normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a antecede, como o estado de imobilidade em alguns microcrustáceos. (CABRIDENC 7 LUNDHL, 1974).

Para avaliar os efeitos agudos dos agentes tóxicos em testes de toxicidade, usa-se geralmente, a concentração efetiva (CE50 ...h) que causa mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos-teste. Assim, a exposição a uma elevada concentração de agentes tóxicos, mesmo que por curto período de tempo, pode causar efeitos deletérios aos organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos, embora costumeiramente, estes acontecimentos sejam relatados como mortalidade de peixes.

### **5.2 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA**

Este teste avalia ação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por período que vai de 1/10 do ciclo vital até à totalidade da vida do organismo (APRANGUE, 1973; RAND, 1980; RAND & PETROCELI, 1985).

De modo geral, porém, não exclusivo, esses efeitos são sub-letais e observados em situações em que as concentrações do agente tóxico, às quais ficam expostos os organismos, permitem sua sobrevivência, mas afetam uma ou várias de suas funções biológicas, interferindo, por exemplo, na reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e comportamento em geral.

No ambiente aquático, observam-se os efeitos crônicos, quando os efluentes industriais “tratados” são lançados continuamente nos corpos receptores. Dessa forma, os organismos se expõem a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo (STEPHAN & MOUNT, 1973), ocasionando efeitos crônicos a níveis sub-letais e até mesmo letais ao longo do tempo.

### 5.3 TESTE PRELIMINAR

Normalmente, um teste de toxicidade é antecedido por um teste preliminar, feito nas mesmas condições, porém com concentrações estabelecidas com limites de grande amplitude. Assim é possível determinar o intervalo de concentrações, delimitado pela menor concentração que causa imobilidade ou mortalidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não ocorre efeito algum. Este intervalo, por sua vez, é utilizado na elaboração do teste definitivo.

### 5.4 TESTE DEFINITIVO

Com o intervalo de concentrações estabelecido no teste preliminar, prepara-se uma série de concentrações intermediárias em progressão geométrica, nas quais são expostos os organismos representantes do ambiente aquático. O tempo de exposição é determinado pelo tipo do teste (agudo ou crônico) e pelo método adotado.

### 5.5 PRINCIPAIS MÉTODOS PADRONIZADOS DISPONÍVEIS

Dentre as principais metodologias padronizadas, aplicadas e aceitas a nível nacional destacam-se as:

#### **Normas da CETESB:**

- L5.018 - Teste de toxicidade aguda com Daphnia similis *Claus, 1879* (Cladocera, Crustacea).
- L5.019 - Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I - Sistema Estático.
- L5.019 - Parte II - Sistema Semi-Estático.
- L5.019 - Parte III - Sistema de Fluxo Contínuo.
- L5.020 - Teste de toxicidade com Chlorella vulgaris (Chlorophyceae).
- L5.022 - Avaliação de toxicidade crônica, utilizando Ceriodaphnia dubia *Richard, 1894* (Cladocera, Crustacea).
- L5.227 - Bioensaio de toxicidade aguda com Photobacterium phosphoreum (Sistema Microtox).
- L5.228 - Teste de toxicidade aguda utilizando Spirillum volutans,
- L5.250 - Água do Mar - Teste de Toxicidade Crônica de Curta Duração com Lytechinus variegatus *Lamarck, 1816* (Echinodermata, Echinoidea).

- L5.251 - Água do Mar - Teste de Toxicidade Aguda com Mysidopsis juniae Silva, 1979 (Mysidacea, Crustacea).

#### **Normas da ABNT:**

- NBR 12713 - Água - Ensaio de Toxicidade Aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea).
- NBR 12714 - Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte I - Sistema estático.
- NBR 12715 - Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte II - Sistema semi-estático.
- NBR 12716 - Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte III - Sistema de fluxo contínuo.
- NBR 12648 - Ensaio de toxicidade com Chlorella vulgaris (Chlorophyceae).

A leitura dessas normas deve permitir o entendimento necessário à execução dos testes, dentro das condições de controle que garantam a validade dos resultados. Leituras ou consultas complementares são indicadas nessas normas para orientar o executor do teste, quanto aos procedimentos padronizados.

### **5.6 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS : ESCOLHA DOS TESTES APROPRIADOS**

Para efeito de controle, o fundamental é conhecer a toxicidade do efluente final, isto é, do efluente que é despejado no ambiente, independentemente de ser ou não tratado. Por várias razões, pode ser necessário conhecer a toxicidade do efluente antes e após o tratamento, mas as ações de controle deverão se basear em resultados obtidos das amostras do efluente final.

Para conhecer a toxicidade de um efluente, basta se coletar amostra(s) representativa(s) dos processos industriais e submetê-las a testes de toxicidade a nível agudo e/ou crônico, de acordo com as normas e procedimentos já citados.

Usualmente, utiliza-se primeiro um teste de toxicidade aguda, que é mais rápido e no qual devem-se utilizar espécies sensíveis. Em geral, se o efluente apresenta toxicidade aguda, essa informação já pode ser considerada suficiente para dar início às ações de controle.

É recomendável, sempre que possível, a obtenção de um maior número de informações sobre a toxicidade do efluente, submetendo-o a testes de toxicidade com diferentes organismos (microcrustáceos, peixes, algas, bactérias etc.), possibilitando assim, uma melhor caracterização do grau de toxicidade do efluente, corpo receptor ou amostra, em geral.

O grau de toxicidade pode ainda ser melhor caracterizado se, após a obtenção dos resultados dos testes de toxicidade aguda, for também utilizado os testes de toxicidade crônica, cujos resultados permitem a geração de dados definitivos, referentes ao potencial de impacto dos efluentes sobre o corpo d'água.

Os Testes de Toxicidade Crônica são também utilizados sempre que os testes de toxicidade aguda apresentarem resultados insuficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável, isto é, para detectar ausência ou indícios de toxicidade aguda.

Dependendo do objetivo do trabalho a ser realizado, o conhecimento da toxicidade do efluente pode ser obtido através de métodos alternativos, também padronizados. É o que se dá, por exemplo, quando se pretende selecionar efluentes (*screening*), ou quando a partir do conhecimento prévio de sua toxicidade, se quer realizar um estudo sobre sua variação qualitativa ao longo do tempo. Para essas finalidades, são indicados o teste com Daphnia similis com 24 horas de exposição, e/ou os testes bacterianos com Photobacterium phosphoreum (*Sistema microtox*) e Spirillum volutans, em função da rapidez de resultados e da capacidade laboratorial aumentada.

Em trabalhos rotineiros de monitoramento e controle de efluentes, esses métodos, mais rápidos, podem ser utilizados, desde que estudos prévios demonstrem uma relação quantitativa entre os resultados de testes já utilizados, para o estabelecimento da toxicidade permissível.

Os testes de toxicidade, principalmente os crônicos, podem ser utilizados, ainda, quando se deseja avaliar prováveis efeitos causados por efluentes em águas receptoras, à jusante dos lançamentos pontuais.



