



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E BIOMONITORAMENTO**

ANDRÉA CRISTINA S. DA CRUZ

**SELEÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS COMO REFERÊNCIA EM
TESTES DE TOXICIDADE COM EMBRIÕES DA OSTRA *Crassostrea
rhizophorae*, GUILDING, 1828: CONTROLE DA QUALIDADE
ANALÍTICA DE TESTES ECOTOXICOLÓGICOS**

**SALVADOR - BA
2003**

ANDRÉA CRISTINA S. DA CRUZ

**SELEÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS COMO REFERÊNCIA EM
TESTES DE TOXICIDADE COM EMBRIÕES DA OSTRA *Crassostrea*
rhizophorae, GUILDING, 1828: CONTROLE DA QUALIDADE
ANALÍTICA DE TESTES ECOTOXICOLÓGICOS**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE BIOLOGIA, DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA,
COMO EXIGÊNCIA PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM
ECOLOGIA E BIOMONITORAMENTO.**

**ORIENTADORA: DR.^a SOLANGE ANDRADE PEREIRA
CO-ORIENTADORA: DR.^a IRACEMA ANDRADE NASCIMENTO**

**SALVADOR - BA
2003**

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr.^a Solange Andrade Pereira

Instituto de Biologia/UFBA

Dr.^a Iracema Andrade Nascimento

Instituto de Biologia/UFBA

Dr. Eduardo Bertoletti

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

HOMOLOGADA EM / /

1 - INTRODUÇÃO

É consenso que a degradação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos vem acontecendo de forma intensa e global, sobretudo nas regiões desenvolvidas e em desenvolvimento das áreas costeiras, como resultado de inúmeras atividades antrópicas que geram efluentes e resíduos contaminantes com alto grau de toxicidade, o qual provoca efeitos deletérios gradativos em toda cadeia trófica que habita esses ecossistemas.

Esses ecossistemas de uma forma geral se constituem em grandes receptáculos de poluentes, variáveis em quantidade e origem, em sua maioria lançados no meio ambiente sem qualquer tratamento prévio. Os ecossistemas aquáticos, em particular, recebem uma grande variedade de poluentes.

A presença de algumas substâncias de natureza orgânica e inorgânica nos vários ecossistemas, especialmente nos costeiros, representa um elevado risco aos seres vivos que ocupam esses espaços, uma vez que a exposição continuada dos organismos a essas substâncias pode levar a um comprometimento das espécies bem como do ecossistema como um todo.

1.1 - MÉTODOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL

As análises químicas rotineiramente efetuadas no controle da qualidade ambiental traduzem uma avaliação parcial das condições do ambiente, uma vez que identificam e quantificam algumas substâncias presentes no meio, embora não detectem os efeitos causados à biota local resultante de suas interações. Seu uso exclusivo para detectar desequilíbrios ecológicos nesses ecossistemas, torna-se então, desaconselhável.

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos têm sido utilizados, desde a década de 40, para prever o impacto do lançamento de agentes químicos em recursos hídricos (Buikema et al., 1982; Parrish, 1985).

As informações geradas através dessa técnica foram utilizadas com o objetivo de estabelecer as concentrações de vários agentes tóxicos que poderiam ser dispostos sem prejuízo do equilíbrio natural das comunidades aquáticas. Entretanto, ao longo dos anos 70, alguns pesquisadores observaram que os teores estabelecidos para os diversos agentes tóxicos isoladamente poderiam não preservar, efetivamente, a qualidade de água necessária para a manutenção da vida aquática devido à mistura desses agentes (Hanmer et al., 1984; Lloyd, 1986). A partir dessas observações, e através de testes de toxicidade e análises químicas feitas conjuntamente, houve uma intensificação em estudos para identificar as possíveis interações entre os agentes tóxicos presentes em efluentes, e seus conseqüentes efeitos sobre a biota aquática (EIFAC, 1980).

Com isso, apesar do efetivo e bem documentado papel dos testes de toxicidade na avaliação da qualidade ambiental, chegou-se à conclusão de que a verificação dos níveis de toxicidade nesses ambientes deveria estar atrelada à análises químicas e biológicas para uma avaliação global dos efeitos, não apenas quantificando e identificando as substâncias presentes no meio, mas, detectando os efeitos causados aos organismos locais. Esses três métodos (análises químicas, testes de toxicidade e detecção de alterações biológicas em populações) formam uma tríade natural, em que cada componente realça o poder dos outros (Sergy, 1987).

Amplamente utilizada, a simples análise química dos contaminantes presentes no sedimento não é indicadora de efeitos biológicos, mas é necessária para determinar o grau e a natureza da contaminação. Por outro lado, os testes de toxicidade fornecem um significado toxicológico aos dados químicos, evidenciando a necessidade do uso de técnicas associadas. No entanto, como os testes de toxicidade são feitos em laboratório, podem não repetir as condições às quais a biota residente pode estar exposta. Por isso, estudos sobre essas comunidades são necessárias (Long & Chapman, 1985).

O método da tríade permite um maior espectro de respostas, permitindo assim, de maneira integrada, detectar alterações na qualidade do ambiente estudado (Abessa et al.,

1998). É importante ressaltar que na impossibilidade de utilizar as três técnicas associadas, os testes de toxicidade são os mais aconselháveis por apresentarem, dentre outras, as seguintes vantagens (Environment Canada, 1999).

- Medem a toxicidade mesmo quando o agente tóxico é desconhecido;
- Têm caráter preditivo, ou seja, fornecem advertência de potenciais danos ambientais, antes que o ecossistema esteja severamente comprometido;
- São usualmente menos custosos que as análises químicas;
- Apresentam respostas em curto período de tempo;
- As espécies utilizadas são de fácil manutenção.

1.2 - TESTES ECOTOXICOLÓGICOS E SUA IMPORTÂNCIA NA AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS NOS ECOSISTEMAS

Os métodos mais relevantes do ponto de vista ecológico para avaliação de efeitos adversos são aqueles que determinam alterações na estrutura e função dos ecossistemas (Kelly & Harwell, 1989). Entretanto, tais determinações são difíceis, de alto custo, exigem muito tempo e raramente são preditivas. Assim, quando uma alteração significativa for evidenciada, o ecossistema possivelmente já estará severamente danificado. Além disso, é geralmente impossível relacionar determinado grau de alteração a níveis de contaminação de um poluente, devido ao enorme número de variáveis naturais e antropogênicas atuando no sistema (Nascimento et al., 2002).

Muitos autores (Depledge, 1990; Fossi & Leonzio, 1994), afirmam que a cada degrau que se desce na hierarquia biológica (níveis de comunidade, populações, organismos e celular – bioquímico) mais difícil se torna relacionar os efeitos de poluentes

observados à alterações no ecossistema como um todo. Por exemplo, as relações específicas entre respostas bioquímicas e efeitos adversos em ecossistemas não são claras, tornando difícil interpretar, em níveis de organização mais altas, as conseqüências de uma alteração bioquímica (Neff, 1984). Uma forma de minimizar as dificuldades de prognóstico, diagnóstico e monitoramento ambiental é utilizar testes de toxicidade que forneçam respostas em nível de organismos.

A maioria dos padrões de qualidade para a proteção de ambientes aquáticas foram, e ainda são, estabelecidos com base em estudos de laboratório; dentre esses destacam-se os testes ecotoxicológicos agudos e crônicos com diversos organismos, por apresentarem custo reduzido e simularem o que pode ocorrer nos ecossistemas aquáticos com relativa exatidão (Bertoletti, 2000).

Os testes ecotoxicológicos permitem, sob condições controladas, determinar as concentrações dos agentes químicos que causam efeitos danosos aos organismos aquáticos e têm ampla utilização no estabelecimento de padrões e/ou critérios de qualidade para a proteção de comunidades aquáticas (Bertoletti, 2000). São utilizados como ferramenta de uso rotineiro para avaliação da qualidade de efluentes (Gherardi-Goldstein et al., 1990).

Os testes de toxicidade que fornecem respostas em nível de organismo são os mais eficientes para se diagnosticar e monitorar o ambiente aquático, sendo preferível nesses testes utilizar embriões, pois se constituem na fase mais sensível do ciclo de vida do organismo. Os testes embrio-larvais (early-life stages tests) fornecem respostas de toda a fase embrionária do organismo, portanto são considerados como testes de efeitos sub-crônicos (Nascimento et al., 2000b; Nascimento et al., 2002). Testes de toxicidade com duração de 24 a 96 horas, poderiam ser considerados como testes agudos, entretanto, por envolverem fase completa, embora inicial, do ciclo de vida do organismo, quando ocorrem muitas divisões celulares e, portanto, maior acessibilidade do DNA à influências externas, são hoje considerados testes especiais, fora da classificação de agudos ou crônicos (McKim, 1985). Com isso, mantida a utilização de fases embriolarvais por curtos períodos,

os testes de toxicidade sugeridos foram denominados sub-crônicos ou crônicos de curta duração.

1.3 - USO DE TESTES DE TOXICIDADE COM EMBRIÕES DE OSTRAS

A utilização de ensaios ecotoxicológicos com embriões de ostra foi recomendado, por Woelke (1972), para determinação de qualidade de água nos ambientes marinhos, sendo que esses ensaios foram padronizados pela American Society for Testing and Materials (ASTM, 1989). Dados de literatura relativa à embriões de ostra mostram que estes organismos respondem à ação de muitas substâncias químicas, ou alterações de variáveis físico-químicas, desenvolvendo-se de forma anormal (Loosanoff & Davis, 1963; Davis & Calabrese, 1969; Calabrese & Davis, 1970; Calabrese et al., 1973; Mc Innes & Calabrese, 1978, 1979; Martin et al., 1981; Nascimento et al., 1989; Nascimento et al., 2002; Nascimento et al., 2000a e 2000b).

É importante ressaltar que a exposição continuada dos organismos a agentes tóxicos presentes nos ecossistemas muitas vezes não provoca diretamente a sua morte, mas afeta a estrutura e função de alguns órgãos vitais como brânquias, gônadas, rins, fígado, dentre outros, comprometendo a viabilidade do indivíduo. Por isso, as mudanças morfológicas decorrentes da toxicidade do meio, constatadas em escala microscópica em laboratório, são indicadoras de possíveis alterações no ecossistema em questão.