## 5.7 PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS E MATERIAIS EMPREGADOS

- Autoclave;
- Balança Analítica;
- Bico de Bunsen;
- Bomba de Vácuo;
- Câmara de Fluxo Laminar;
- Câmara de Germinação com Fotoperíodo;
- Câmara de Neubauer;
- Centrífuga;
- Compressor para Aeração;
- Condutivímetro;
- Deionizador;
- Destilador;
- Espectrofotômetro;
- Estufa Esterilizadora;
- Geladeira;
- Lupa Esterioscópica;
- Luxímetro;
- Medidor de O.D.;
- Microscópio;
- Termômetros, entre outros.

Dentre as vidrarias, destacam-se:

- Aquários;
- Balões Volumétricos;
- Béqueres;
- Cristalizadores;
- Frascos Mariotti;
- Pipetas;
- Tubos de ensaio, entre outras.

## 5.8 TESTES DE TOXICIDADE COM *Daphnia similis*

Este método consiste na exposição de indivíduos jovens de *Daphnia similis* a várias concentrações do agente tóxico, por um período de 24 a 48 horas, nas condições prescritas na norma ( NBR 12713 ). Tal procedimento permite determinar a CE(L)50, 24 ou 48 h. do agente tóxico a ser testado.

A água de diluição pode ser natural, isenta de contaminantes e/ou reconstituída com uma dureza total de 40 a 48 mg/l de CaCO<sub>3</sub> , pH 7,2 a 7,6 e condutividade de aproximadamente 160 µS/cm. O controle de qualidade de cada lote de água é realizado através de um ensaio de viabilidade, onde uma determinada população de organismos-teste é exposta à água de diluição, nas condições de teste. O lote de água de diluição é aceitável para uso se a taxa de imobilidade e/ou mortalidade não for superior a 10%, durante um período de 48h.

Os organismos-teste, jovens de *Daphnia similis*, são capturados em culturas previamente selecionadas, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de ponta arredondada, com 2 mm de diâmetro. Os mesmos são colocados em outro cristalizador, limpo e com a mesma água de diluição que será empregada no preparo das concentrações que serão testadas. Devem ser utilizados neonatas de 6 a 24 horas de idade, por ser considerada uma fase de grande sensibilidade nesta espécie.

Simultaneamente ao ensaio com o agente tóxico, é feito um teste de sensibilidade dos organismos-teste. A sensibilidade dos organismos-teste é avaliada através da determinação da CE50, 48 horas, ao dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), que é a substância de referência comumente utilizada para esta espécie. Sendo que o método é o mesmo utilizado na determinação da CE50 da amostra-teste. A faixa aceitável da CE50 ao K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> para *Daphnia similis* é de 0,04 a 0,17 mg/l, conforme a metodologia.

Antes do preparo da amostra, é necessário ter o conhecimento das características físicas, químicas e biológicas, bem como a sua periculosidade, a fim de se tomar os cuidados necessários no manuseio da mesma, além de contribuir na interpretação dos resultados.

Logo que as amostras dão entrada no laboratório, são registrados os teores de oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza total, nas respectivas fichas de controle (fig.2). Estes dados também contribuem para a interpretação dos resultados.



Figura 2. Análises físico-químicas.

As soluções estoque são preparadas pouco antes do início do teste, em balões volumétricos (fig.3), utilizando-se também de pipetas volumétricas e automáticas de diversos volumes. Logo após, inicia-se o preparo das soluções-teste, concentrações estas que são diluídas em tubos de ensaio de 10 ml, a partir das concentrações estoque.



Figura 3. Preparo de soluções-estoque.

No teste definitivo, a maior concentração deve ser a menor concentração que causou efeito (imobilidade) aos organismos no teste preliminar. A partir dessa concentração, escolhe-se 5 ou 6 concentrações intermediárias decrescentes em escala logarítmica. Para cada concentração são preparadas 4 réplicas, sendo que para cada réplica são adicionados 5 organismos, totalizando um número de 20 organismos por concentração-teste.

Após a conclusão da montagem do teste, anota-se o horário de início na ficha de teste e coloca-se em ambiente escuro, a uma temperatura de  $20 \pm 2$  °C, sem alimentação, por um período de 24 ou 48 horas (fig.4).



Figura 4. Câmara de testes.

Ao término das 24 ou 48 horas de exposição, é feita uma contagem dos organismos imobilizados e/ou mortos em cada concentração e são registrados os teores finais de Oxigênio Dissolvido (O.D.) e potencial hidrogeniônico (pH). Com os dados obtidos no ensaio definitivo, determina-se a CE(L)50 24 ou 48 horas e seu intervalo de confiança através de métodos estatísticos apropriados.

### 5.9 TESTE DE TOXICIDADE COM *Ceriodaphnia dubia*

Este método consiste na exposição de indivíduos jovens do gênero *Ceriodaphnia* a várias concentrações do agente tóxico, por um período de 7 dias, nas condições prescritas na norma ( CETESB - L5.022 ). No final do período de exposição, determina-se o número médio de jovens produzidos por fêmea e o número de fêmeas adultas sobreviventes. Com estes dados, pode-se calcular a CENO, CEO e a ICp do agente tóxico em estudo.

No teste são utilizadas *Ceriodaphnias* jovens, de no máximo 24 horas de idade, tendo todas nascidas dentro de um período de 8 horas e obtidas a partir de culturas mantidas em condições laboratoriais padronizadas.

A água de diluição pode ser natural superficial ou subterrânea, filtrada em rede de plâncton com 30 ou 45  $\mu\text{m}$ , isenta de contaminantes de qualidade constante. O controle de qualidade de cada lote de água é realizado através de um ensaio de viabilidade, onde uma determinada população de organismos-teste é exposta à água de diluição, nas condições de teste. O lote de água de diluição é aceitável para uso se a taxa de imobilidade e/ou mortalidade não for superior a 10% durante um período de 48 horas.

Os organismos-teste são obtidos a partir de fêmeas ovígeras, mantidas em culturas previamente selecionadas, capturados com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta arredondada, de aproximadamente 2 mm de diâmetro. Os jovens coletados são mantidos em um cristalizador, limpo e com a mesma água de diluição que será utilizada no preparo das soluções-teste à temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e devem ser utilizados no teste, dentro de um período máximo de 24 horas.

Periodicamente, a sensibilidade dos organismos-teste é avaliada através de um teste de toxicidade aguda com a substância de referência, cloreto de sódio ( NaCl ). Sendo que o método é o mesmo que o empregado para determinação da CE50 ( CETESB - L5. 018 ). O valor da CE50; 48 horas. aceitável pela norma deve estar compreendido em um intervalo de  $\pm 2\delta$  (  $\delta$  = desvio-padrão) em relação aos valores médios obtidos anteriormente.

Antes do preparo da amostra, é necessário ter o conhecimento das características físicas, químicas e biológicas, bem como a sua periculosidade, a fim de se tomar os cuidados necessários no manuseio da mesma, além de contribuir na interpretação dos resultados.

Logo que as amostras dão entrada no laboratório, são registrados os teores de oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza total, nas respectivas fichas de controle. Estes dados também contribuem na interpretação dos resultados.

As soluções estoque são preparadas pouco antes do início do teste, adicionando-se quantidades conhecidas do agente tóxico em volumes definidos de água de diluição, em balões volumétricos, utilizando-se também de pipetas volumétricas e automáticas de diversos volumes. Logo após, inicia-se o preparo das soluções-teste, concentrações estas que são diluídas em béqueres de 30 mL, a partir das soluções estoque.

No teste definitivo, a maior concentração deve ser a menor concentração que causou efeito (imobilidade) aos organismos no teste preliminar. A partir dessa concentração escolhem-se 5 ou 6 concentrações intermediárias decrescentes em escala logarítmica. Para cada concentração, são preparadas 10 réplicas, sendo que para cada réplica é adicionado 1 organismo, totalizando um número de 10 organismos por concentração-teste.

Iniciar o experimento, colocando um organismo jovem, em cada béquer, contendo as respectivas soluções-teste e com alimento. A hora do início do experimento deve ser anotada no formulário controle e os frascos- teste devem ser mantidos à temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , com o fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuridão. Os organismos devem ser alimentados diariamente com o mesmo tipo de alimento e com a mesma quantidade que é empregada na manutenção das culturas.

As soluções-teste são renovadas no terceiro e quinto dia após o início do teste. A cada troca de solução, transfere-se o organismo para a nova solução com alimento. Anota-se o número de neonatas produzidos em cada réplica, de cada concentração, em formulário específico. Realizam-se as análises físico-químicas das soluções novas e das substituídas em cada troca.

O teste deve ser encerrado quando 60%, ou mais, das fêmeas adultas sobreviventes no controle tiverem produzido sua terceira geração ou, aproximadamente, 7 dias. Após o término do teste, deve-se determinar o número de jovens produzidos por concentração. Calcula-se o número médio de jovens produzidos por fêmea adulta. Esse valor proporciona uma medida combinada do efeito do agente tóxico na sobrevivência e na reprodução.

Para a análise estatística dos dados, recomendam-se os métodos estatísticos descritos em U.S.E.P.A. /600/4 - 89/001. Através desta análise estatística, determinam-se o CENO e a CEO. Pode-se determinar, também, o valor crônico ( V C ), que é a média geométrica da CENO e da CEO e ainda mais recentemente o ICp.

#### **5.10 TESTE DE TOXICIDADE COM *Lytechinus variegatus***

Este método consiste na exposição de ovos fecundados de ouriços-do-mar (Fig.3)

( *Lytechinus variegatus* ) a várias concentrações de um agente tóxico, durante a totalidade do período de desenvolvimento embrionário, que é de 24 a 28 horas, nas condições prescritas na norma ( CETESB - L5.250 ). Tal procedimento permite a determinação da CEO, CENO e ICp do agente tóxico testado, durante o período de exposição.

Antes do preparo da amostra, é necessário ter o conhecimento das características físicas, químicas e biológicas, bem como a sua periculosidade, a fim de se tomar os cuidados necessários no manuseio da mesma, além de contribuir na interpretação dos resultados.

Logo que as amostras dão entrada no laboratório, são registrados os teores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, nas respectivas fichas de controle. Estes dados contribuem para interpretação dos resultados.

A água de diluição, empregada na realização do teste, é preparada a partir de uma água do mar natural, isenta de contaminantes, à salinidade de  $33,5 \pm 1,5 \text{ ‰}$ , filtrada através de filtros específicos.

Para a obtenção dos gametas são necessários 6 ouriços-do-mar, 3 de cada sexo, que são coletados através de mergulho em áreas não contaminadas e em seguida transportados para o laboratório, em condições apropriadas. Como estes organismos não apresentam dimorfismo sexual externo, é feita uma triagem dos mesmos através de injeção de cloreto de potássio (KCl), que estimula a liberação dos gametas. Atualmente, esta triagem é realizada por meio de choque elétrico, minimizando o “stress” nos organismos (fig.5).



Figura 5. Obtenção de gametas através de equipamento elétrico.

A sensibilidade dos organismos-teste deve ser avaliada com uma substância de referência ( sulfato de zinco ) em paralelo ao ensaio com a amostra a ser testada. Para a análise do resultado do teste com a substância de referência, calcula-se a CE50; 24 a 28 horas. Este cálculo pode ser realizado através do método estatístico “ trimmed Spearman-Kärber “ ( Hamilton et alii, 1977).

Para testes com efluentes industriais, geralmente é necessário o ajuste da sua salinidade para  $33,5 \pm 1,5 \text{ ‰}$ . Este ajuste é realizado por meio de acréscimo de quantidade conhecida de salmoura, preparada por congelamento da água do mar. Após o descongelamento, retém-se a fração inicial fundida, que possui um elevado teor de sais. Para calcular a quantidade de salmoura desejada, utiliza-se a fórmula sugerida por Salomão (1978), de acordo com a norma.

São selecionadas 5 ou 6 concentrações do agente tóxico, além do controle. No teste definitivo, a maior concentração deve ser a menor concentração que causou efeito (reprodução e mortalidade) aos organismos no teste preliminar. A partir dessa concentração, escolhem-se 5 ou 6 concentrações intermediárias, decrescentes em escala logarítmica.

As soluções estoque são preparadas em balões volumétricos, utilizando-se também pipetas volumétricas e automáticas, de diversos volumes. Logo após, inicia-se o preparo das soluções-teste, concentrações estas que são diluídas em tubos de ensaios, a partir das concentrações estoque. Para cada concentração, são preparadas 4 réplicas com volume de 10 ml e 10 réplicas para o controle, 5 das quais serão utilizadas para se determinar o momento de encerramento do experimento e para as medições de salinidade, oxigênio dissolvido e pH.

Os óvulos, identificados pela coloração amarelada, são coletados em um béquer de 400 ml. cheios com água de diluição à temperatura de teste (  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ), com a superfície aboral voltada para baixo, de forma que os gonóporos fiquem imersos na água. Já os espermatozoides, identificados pela cor branca, devem ser coletados através de uma pipeta Pasteur de ponta fina, diretamente dos poros genitais e colocados em um béquer de 30 ml, evitando-se o contato com a água do mar.

Após a obtenção dos gametas, é efetuada uma verificação da viabilidade dos óvulos; os mesmos devem ser redondos, lisos e de tamanho regular, enquanto os espermatozoides são preservados sob refrigeração. Confirmada a viabilidade dos óvulos, efetua-se a fecundação artificial, homogeneizando-se os gametas. Aguarda-se aproximadamente 10 minutos e efetua-se a contagem do número de óvulos fecundados, identificáveis pela membrana de fecundação à sua volta; deve haver, no mínimo, 80% de ovos fecundados. Em seguida, calcula-se o volume da solução de ovos fecundados a ser colocada no teste, sendo que este volume calculado deve conter aproximadamente 300 ovos, de acordo com a norma. O volume calculado será acrescentado aos recipientes teste, quando decorridos 30 minutos desde o início do processo de fecundação; esse volume não deve exceder 100 $\mu$ l.