Apesar da crescente utilização dos testes ecotoxicológicos no Brasil, segundo Bertolotti (2000), poucas espécies de organismos aquáticos nativos são empregadas em métodos padronizados; dentre essas destacam-se as seguintes: os crustáceos dulciaquícolas *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella sp.*, o crustáceo marinho *Mysidopsis juniae*, e o equinóide *Lytechinus variegatus*. Além dessas, a espécie *Crassostrea rhizophorae* tem sido utilizada para avaliação da toxicidade de efluentes e produtos e para determinação de qualidade em corpos d'água (Nascimento, 1982; Nascimento et al., 1989; Nascimento et al., 2002; Nascimento et al., 2000a e 2000b). Trata-se de uma ostra representativa de ecossistemas locais, que habita os manguezais desde o Caribe à Santa Catarina, Brasil

(Rios, 1970), sendo por isso importante na avaliação da qualidade desses ambientes, uma vez que não é uma espécie introduzida. No que tange à reprodução, embora ocorram picos, em geral em torno de março/abril e setembro/outubro, esta espécie desova durante todo ano, não havendo necessidade de condicionamento prévio de reprodutores para a realização dos testes (Nascimento & Lunetta, 1978).

1.4 - USO DE SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA EM TESTES DE TOXICIDADE

Para atribuir maior confiabilidade a testes de toxicidade é necessário a padronização do nível de sensibilidade dos organismos-teste com a utilização de uma substância de referência, uma vez que a variação natural dos resultados é uma ocorrência comum em testes de toxicidade.

A substância de referência é um agente químico, denominado de controle positivo, que atua em testes de toxicidade detectando efeitos fora da variação normal, mediante a utilização de uma série de múltiplas concentrações. Representam assim, um meio de detectar mudanças na performance de organismos-teste e de avaliar a precisão destes testes (Environment Canada, 1990).

Além disso, nos testes de toxicidade são utilizados os chamados controles, denominados também de controles negativos, os quais servem como monitor geral da qualidade no experimento. Por exemplo, mudanças repentinas de temperatura, estresse no manuseio dos organismos-teste, ou doenças não percebidas podem causar elevada mortalidade, até mesmo na ausência de um agente químico. Ambos, controle positivo e controle negativo são necessários para avaliar a qualidade dos testes ecotoxicológicos (Environment Canada, 1999).

Desse modo, o uso de substâncias de referência confere aos testes maior confiabilidade, uma vez que as alterações apresentadas pelos organismos-teste são atribuídas ao agente estressor e não a qualquer outra variável. Além disso, estas substâncias fornecem uma medida de reprodutibilidade, ou seja, concordância entre os resultados obtidos.

A variabilidade ocorrente em testes de toxicidade pode ser atribuída a fatores naturais como a saúde dos organismos-teste e à diferenças de sensibilidade entre grupos de organismos, ou à fatores não esperados como as alterações na qualidade da água do laboratório e a inconsistência operacional de técnicos (Environment Canada, 1990).

Usualmente, em testes de toxicidade são utilizadas substâncias químicas de grau analítico, as quais permitem determinar o coeficiente de variação dos resultados de uma série de experimentos (Bertoletti, 2000). Essa determinação é importante, pois qualquer metodologia que envolva organismos vivos deve envolver também avaliações de sua precisão, o que significa a medida da proximidade de concordância entre os resultados dos testes efetuados (Rue et al. 1988).

Dados de literatura (Environment Canada, 1999) sugerem um coeficiente de variação (C.V) menor que 40% como aceitável à reprodutibilidade de resultados na ausência de algum padrão historicamente aceito. Os 40% foram selecionados com base em discussões com toxicologistas e autores de experiências em laboratório, testando substâncias de referência (Environment Canada, 1999).

Considerando que as interferências analíticas possam ser eliminadas ou, pelo menos, minimizadas, ainda assim é esperado que exista uma variação natural nos resultados dos testes ecotoxicológicos. Segundo Sprague (1985), freqüentemente, grande parte dessa variação é inexplicável, uma vez que pode ser resultado de alterações não identificadas (como a sensibilidade individual) ou nas condições do teste. Portanto, é necessário avaliar a variabilidade inerente a um teste ecotoxicológico, especificamente dos fatores biológicos como a saúde, a genética e condições gerais dos organismos utilizados (Morrison et al. 1989).

Diversas substâncias de natureza orgânica e inorgânica são usadas como referência em testes de toxicidade. Dentre elas o Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), embora utilizado amplamente como substância de referência em testes de toxicidade com diversos

organismos testes, não tem seu uso recomendado como um bom agente químico de referência, uma vez que não atende às características inerentes a uma boa substância de referência (Environment Canada 1990).

Apesar disso, o reagente Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) também conhecido como Lauril Sulfato de Sódio, é utilizado em testes de toxicidade, por apresentar as seguintes vantagens:

- Atua de forma rápida, por ser não seletivo e consistente em sua toxicidade a animais aquáticos (Davis & Hoos, 1975; de Araújo & Nascimento, 1999).
- Apresenta baixa toxicidade ao homem;
- Apresenta toxicidade em baixas concentrações;

Apesar do amplo uso do DSS em laboratórios nacionais e internacionais como substância de referência, atualmente, questiona-se seu uso, devido uma série de desvantagens comprovadas ao longo de sua utilização, são elas:

- Altas taxas de biodegradação da solução (Pessah et al., 1975; Abel, 1974);
- Durante seu preparo há formação de espuma (Davis & Hoos, 1975), exigindo do pesquisador cuidado ao manusear o produto.
- Diferentes lotes do reagente podem apresentar diferenças na toxicidade (Fogels & Sprague, 1977).