Após a conclusão da montagem do teste, anota-se o horário de início na ficha de teste e coloca-se na câmara de germinação, a uma temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  , por um período de 24 a 28 horas, nas condições prescritas na norma técnica ( CETESB - L5.250 ). Decorridos 24 horas do início do experimento, analisa-se uma subamostra, de uma das 10 réplicas do controle, ao microscópio e verifica-se o estágio de desenvolvimento de, no mínimo, 50 embriões. Encerra-se o experimento quando, pelo menos, 80% dos embriões tiverem atingido o estágio larval de equinopluteus bem desenvolvido. Caso ainda não esteja nesse estágio de desenvolvimento, efetuar novas leituras nas outras réplicas do controle, de hora em hora, até que se atinja o estágio de desenvolvimento.

Atingido o estágio de equinopluteus , anota-se o horário de encerramento na ficha de teste. O conteúdo de cada tubo deve ser então transferido para um frasco correspondente, de 11 ml, contendo 0,5 ml de formol tamponado com bórax. Cada frasco deve ser imediatamente tampado e agitado, para preservação dos organismos.

Durante a leitura do teste, deve-se analisar uma subamostra de cada frasco ao microscópio, em uma câmara de contagem ( Sedgwick-Rafter ou similar ), verificando-se o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos contados, anotando os dados da leitura na ficha correspondente.



Após a leitura dos resultados efetua-se a análise estatística dos resultados, obtendo-se a CENO , CEO e a ICp de acordo com método estatístico empregado. Para efeito dos cálculos estatísticos , tanto o retardamento como a ocorrência de anomalias são consideradas como efeitos, devendo-se somar, em cada concentração, o total de embriões afetados.

## **6. ORGANISMOS - TESTE**

Várias espécies de organismos vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos em diversos agentes tóxicos e corpos receptores. Dentre os principais grupos de organismos, utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias. Representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos.

Para a escolha do organismo-teste geralmente usam-se os seguintes critérios de seleção:

- \* Significativa representação ecológica dentro das biocenoses;
- \* Cosmopolização da espécie;
- \* Conhecimento da biologia, fisiologia e hábitos alimentares;
- \* Estabilidade genética e uniformidade das populações;
- \* Baixo índice de sazonalidade;
- \* Sensibilidade constante e apurada ;
- \* Tipo de experimento.

Sabe-se no entanto, que não existe uma única espécie de organismo-teste que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Por esse motivo deve-se empregar no mínimo três espécies de diferentes níveis da cadeia alimentar, a fim de se obter resultados mais precisos .

## 6.1 BIOLOGIA, COLETA E MANUTENÇÃO

O conhecimento da biologia, cultivo e manutenção de organismos em laboratório, constituem-se nos aspectos fundamentais para a execução, interpretação e confiabilidade dos resultados de um teste de toxicidade. Assim, é necessário dispor de técnicos treinados e profissionais especializados para desenvolver essas atividades.

A abordagem que segue, refere-se exclusivamente às espécies de organismos empregadas rotineiramente no Laboratório de Ecotoxicologia.

### 6.1.1 MICROCRUSTÁCEOS ( *Daphnia* & *Ceriodaphnia* )

Representantes das diversas Classes do Filo Crustacea, são amplamente empregados como bioindicadores em trabalhos ecotoxicológicos, principalmente devido ao grande conhecimento que se tem disponível sobre a biologia e fisiologia da maioria das espécies envolvidas, facilidade de coleta e manutenção em laboratório, entre outras características relevantes que os enquadram facilmente dentro dos critérios de seleção ( item 6. ).

A Classe Branchiopoda é representada por pequenos crustáceos de água doce e contando com poucos representantes marinhos; o nome Branchiopoda significa “ pés branquiais “ . Nesses apêndices do tronco, além das trocas gasosas, ocorre também a filtração de pequenas partículas que servem de alimento, sendo desta forma, diretamente afetados pela contaminação ambiental.

As cerca de 800 espécies descritas de Branchiopoda pertencem a quatro grupos distintos e os membros dos dois grupos que constituem a Ordem Diplostraca, principalmente as “ pulgas d’água “; representantes da Subordem Cladocera, são lateralmente comprimidos e o corpo encontra-se fechado dentro de uma carapaça bivalve quitinosa. Os Cladoceras constituem a metade dos Branquiópodos e incluem muitas espécies cosmopolitas e comuns, tais como as que pertencem ao Gênero *Daphnia* e *Ceriodaphnia*.

As “ pulgas d’água “, tanto as *Daphnia* (fig.6), como as *Ceriodaphnia*, são comumente encontradas em lagos e represas de águas continentais. Medem cerca de 0,1 a 5,0 mm de comprimento e possuem uma carapaça transparente bivalve. Em condições naturais, alimentam-se basicamente de algas, bactérias, protozoários e de uma grande variedade de detritos orgânicos, os quais são capturados através de seu sistema de filtração. Por meio de vários mecanismos complexos, as partículas alimentares coletadas são transferidas para um sulco alimentar meio-ventral, onde são envolvidas em muco e depois movidas para frente até as maxilas, que empurram o alimento para o interior da boca.

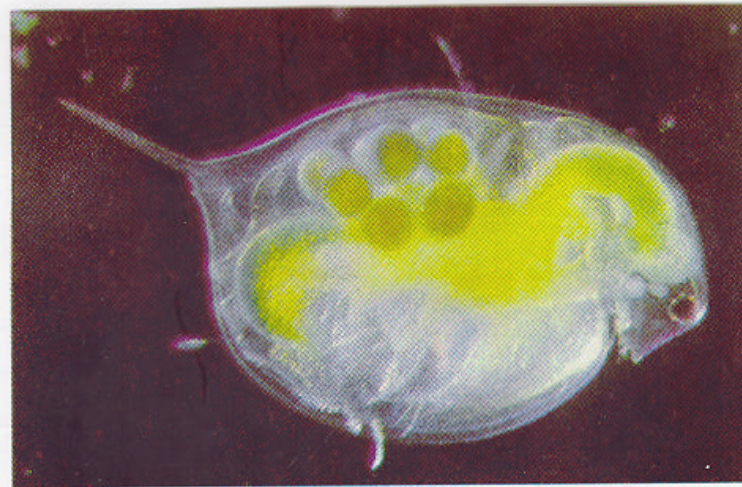


Figura 6. Daphnia.

A locomoção das “pulgas d’água” é efetuada principalmente através das segundas antenas birremes que funcionam como se fossem remos. O movimento é predominantemente vertical e aos pulos, justificando a denominação popular.

Os olhos compostos e sésseis encontram-se fundidos em um único olho mediano rotacionável e é utilizado para orientar o animal na natação.

As trocas gasosas são efetuadas por estruturas especializadas, situadas nos apêndices do tronco, denominadas brânquias. A presença da hemoglobina depende frequentemente da concentração de oxigênio existente no meio, de forma que os animais tornam-se incolores em águas bem aeradas e alaranjados em águas estagnadas.

O coração dos cladóceros é um pequeno saco globular, com somente um par de óstios, o qual repousa dorsalmente na parte anterior do tronco. O sistema arterial restringe-se a uma curta aorta anterior não ramificada.

Sua reprodução, em condições normais, ocorre por partenogênese, ou seja, assexuadamente, como em muitos rotíferos. Os ovos diplóides partenogênicos eclodem dando origem a fêmeas, podendo uma única fêmea produzir uma sucessão de gerações. O desenvolvimento é direto e o jovem (neonata), deixa a câmara incubadora e passa a viver independentemente.

Porém, quando as condições se tornam desfavoráveis (tais como alterações de temperatura, escassez de alimento, superpopulação, entre outros fatores), provocam o aparecimento de machos. Com o surgimento de machos, ocorre a reprodução sexuada, originando um ovo de resistência chamado efípio. Os efípios flutuam, afundam ou aderem a objetos, podendo suportar o ressecamento, o congelamento e até, as enzimas digestivas. Conseqüentemente, os ovos eclodem rapidamente quando encontram as condições ideais, dando origem a uma fêmea que reinicia o ciclo partenogênético. Por meio destes ovos ocorre a dispersão e a perpetuação dessas espécies.

### 6.1.2 Coleta e Manutenção (*Daphnia* & *Ceriodaphnia*)

As “pulgas d’água” são geralmente coletadas através de redes de plâncton com dimensões específicas, variáveis de acordo com o tamanho de cada espécie (250 a 500  $\mu\text{m}$ ). Atualmente, aqui e em vários países, laboratórios especializados como o da CETESB em S.P., entre outros, comercializam lotes de organismos-teste e serviços ligados ao treinamento e desenvolvimento desta tecnologia.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para o cultivo de *Daphnia spp.*, sendo que a descrita a seguir tem sido utilizada para *Daphnia similis*, com o objetivo de obter-se neonatas para serem empregados em testes de toxicidade.

Os organismos são mantidos em cristalizadores, ou cubas similares, com capacidade de 4 litros, onde se adicionam aproximadamente de 80 a 100 organismos em 3 litros de água natural de boa qualidade, corrigida e isenta de contaminação. Essa água deve ser de um manancial previamente testado e aprovado, filtrada em rede de plâncton com malha de 30 a 45  $\mu\text{m}$ , pH próximo da neutralidade e a dureza total deve ser em torno de 40 a 48 mg/l de  $\text{CaCO}_3$ .

A sala de manutenção das culturas deve ser limpa, isenta de poeiras e vapores tóxicos, possuir sistema de condicionamento do ar e controle de temperatura, que deve ser de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ . As culturas são mantidas em câmaras de germinação (FANEM - Mod.347 CDG / fig.7), com a temperatura citada e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, a uma intensidade luminosa de, aproximadamente, 1000 lux.



Figura 7. Câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo controláveis.

Os organismos são alimentados diariamente, no mesmo horário de preferência , com uma suspensão algácea de *Selenastrum capricornutum* de concentração previamente estabelecida, através de quantificação em câmaras de contagem específicas. Cada organismo deve receber, por dia , aproximadamente  $2 \times 10^5$  células de algas como alimento (fig. 8). Podem ser empregadas outras espécies de algas como alimento, sendo que para cada espécie, a concentração é variável de acordo com a massa celular e valor nutritivo.

Semanalmente, as culturas são transferidas para outros cristalizadores limpos e com novo lote de água de manutenção. Diariamente é feito o controle populacional e depois, filtra-se a água das culturas, de acordo com a necessidade, a fim de se retirar carapaças e excretas, além de propiciar uma certa aeração (fig. 8).



Figura 8. Alimentação e manutenção de culturas.

Todos os dados de controle de temperatura, pH, dureza, condutividade e oxigênio dissolvido, de cada lote de água de manutenção das culturas, bem como informações sobre a manutenção e eventuais ocorrências, devem ser registrados em suas respectivas fichas de controle.

### 6.1.3 Ouriços-do-Mar (*Lytechinus* & *Echinometra*)

Os representantes do Filo Echinodermata, principalmente os membros da Classe Echinoidea (ouriços-do-mar), também são amplamente utilizados em testes de toxicidade em todo mundo, devido aos mesmos fatores citados anteriormente no item 6.

Os membros radiais ou regulares de equinóides, conhecidos como ouriços-do-mar, apresentam o corpo mais ou menos esférico e encontra-se armado com espinhos móveis relativamente longos. Podem ser marrons, negros, roxos, verdes, brancos ou vermelhos e alguns são multicoloridos. A maioria possui de 6 a 12 cm de diâmetro, mas algumas espécies do Indo-Pacífico podem atingir até 36 cm de diâmetro.

O corpo do ouriço-do-mar pode ser dividido em um hemisfério aboral e um oral, com as partes dispostas ao redor de um eixo polar.

No pólo oral encontra-se a boca, que está voltada para o substrato. A boca é circundada por uma membrana peristomial, que possui várias estruturas diferentes, dispostas de modo radial. Existem cinco pares de curtos pés ambulacrais e cinco pares de brânquias. Além dos pés ambulacrais bucais e das brânquias, a área ao redor do perístomo porta pequenos espinhos e pedicelárias, que são pequenas pinças que auxiliam na limpeza e captura de alimento.

No pólo aboral, encontra-se a região anal, conhecida como periprocto. O periprocto é constituído por uma pequena membrana circular com o ânus ao centro e um número variável de placas incrustadas, de acordo com a espécie.

A superfície corporal globosa é dividida em dez secções radiais, que convergem nos pólos oral e aboral. Cinco secções apresentam pés ambulacrais e são denominadas áreas ambulacrais. As áreas ambulacrais são alternadas com secções, sem pés ambulacrais, chamadas de regiões interambulacrais.

As placas esqueléticas são dispostas em fileiras que correm do pólo oral para o pólo aboral. Cada área ambulacral é composta de duas fileiras de placas ambulacrais e cada área interambulacral é composta de duas fileiras de placas interambulacrais. Consequentemente, existem 20 fileiras de placas, 10 ambulacrais e 10 interambulacrais. As placas ambulacrais são perfuradas por pequenos orifícios, que formam canais que conectam as ampolas internas com os pés ambulacrários externos.

Ao redor do periprocto, encontra-se uma série de placas, que consistem de cinco grandes placas genitais e cinco placas oculares menores. As placas genitais, cada uma portando um gonóporo, alinham-se com as placas oculares, que coincidem com as áreas ambulacrais.

Os espinhos móveis, que são característicos dos ouriços-do-mar, arranjam-se mais ou menos simetricamente nas áreas ambulacrais e interambulacrais. Os espinhos são mais longos ao redor do equador e mais curtos nos pólos. A maioria dos ouriços-do-mar possui espinhos longos (primários) e curtos (secundários), com os dois tipos sendo mais ou menos distribuídos sobre a superfície corporal. Os espinhos são geralmente cilíndricos e afilados na ponta.