Pesquisas realizadas com a truta arco-íris demonstram a inconsistência de resultados quando o DSS é utilizado como agente químico de referência; quando estressadas por inanição, temperatura, ou altas densidade no local de acondicionamento, as trutas não responderam diferentemente (tempo de sobrevivência mediano) ao DSS, quando

comparadas às não submetidas às referidas condições (Alexander & Clarke, 1978). Pessah et al., (1975), reportaram que a CL_{50} para um estoque de trutas doentes não foi diferente da CL_{50} apresentada por trutas saudáveis (Environment Canada 1990).

Por outro lado, diferentes lotes do Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) pode gerar níveis de respostas também diferentes; essa limitação pôde ser comprovada por Fogels & Sprague, (1977).

Diante das desvantagens apresentadas pelo DSS quando usado como substância de referência em testes de toxicidade e tendo em vista a ampliação de opções de substâncias químicas como referência, o presente trabalho visou pesquisar tóxicos de origem orgânica, a saber, fenol e 4-clorofenol, que possam ser utilizados como alternativa em testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*, buscando à conformidade com alguns critérios estabelecidos pelo Environment Canada (1999), a saber:

- 1 - Possibilitar a detecção de organismos anormais;
- 2 - Apresentar toxicidade em baixas concentrações;
- 3 - Não apresentar seletividade, ou seja, ser tóxico tanto para invertebrados quanto para peixes;
- 4 - Ser reconhecido como um contaminante ambiental;
- 5 - Ser disponível na forma pura;
- 6 - Ser de fácil análise;
- 7 - Apresentar solubilidade e estabilidade em água;
- 8 - Apresentar estabilidade durante o armazenamento.

As substâncias utilizadas como agentes de referência são químicos, comumente um metal (como o zinco) ou um composto orgânico simples (como o fenol), que devem possuir

um grau de toxicidade bem documentado para as espécies teste, capazes de possibilitar comparações entre resultados (Environment Canada, 1999).

Essas substâncias têm sido usadas em testes interlaboratoriais para avaliar a variabilidade de resultados de um método executado em diferentes laboratórios. Essa precisão dos testes de toxicidade pode ser inferida através de uma série de testes, onde o consenso entre “endpoints” da maioria dos laboratórios é assumida para refletir o resultado “real”. Contudo, o conceito de resultado “real” como é aplicado em análises químicas pode ser impróprio para interpretação de testes ecotoxicológicos interlaboratoriais. Diferenças na água de diluição e nos organismos testes, e o fato de que alguns elementos teste não serem precisamente definidos (por exemplo, taxa de aeração) podem levar à diferentes, mas igualmente válidos, resultados de testes (Environment Canada, 1990).

Além disso, os tóxicos de referência podem ser usados para estimar as condições ou sensibilidade de um grupo de organismos-teste. Aplica-se na condução de testes de toxicidade para garantir uma série de valores de CE_{50} (cartas controle de sensibilidade). Resultados individuais são comparados com performances históricas para identificar se eles ocorrem dentro de uma faixa aceitável de variabilidade. Dados que ocorrem fora de um limite estabelecido sugerem uma revisão de fontes potenciais de variabilidade (Environment Canada, 1990).

Durante o desenvolvimento do presente trabalho ficou clara a necessidade de pesquisas acerca do uso de substâncias orgânicas em testes de toxicidade, uma vez que, na literatura há uma escassez de informações sobre tais substâncias; esse fato restringiu uma análise comparativa mais ampla entre os agentes tóxicos avaliados e o organismo-teste utilizado nessa pesquisa; entretanto, outros organismos aquáticos foram usados para expressar a ação tóxica desses químicos em testes de toxicidade. Certamente o conhecimento do comportamento desses agentes químicos, recomendados como substâncias de referência, virão subsidiar futuras pesquisas, permitindo uma avaliação adequada dos resultados, visando o controle da qualidade analítica de testes de toxicidade com embriões de ostra.

2 - OBJETIVOS

2.1 – GERAL

- Desenvolver estudos para subsidiar o controle da qualidade analítica de testes de toxicidade com embriões de *Crassostrea rhizophorae*.

2.2 – ESPECÍFICOS

- Calcular as concentrações efetivas (CE₅₀-24 horas) expressas em mg/L para as substâncias químicas estudadas;
- Estabelecer uma concentração efetiva alternativa para a expressão de efeitos crônicos em testes de toxicidade com *Crassostrea rhizophorae*;
- Determinar a precisão analítica dos testes de toxicidade com substâncias orgânicas de referência, utilizando como organismo-teste embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*;
- Estabelecer cartas controle de sensibilidade para *Crassostrea rhizophorae* utilizando as substâncias de referência estudadas;
- Determinar dentre os químicos estudados o que melhor se aplica como substância de referência em testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ORGANISMOS -TESTE: COLETA E TRATAMENTO EM LABORATÓRIO

Foram utilizadas ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* como organismo-teste nos testes de toxicidade executados; essa espécie habita os manguezais, desde o Caribe a Santa Catarina, Brasil (Rios, 1970) sendo portanto, de ampla distribuição na costa brasileira.

As ostras utilizadas nos testes foram provenientes de áreas não poluídas. Em laboratório, após serem lavadas, limpas de incrustações e deixadas em jejum, foram aclimatadas em recipientes contendo água do mar filtrada, aerada e com salinidade 28 por 24 horas, condições semelhantes a do local de coleta (Figuras 1 e 2).



Figura 1: Aclimação das ostras



Figura 2: Cuidados prévios com os reprodutores: limpeza de incrustantes

3.2 - CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA UTILIZADA

A água utilizada tanto no processo de aclimação, quanto na execução dos testes apresentou as seguintes características: Salinidade 28; Temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH = 8,0 a 8,5; foi filtrada em filtros Whatman® GF/C (capacidade de retenção de partículas $1.2\mu\text{m}$), esterilizada em autoclave (127°C e pressão de $1.5/\text{cm}^2$ por 20 minutos) e utilizada 48 horas após autoclavagem para garantir a estabilização do pH.

3.3 – DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES-TESTE, PH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO

Foram utilizados ensaios preliminares exploratórios, utilizando-se soluções com intervalos de concentrações largamente espaçadas, de forma a se estabelecer a faixa de sensibilidade do organismo-teste. Com base no teste preliminar, foram selecionadas as concentrações das soluções-teste do agente tóxico, com intervalos em escala logarítmica (Environment Canada, 1995). Como parte integrante da metodologia, foram determinados os valores de pH e oxigênio dissolvido dos testes de toxicidade, executados com as substâncias orgânicas analisadas.

3.4 – SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Foram utilizadas, em comparação com o Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), cujas limitações já foram explicitadas, duas outras substâncias orgânicas sugeridas em literatura como candidatas a bons tóxicos de referência: Fenol (C_6H_5OH) e 4-Clorofenol ($4-ClC_6H_4OH$). Foram realizados 15 testes de toxicidade para cada substância de referência, como recomendado pelo Environment Canada (1990).

- Fenol (C_6H_5OH) – Lote 010964
Fabricado por VETEC Química Fina Ltda.
Peso Molecular = 94,11
- 4-Clorofenol($4-ClC_6H_4OH$) – Lote 972909
Fabricado por VETEC Química Fina Ltda.
Peso Molecular = 128,56
- DSS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) – Lote 8170341000
Fabricado pela MERCK
Peso Molecular = 288,38

Preparo da solução de DSS utilizada como matriz tóxica: Foram utilizados 10mg do produto em 100 ml de água do mar dissolvidos lentamente para não formar espuma. Após a avolumação do balão, a solução foi agitada durante 30 minutos em placa magnética para total homogeneização. O DSS foi usado nas seguintes concentrações: 0.32; 0.56; 1.0; 1.8 e 3.2 mg/L,

sendo estas as concentrações rotineiramente usadas em testes de toxicidade com vários organismos, inclusive ostras, no laboratório de Biologia Marinha da UFBA.

Preparo das soluções estoque de Fenol (C₆H₅OH) e 4-Clorofenol (4-ClC₆H₄OH) - As soluções estoque destas substâncias foram preparadas para fornecer uma concentração de 10.000 ppm desses compostos. Para isso, pesou-se 0,25g de cada uma delas em balança digital e, em seguida, foram utilizados 25ml de água destilada para as diluições dos referidos compostos. As soluções-teste foram preparadas com água do mar e um volume pré-determinado da solução estoque, selecionado de acordo com a quantidade do composto desejada, para atender a concentração final a ser utilizada (Tabela 1).

As concentrações teste determinadas para o fenol foram: 19, 27, 37, 52 e 72 ppm; e para o 4-clorofenol: 10, 15, 22, 32 e 46 ppm, (Tabela 1). Essas concentrações foram baseadas em escala logarítmica, segundo o Environment Canada, (1995).

Tabela 1: Concentrações teste para as substâncias fenol e 4-clorofenol

FENOL			4-CLOROFENOL		
Soluções Teste	Quantidade do composto (mg)/ ml	Concentração final (ppm)*	Soluções Teste	Quantidade do composto (mg)/ ml	Concentração final (ppm)*
S ₁	7,2	72	S ₁	4,6	46
S ₂	5,2	52	S ₂	3,2	32
S ₃	3,7	37	S ₃	2,2	22
S ₄	2,7	27	S ₄	1,5	15
S ₅	1,9	19	S ₅	1,0	10

* A concentração final (ppm) é calculada para uso em recipiente de 100 ml.

Tanto para o fenol quanto para o 4-clorofenol foram elaboradas concentrações teste calculadas com o objetivo de se utilizar apenas 1ml em cada recipiente teste; esse procedimento visou minimizar erros técnicos durante o desenvolvimento da pesquisa.

3.5 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Os testes de toxicidade executados com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* foram efetuados segundo método desenvolvido por Nascimento et al., (1989), baseado no método padronizado pela American Society for Testing and Materials (ASTM, 1989) para *Crassostrea gigas*. O teste consiste na exposição dos embriões a várias concentrações do agente químico por um período de 24 horas. Tal procedimento permite determinar a concentração efetiva média CE50–24h da amostra teste, calculada pelo método computadorizado Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977).

3.6 – OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Para a obtenção dos embriões, as ostras foram abertas por secção do músculo adutor (Figura 3). O material gonadal foi retirado dos poros genitais com o auxílio de pipetas de Pasteur (Figura 4), tomando-se cuidado para não perfurar o hepatopâncreas; em seguida, foi feita a identificação do sexo através de exame microscópico. Ovócitos e espermatozoides foram colocados separadamente em recipientes com água do mar previamente preparada (S = 28; T°C = 26± 1° C; pH = 8.0 a 8,5) filtrada em filtros Whatman® GF/C (capacidade de retenção de partículas 1.2µm), esterilizada em autoclave (127°C e pressão de 1.5/cm2 por 20 minutos) e utilizada 48 horas após autoclavagem para garantir estabilização do pH.



Figura 3: Aberturas da ostra através da secção do músculo adutor.