A locomoção dos ouriços-do-mar é efetuada através dos pés ambulacrais e os espinhos podem ser utilizados para empurrar e levar a superfície oral para fora do substrato. Os ouriços-do-mar podem mover-se em qualquer direção e está relacionado intimamente com a atividade alimentar.

Algumas espécies como *Echinometra lucunter* (fig.9) são capazes de escavar buracos (locas) em rochas e outros materiais firmes. A perfuração é realizada pela ação raspadora do aparato mastigador. Este comportamento perfurador parece ser uma adaptação ao excessivo embate de ondas e essas espécies são predominantes em habitats expostos a águas turbulentas.

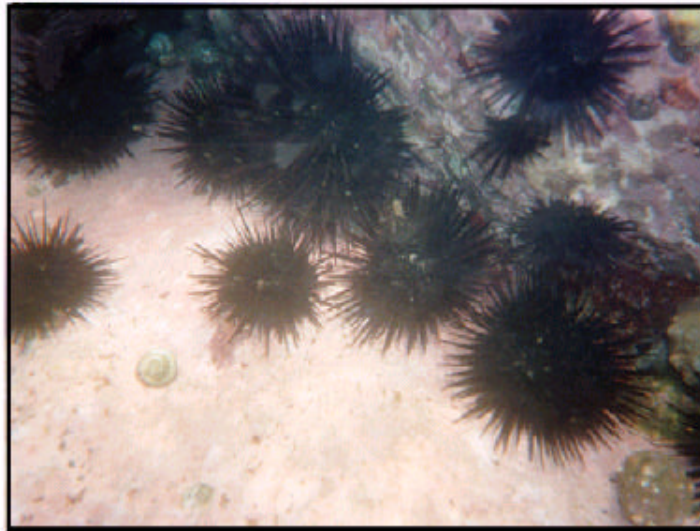


Figura 9. *Echinometra lucunter*

Os ouriços-do-mar alimentam-se através de um aparato raspador altamente desenvolvido, denominado lanterna de Aristóteles. O aparelho é composto de cinco grandes placas calcárias, chamadas de pirâmides, que são dispostas radialmente. Na extremidade oral da pirâmide, encontram-se cinco dentes pontiagudos, extremamente duros. Por meio de músculos especiais, a lanterna pode protrair-se e retrair-se parcialmente através da boca. Outros músculos controlam os dentes, que podem ser abertos e fechados.

A maioria dos ouriços-do-mar são rastejadores, que raspam com seus dentes a superfície do substrato. Embora as algas constituam, geralmente, o alimento mais importante, a maioria das espécies incluem uma grande variedade de material vegetal e animal em suas dietas.

No interior da lanterna de Aristóteles, encontra-se uma cavidade bucal e uma faringe que sobe pelo aparelho, conectando-se a um esôfago e posteriormente ao estômago, que faz uma volta completa pelo interior do animal, até encontrar-se com o intestino que sobe para encontrar-se ao reto, que se esvazia através do ânus dentro da região periproctal.

Os predadores dos ouriços-do-mar incluem as lontras marinhas, algumas espécies de peixes, determinados gastrópodos e as estrelas-do-mar. Os ovos dos ouriços-do-mar também são usados como alimento por humanos em várias partes do mundo, especialmente no Japão.

O fluido celômico é o principal meio circulatório e todos os pés ambulacrais contribuem para a troca gasosa. Na maioria das espécies, os pés ambulacrais, próximos à região aboral, modificam-se de várias maneiras para essa função.



O sistema nervoso é composto de um anel circum-oral, que envolve a faringe no interior da lanterna; o nervo radial passa entre as pirâmides da lanterna e corre ao longo do lado inferior da concha. As numerosas células sensoriais no epitélio, particularmente nos espinhos, pedicelárias e pés ambulacrais, constituem a parte principal do sistema sensorial dos equinóides.

Geralmente os ouriços-do-mar são negativamente fototrópicos e muitos tendem a procurar fendas nas rochas. Algumas espécies, tais como *Lytechinus variegatus* (fig.10), recobrem-se com fragmentos de conchas e outros objetos, utilizando os pés ambulacrais.



Figura 10. *Lytechinus variegatus*.

Todos os equinóides regulares são dióicos e apresentam cinco gônadas suspensas ao longo dos interambulacros, no lado interno da concha. Um pequeno gonoduto estende-se aboralmente a partir de cada gônada e abre-se através de um gonópore localizado em uma das cinco placas genitais. Os espermatozóides e os óvulos são liberados na água marinha, onde ocorre a fertilização.

A clivagem é equivalente até o estágio de oito células, depois do qual os blastômeros no pólo vegetal proliferam e multiplicam-se, formando vários micrômeros. Segue-se uma blástula típica, sendo que esta se torna ciliada e livre natante dentro de um período aproximado de 12 horas, após a fertilização. A gastrulação é típica, mas é precedida por uma proliferação interior de células por parte dos micrômeros, que formam o mesênquima. A gástrula torna-se ligeiramente cônica e desenvolve-se gradualmente em uma larva planctônica, denominada equinoplúteo, que possui seis pares de longos braços larvais. O equinoplúteo nada e se alimenta por vários meses até o desenvolvimento do esqueleto, que o faz afundar gradativamente ao substrato, onde se fixa em locais abrigados.

#### 6.1.4 Coleta e Manutenção ( *Lytechinus* & *Echinometra* )

A coleta de ouriços-do mar é efetuada através de mergulho. Geralmente são encontrados no costão rochoso ou associado a formações rochosas e coralinas não muito profundas.

Os *Lytechinus variegatus* (fig.10) possuem uma coloração, que varia desde verde claro, até roxo e ocorrem principalmente em substratos areno-rochosos, onde são facilmente identificados por uma cobertura de conchas entre outros fragmentos que são capturados ao redor e armazenados na região aboral .

Já os *Echinometra lucunter* são negros ou amarronzados e sempre mais numerosos, ocorrendo em praticamente todo substrato rochoso, tanto no costão como em rochas e fendas.

Após a coleta, os organismos são triados, de acordo com a demanda necessária para a realização dos experimentos e, em seguida, são acondicionados em caixas com água do próprio local de coleta e imediatamente transportados para o laboratório.

No laboratório, os animais são transferidos para tanques e aquários, contendo água do mar em condições ideais (fig.11). São alimentados com macroalgas ( *Ulva lactuca* ), que também são coletadas no mesmo local de onde os animais foram colhidos.



Figura 11. Tanque de manutenção de ouriços-do-mar.

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Ao término de um teste de toxicidade, são obtidos diferentes níveis de um efeito tóxico pré-determinado, os quais estão em função das diferentes diluições do agente químico, empregadas no experimento. No entanto, é necessário dispor de métodos estatísticos para determinar um único valor, que represente o conjunto dos dados gerados. Normalmente, o valor obtido num teste de toxicidade aguda é a CE50 ou CL50 e, para os testes de toxicidade crônica e crônica de curta duração, determinam-se a CENO e a CEO. Pode-se determinar também o valor crônico (VC), que é a média geométrica da CENO e da CEO e mais recentemente a ICp, que é a concentração percentual de inibição.