Figura 4: Retirada de material gonadal

Dando prosseguimento ao teste, filtrou-se a suspensão através de uma malha de 150µm, descartando-se o material retido; e acrescentou-se 2ml da suspensão semi-espessa de

espermatozoides em 1L da suspensão de ovócitos. A fecundação foi feita no mínimo 45 minutos após a retirada dos ovócitos das gônadas (Santos & Nascimento, 1985). A observação do material foi feita uma hora após a fecundação, quando se evidenciam ovos em divisão.

Em seguida foram retiradas sub-amostras (no mínimo três) de 0.1ml, que foram diluídas para 1ml, para contagem dos embriões em câmara de Sedgwick-Rafter. Calculou-se a média de embriões na suspensão e foram feitos os cálculos necessários para se ter nos recipientes-teste, 1000 embriões/100ml em água do mar filtrada e esterilizada.

3.7 – MONTAGEM DOS TESTES

Foram distribuídos em cada recipiente-teste os agentes químicos testados, nas concentrações selecionadas de acordo com desenho experimental.

Tendo sido utilizadas 5 concentrações-teste, com 3 réplicas para cada concentração, além disso, foi utilizado um controle branco (água de diluição + embriões) para controle da saúde dos organismos-teste.

Encheu-se cada recipiente-teste até cerca de $\frac{3}{4}$ com água de diluição, acrescentou-se a substância tóxica a ser testada (Figura 5). Posteriormente, os embriões foram inoculados e o volume foi completado para 100ml (Figura 6).



Figura 5: Colocação da substância-teste.



Figura 6: Inoculação dos embriões.

Após 24 horas, foram removidos de cada recipiente-teste duas amostras de 10ml, preservando-as com formol cálcico a 4%, em tubos de ensaio (Figuras 7 e 8). Deixou-se decantar 24 horas, retirando-se cuidadosamente o sobrenadante, até que ficasse no tubo de

ensaio cerca de 1ml. Agitou-se o tubo, e colocou-se o conteúdo em câmara de Sedgwick-Rafter, contando-se o número de embriões, larvas normais e anormais concentradas em 1ml.



Figura 7: Retirada de amostras.



Figura 8: Adição de formol para preservação de amostras.

3.8 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Segundo Nascimento et al., (1989) são considerados anormais: embriões, larvas sem conchas, larvas com conchas incompletamente desenvolvidas e larvas com conchas mal formadas, mesmo completas. Em contrapartida, são consideradas normais: larvas com conchas em forma de D perfeito, conchas vazias com formato de D perfeito e conchas menores com formato de D perfeito.

Além dessas anormalidades, as conchas podem apresentar características definidas, típicas de um tóxico específico, podendo ocorrer também extrusão de material interno, abertura das conchas, descolamento do manto dentre outras anormalidades.

Um teste deve ser desprezado quando ocorrer mais de 25% de anormalidade no controle, desde que tenham sido mantidas as condições físico-químicas ótimas para do desenvolvimento dos embriões (Nascimento et al., 1989).

3.9 – EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes de toxicidade executados foram expressos de acordo com os critérios para a avaliação do efeito tóxico e de acordo com os métodos estatísticos empregados na pesquisa. Foram realizados os seguintes cálculos:

- 1- Cálculo da CE50-24h – concentração efetiva mediana, que causa efeito agudo em 50% dos organismos teste, em 24 horas de exposição;
- 2- Estabelecimento da DMS crítica (Diferença Mínima Significativa), com base no 75º percentil dos valores das DMS obtidas;
- 3- Cálculo da CE15-24h – concentração efetiva que causa efeito crônico (anormalidades) em 15% dos organismos teste, em 24 horas de exposição, com base no nível de efeito apontado pela DMS crítica;
- 4- Cálculo dos coeficientes de variação da CE50 e CE15-24h;
- 5- Estabelecimento de cartas controle de sensibilidade para cada substância química estudada.

3.10 – MÉTODOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS

A partir dos resultados obtidos foram determinados os valores de CE50–24h e seus respectivos intervalos de confiança (P=0,05). Essa determinação foi feita através do método computadorizado Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Os valores de CE50–24h foram calculados com base na percentagem líquida de anormalidades calculada com base na fórmula de Abbott (Finney, 1971).

$$\% \text{ Liq. Anormalidade} = \frac{\% \text{ anormalidade por tratamento} - \% \text{ anormais no controle}}{100 - \% \text{ anormais no controle}} \times 100$$

As DMS (Diferença Mínima Significativa) foram calculadas através do programa computadorizado Toxstat 3.3 (Gulley et al., 1991). Esse cálculo foi feito através do teste de hipóteses, tal como análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett, um teste de múltiplas comparações. Posteriormente foi calculado o 75º percentil dos valores obtidos, utilizando como ferramenta o aplicativo excel.

Com base no cálculo do 75º percentil das DMS foi possível determinar um nível de efeito alternativo, a partir do qual se começa a observar efeitos deletérios significativos na população. Através do programa Inhibition Concentration (ICp versão 2.0) editado por Norberg-King (1993) foi possível determinar as CE(15).

3.11 – CÁLCULO DOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO

A precisão analítica dos resultados dos testes de toxicidade foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (C.V) tanto para os valores de CE50-24h, quanto para o CE15-24h (nível alternativo de efeito biológico) de acordo com a fórmula abaixo:

$$C. V. = (s/x) . 100$$

Onde: s = Desvio padrão

x = Média dos resultados dos testes efetuados.

O desvio padrão e média foram obtidas através do programa computadorizado Graphpad instat (1997), versão 3.0.

3.12 -ESTABELECIMENTO DE CARTAS CONTROLE DE SENSIBILIDADE

Para cada substância de referência estudada foi elaborada uma carta controle de sensibilidade, cujo princípio é projetar a média e \pm dois desvios padrões para delimitar a variação aceitável do teste; dessa forma, as cartas controle de sensibilidade tem como objetivo avaliar as oscilações esperadas das CE (50 e/ou 15) da espécie em estudo.

4 – RESULTADOS

4.1 – ANÁLISE QUANTITATIVA

4.1.1 – ESTABELECIMENTO DO NÍVEL DE EFEITO ALTERNATIVO

Para expressão de efeitos crônicos em testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*, foi estabelecida neste trabalho, a concentração de efeito alternativo. O nível de efeito estabelecido através de método estatístico apropriado foi de 16,2%. Associado a isso, e em vista da possibilidade de se utilizarem métodos estatísticos alternativos para o cálculo desse nível de efeito, considerou-se 15% como o nível de efeito que melhor retrata respostas da população submetida a efeitos crônicos.

Baseado no estabelecimento desse nível de efeito alternativo, os resultados do presente trabalho foram tratados fazendo-se comparações ao nível do efeito alternativo estabelecido (15%) e aquele comumente utilizado em testes de toxicidade (50%).

4.1.2 - EXPRESSÃO DOS RESULTADOS NO NÍVEL DE 50 E 15% DE EFEITO

A média das CE_{50-24h} obtida para o 4-Clorofenol foi de 20,97 mg/L, sendo o desvio padrão encontrado de 4,03, resultando num coeficiente de variação de 19,21%. Para o nível de efeito biológico alternativo, os valores encontrados foram, $CE(15)$ média de 12,06 mg/L; o desvio padrão 3,42 e o coeficiente de variação 28,35% (Tabela 2).

A média das CE_{50-24h} obtida para o DSS foi de 1,36 mg/L, sendo o desvio padrão encontrado de 0,29, resultando num coeficiente de variação de 21,32%. Para o nível de efeito biológico alternativo, os valores encontrados foram, $CE(15)$ média de 0,69 mg/L; o desvio padrão 0,32 e o coeficiente de variação 46,37% (Tabela 3).

Tabela 2: Estatística descritiva para o 4-Clorofenol

CE(50) (mg/L)	CE(50) média (mg/L)	Desvio Padrão	C.V* CE(50)	CE(15) (mg/L)	CE(15) média (mg/L)	Desvio Padrão	C.V* CE(15)
22,55				17,26			
20,91				8,62			
20,05				7,29			
21,90				13,06			
24,11				13,29			
18,64				11,26			
22,58	20,97	4,03	19,21	14,82	12,06	3,42	28,35
19,24				6,42			
16,46				11,48			
30,27				16,34			
24,61				14,21			
23,75				16,39			
14,37				11,22			
19,59				11,38			
15,58				7,95			

* Coeficiente de Variação (%)

Tabela 3: Estatística descritiva para o DSS (Dodecil Sulfato de Sódio)

CE(50) (mg/L)	CE(50) média (mg/L)	Desvio Padrão	C.V* CE(50)	CE(15) (mg/L)	CE(15) média (mg/L)	Desvio Padrão	C.V* CE(15)
1,13				0,59			
1,13				0,61			
2,03				0,31			
1,33				1,03			
1,33				0,98			
1,38				1,02			
1,15	1,36	0,29	21,32	0,19	0,69	0,32	46,37
1,10				0,55			
1,29				0,89			
1,22				0,89			
1,89				0,24			
1,76				0,70			
1,29				0,85			
1,34				1			
1,11				0,17			

* Coeficiente de Variação (%)

A média das CE₅₀-24h obtida para o fenol foi de 55,38 mg/L, sendo o desvio padrão encontrado de 9,14, resultando num coeficiente de variação de 16,50%. Para o nível de efeito biológico alternativo (CE₁₅-24h), o valor médio encontrado foi de 28,75 mg/L, o desvio padrão 11,84 e o coeficiente de variação 41,18 (Tabela 4).

Tabela 4: Estatística descritiva para o Fenol

CE(50) (mg/L)	CE(50) média (mg/L)	Desvio Padrão	C.V* CE(50)	CE(15) média (mg/L)	CE(15) (mg/L)	Desvio Padrão	C.V* CE(15)
70,21				53,38			
67,57				34,60			
44,41				25,14			
50,45				40,50			
54,61				25,32			
41,93				22,66			
52,13	55,38	9,14	16,50	36,65	28,75	11,84	41,18
48,10				27,52			
49,93				13,02			
66,20				42,88			
55,69				20,72			
44,18				15,09			
58,41				12,38			
63,70				37,19			
63,31				24,21			

* Coeficiente de Variação (%)

Para o nível de efeito de 50%, a maior média das CE₅₀-24h encontrada para as substâncias de referência testadas foi de 55,38 mg/L para o fenol, seguido de uma média de 20,97 mg/L referente ao 4-clorofenol. A menor média para esse nível de efeito foi apresentada pelo DSS (1,36 mg/L).

O nível de 15% de efeito seguiu a mesma tendência apresentada pelo nível de 50% de efeito, onde o fenol permaneceu com a maior média, (28,75 mg/L), seguido do 4-clorofenol e DSS, com uma média de 12,06 e 0,69 mg/L, respectivamente.