O motivo da determinação da concentração efetiva ou letal a 50% dos organismos (CE50 ou CL50) deve-se à menor variabilidade na estimativa deste parâmetro, característico da população estudada. Assim sendo, após a exposição de organismos a uma determinada concentração do agente tóxico, espera-se que pelo menos a metade da população de indivíduos expostos (50%) responda de maneira quantitativamente idêntica.

No tratamento estatístico dos dados de um teste de toxicidade, os métodos mais utilizados requerem a transformação de porcentagens de efeito observado em probitos e, ainda, a transformação das concentrações do agente químico em logaritmos. Através destas transformações é possível ordenar os dados, de forma a localizá-los ao redor dos pontos mais significativos para cálculo da CE(L)50.

Além do cálculo da CE(L)50, é necessário medir o grau de dispersão do resultado obtido, em função dos resultados dos testes de toxicidade. Assim, com o estabelecimento dos limites de confiança da CE(L)50, assegura-se que a verdadeira CE(L)50 esteja compreendida num determinado intervalo de concentrações.

Para a análise estatística dos dados e obtenção da CENO e da CEO, a metodologia recomenda o teste de Dunnett (Weber *et alii*, 1988). Esse teste inclui uma análise de variância (ANOVA), seguido de uma comparação do número médio de organismos afetados em cada concentração, com o número médio do controle, o que indicará a existência de diferença estatisticamente significativa ( $P=0,05$ ) entre o número de organismos afetados nas diferentes concentrações e no controle.

Para cada experimento, deve-se adotar um método estatístico apropriado, sendo que os mais empregados atualmente são os que se encontram informatizados, devido à facilidade de utilização e obtenção de resultados confiáveis. Para testes agudos, utiliza-se frequentemente o método “trimmed Spearman Karber” (Hamilton *et alii*, 1977). Para os testes crônicos utiliza-se o programa estatístico TOXTAT, onde se encontram disponíveis alguns métodos paramétricos e não paramétricos, que são empregados de acordo com os dados obtidos no experimento.

## 8. APLICAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma vez conhecida a toxicidade do efluente, ou de uma amostra, é possível estimar sua carga tóxica. Desta maneira, pode-se estimar a contribuição de cada efluente ou amostra com relação ao corpo receptor respectivo. Essa avaliação constitui-se em um instrumento bastante útil para se estabelecer as prioridades de controle e, conseqüentemente, na adoção de estratégias e decisões quanto às ações de controle.

### 8.1 AVALIAÇÃO DA CARGA TÓXICA

A carga tóxica é calculada multiplicando-se a toxicidade do efluente, ou amostra, por sua vazão ou volume, respectivamente. No caso de efluentes, pode-se utilizar o dado máximo de vazão do projeto, buscando simular, assim, situações críticas de operação. Recomenda-se, porém, a utilização de dados médios de vazão.

Como os valores numéricos de toxicidade aguda e crônica, expressos em CE50, CL50, CENO e ICp, exprimem uma relação inversa, isto é, quanto menor este valor, maior é a toxicidade do efluente ou amostra testada. Para o cálculo da carga tóxica, esses valores são transformados em Unidades Tóxicas agudas (UTa) ou Unidades Tóxicas crônicas (UTc), através das seguintes fórmulas:

$$UTa = \frac{100}{CE(L) 50}$$

$$UTc = \frac{100}{CENO \text{ ou } ICp}$$

Desta forma, quanto maior o valor numérico da Unidade Tóxica, maior a toxicidade, de maneira direta e crescente. Expressando-se a toxicidade através desta relação direta, calcula-se a Carga Tóxica de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Carga Tóxica} = UT \times \text{Vazão do Efluente ou Volume da Amostra.}$$

\*Ou seja; Carga Tóxica é a quantidade de Unidades Tóxicas, contida em um efluente ou amostra, expressa em litros por segundos (UT l/s).

### 8.2 ESTIMATIVA DO POTENCIAL DE IMPACTO AMBIENTAL

A toxicidade de efluentes industriais, quando correlacionada com as condições dos corpos receptores, tem sido utilizada como ferramenta de trabalho para avaliação de impacto sobre os ecossistemas aquáticos. O uso conjunto de dados de toxicidade, vazão do efluente industrial e vazão do corpo receptor constitui um instrumento importante para o monitoramento, estabelecimento de padrões de lançamento, avaliação de impacto e preservação da vida aquática.

A nível de proteção ambiental e, portanto, em termos de ações de controle, essa é a informação mais importante de todo o processo de controle de agentes tóxicos em efluentes líquidos, pois é nessa etapa que se estima se o corpo receptor sofre impacto ou não, a que nível e se esse nível é aceitável ou não. A avaliação de impacto é estimada comparando-se a concentração de efeito tóxico, obtida através dos testes de toxicidade, com a concentração do efluente no corpo receptor, conforme a metodologia abaixo:

$$\text{Concentração do Efluente no Rio (CER)} = \frac{\text{Vazão do Efluente (QE l/s)}}{\text{QE} + \text{Q}_{7.10}} \times 100$$

Quando a  $Q_{7.10}$  (vazão mínima anual do rio, média de sete dias consecutivos, com probabilidade de dez anos de retorno) não se encontra disponível para um determinado corpo receptor, devem ser empregados os dados mínimos de vazão do respectivo corpo receptor.

### **8.3 REDUÇÃO DE TOXICIDADE**

Quando um efluente apresenta e transfere toxicidade ao corpo receptor, a fonte responsável deverá apresentar um plano de estudos e implantação de medidas corretivas, sendo que este programa deve ser avaliado e aprovado pelo órgão de controle ambiental, visando a redução da toxicidade a níveis permissíveis.

O plano deverá abordar medidas corretivas, tais como: alterações de matérias primas, utilização de produtos auxiliares, modificações no processo produtivo, bem como instalações e aprimoramento de sistemas de tratamento de águas residuárias.

Obviamente, estas medidas serão estabelecidas após amplo estudo, sob responsabilidade da fonte poluidora, para que se determine as causas da toxicidade. No entanto, mesmo após o tratamento, os efluentes podem apresentar toxicidade remanescente, a qual pode ser incompatível com a qualidade do corpo receptor e conseqüente preservação da vida aquática. Nesses casos, a toxicidade do efluente deve ser reduzida, aos níveis solicitados pelo órgão de controle, através da utilização apropriada da metodologia e do conhecimento técnico-científico disponível.

## **9. LEGISLAÇÃO PERTINENTE**

De acordo com a legislação de controle de poluição ambiental vigente, a qual regulamenta o lançamento de efluentes em corpos d’água, que são classificados conforme os usos preponderantes das águas superficiais.

A legislação estadual, regulamento da Lei número 997, de 31 de maio de 1976, aprovado pelo decreto número 8468, de 08 de setembro de 1976, artigo 7º- e a legislação federal, Resolução CONAMA 20/86, estabelecem, como uso preponderante, a preservação, bem como a proteção das comunidades aquáticas.

No artigo 18, inciso VIII, parágrafo 1º-, do decreto 8468, e 23 da resolução CONAMA número 20/86, está estabelecido que os efluentes, não obstante atender aos limites fixados para substâncias específicas, não podem transferir ao corpo receptor características em desacordo com o enquadramento do mesmo na classificação das águas.

A Resolução CONAMA 20/86, em seu artigo 12, reforça as argumentações ligadas à classificação dos corpos d’água, estabelecendo que as eventuais interações das substâncias específicas de um efluente, não poderão transferir às águas características capazes de causar efeitos letais ou alterações de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida.

Os testes de toxicidade são de grande importância na determinação dos efeitos adversos provocados às comunidades aquáticas, causados pela emissão de substâncias tóxicas complexas, sem a preocupação de identificá-las isoladamente.

A utilização de testes de toxicidade, no controle da poluição ambiental, oferece subsídios fundamentais para uma avaliação direta de um efluente industrial ou de uma determinada amostra de forma prática, econômica e eficiente. Para o enquadramento de um lançamento que cause toxicidade em um corpo receptor, deve-se levar em consideração, além dos artigos da legislação citada anteriormente, também os artigos 2º- e 3º-, inciso V, do Decreto número 8468/76, que proíbem a liberação de poluentes nas águas, que tornem ou possam tornar o meio aquático impróprio, nocivo à fauna e à flora.

## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Araújo, M.M.S.; Neto, R.D.C.; Nascimento, I. A. 1994. Biomonitoramento de Áreas Influenciadas por Atividades Petrolíferas : Utilização de Bioensaios com Espermatozoides do Ouriço *Echinometra lucunter*. Dep. de Biologia - UFBA.

- APHA, 1989. Standard Methods For Examination of Water And Wastewater. 17ª - Ed. AWWA/WPCF. Washington, USA.

- Barnes, R.D. & Ruppert, E.E. 1996. Zoologia dos Invertebrados. Editora Roca. 6ª - Edição. São Paulo.

- Bertolotti, E. 1989. Tratabilidade e Toxicidade de Efluentes Industriais. Revista Engenharia Sanitária, 28 (1) : 38-41. São Paulo.

- Bertolotti, E. 1990. Toxicidade e Concentração de Agentes Tóxicos em Efluentes Industriais. Revista Ciência e Cultura. 43 (3/4) : 271-277. São Paulo.

- Bertolotti, E., Gherardi-Goldstein, E., Zagatto, P.A. 1990. Variabilidade de Testes de Toxicidade com Peixes. Revista Ambiente, 3 (1) : 52-58. São Paulo.

- Bertolotti, E., Nipper, M.G., Magalhães, N.P. 1992. A Precisão de Testes de Toxicidade com *Daphnia*. Revista Ambiente, 6 (1) : 55-59. São Paulo.

- Cesar, A. 1990. Efluentes Líquidos da Refinaria Presidente Bernardes Cubatão - Caracterização, Tratamento Biológico e Introdução aos Bioensaios. UNICEB/RPBC. Monografia, 39p. Santos, São Paulo.

- Cesar, A.; Silva, S.L.R., Santos, A. R. 1993. Avaliação dos Efluentes Líquidos da Refinaria Presidente Bernardes - Cubatão, Através de Testes de Toxicidade. UNICEB, 82p. Santos, São Paulo.

- CETESB, 1983. Desenvolvimento de Métodos para o Estabelecimento de Critérios Ecotoxicológicos. Relatório Final, Vol. 1, 174p. São Paulo.

- CETESB, 1984. Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo. 134p. São Paulo.

- CETESB, 1986. Avaliação da Toxicidade das Águas, Sedimentos dos Rios e Efluentes Industriais da Região de Cubatão. 226p. São Paulo.
  
- CETESB, 1987. Avaliação da Toxicidade de Despejos Industriais na Região da Grande São Paulo. 88p. São Paulo.
  
- CETESB, 1990. Implementação de testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos. B.3231. São Paulo.
  
- CETESB, 1991. Avaliação do Estado de degradação dos Ecossistemas da Baixada Santista. 32p. São Paulo.
  
- Fonseca, A. L. 1991. A Biologia da Espécie Daphnia laevis, Ceriodaphnia dubia silvestre (Cladocera, Crustacea) e Poecilia reticulata (Pisces, Poeciliidae) e o Comportamento destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais. USP, 210p. São Carlos.
  
- Gherardi-Goldstein, E.; Zagatto, P.A.; Araujo, R.P.; Bertolotti, E. 1983. Avaliação da Toxicidade dos Principais Despejos Industriais da Região de E.R.Q. - Suzano, Através de Ensaio Biológicos. Revista DAE, 43 (132) : 42-47.
  
- Gherardi-Goldstein, E. 1988. Testes de Toxicidade de Efluentes Industriais. Revista Ambiente, 2 (1) : 33-38. São Paulo.
  
- ISO ( International Organization For Standardization ). 1982. Water Quality - Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna, Straus ( Cladocera, Crustacea ). Internatinal Standard, ISO, 6341.
  
- Nascimento, I.A. 1996. Programa de Monitoramento dos Ecossistemas ao Norte da Baía de Todos os Santos. Relatório Setorial Final, UFBA. Salvador, Bahia.
  
- Pereira, N.D.; Gherardi-Goldstein, E.; Zagatto, P.A.; Sassi, R. 1987. Bioensaios : Um Programa a Serviço do Controle da Poluição, Resultados Iniciais. Revista Ambiente, 1(1) : 32-36. São Paulo.
  
- Santos, A. R.; Cesar, A.; Silva, S.L.R. 1991. Avaliação de Efluentes Líquidos Industriais Através de Testes de Toxicidade. UNICEB, 11p. Santos, São Paulo.



- Santos, A.R.; Cesar, A.; Silva, S.L.R. 1993. Testes de Toxicidade Aquática no Controle de Efluentes Líquidos Industriais. UNICEB, 32p. Santos, São Paulo.

- USEPA. 1985. Toxicity of Petroleum Refinery Wastewater Relative to Types of Treatment Systems. Industrial Environmental Research Lab. 190p. Cincinnati, USA.

- Zagatto, P.A. 1988. Sensibilidade de Daphnia similis : Controle de Qualidade de Culturas. Revista Ambiente, 2 (2) : 28-35. São Paulo.

- Zagatto, P.A. et alli. 1988. Toxicidade de Efluentes Industriais da Bacia do Rio Piracicaba. Revista Ambiente, 5 (1) : 39-42. São Paulo.

- Zagatto, P.A.; Gherardi-Goldstein, E. 1991. Toxicidade em Águas do Estado de São Paulo. Revista Ambiente, 5 (1) : 13-20. São Paulo.