Os testes realizados com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* mostraram que o 4-clorofenol variou entre 30,27 a 14,37 mg/L com base nas CE₅₀-24h encontradas. Para o nível de efeito alternativo, as CE₁₅-24h variaram entre 17,26 a 6,42 mg/L (Figura 9, Tabela 2).

Para o DSS (Dodecil Sulfato de Sódio) os valores de CE₅₀ e CE₁₅-24h, mostraram uma variação compreendida entre 2,03 a 1,1 mg/L para as CE₅₀-24h, enquanto para as CE₁₅-24h esses valores variaram entre 1,03 a 0,17 mg/L (Figura 10, Tabela 3).

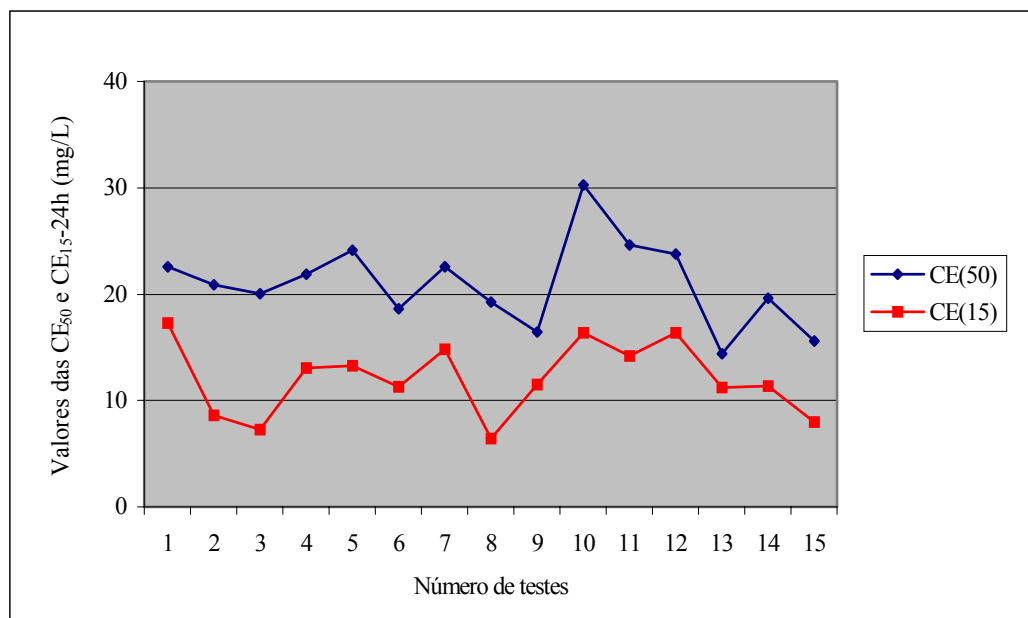


Figura 9: Comparação dos valores das CE₅₀ e CE₁₅-24h em testes de toxicidade realizados com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* e a substância 4-clorofenol.

Para o fenol, os valores de CE₅₀ e CE₁₅-24h, para cada série de testes realizados, mostraram uma variação de 70,21 a 41,93 mg/L para as CE₅₀-24h. Já as CE₁₅-24h variaram entre 53,38 a 12,38 mg/L (Figura 11, Tabela 4).

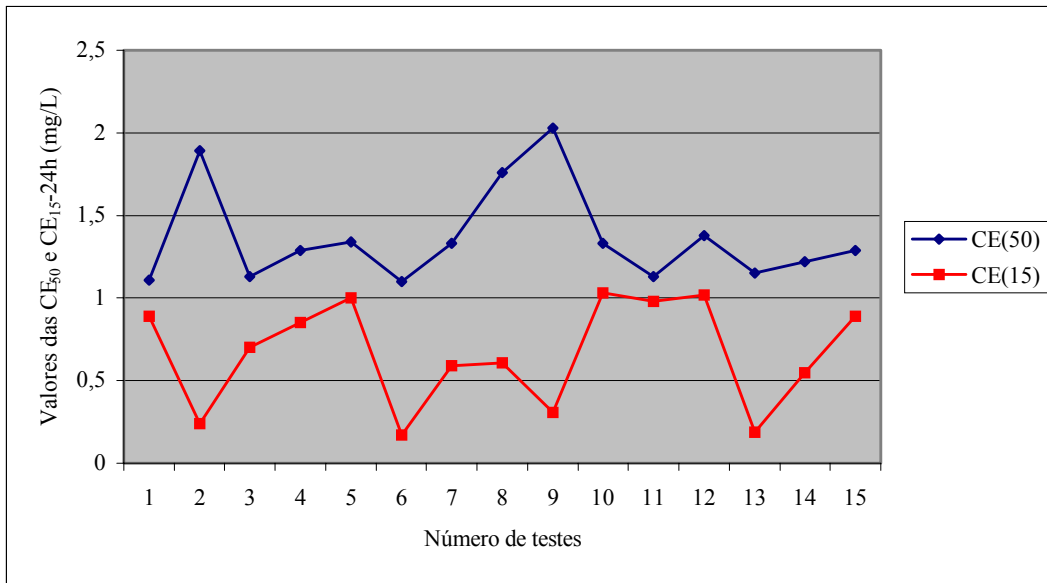


Figura 10: Comparação dos valores das CE_{50} e CE_{15-24h} em testes de toxicidade realizados com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* e a substância DSS.

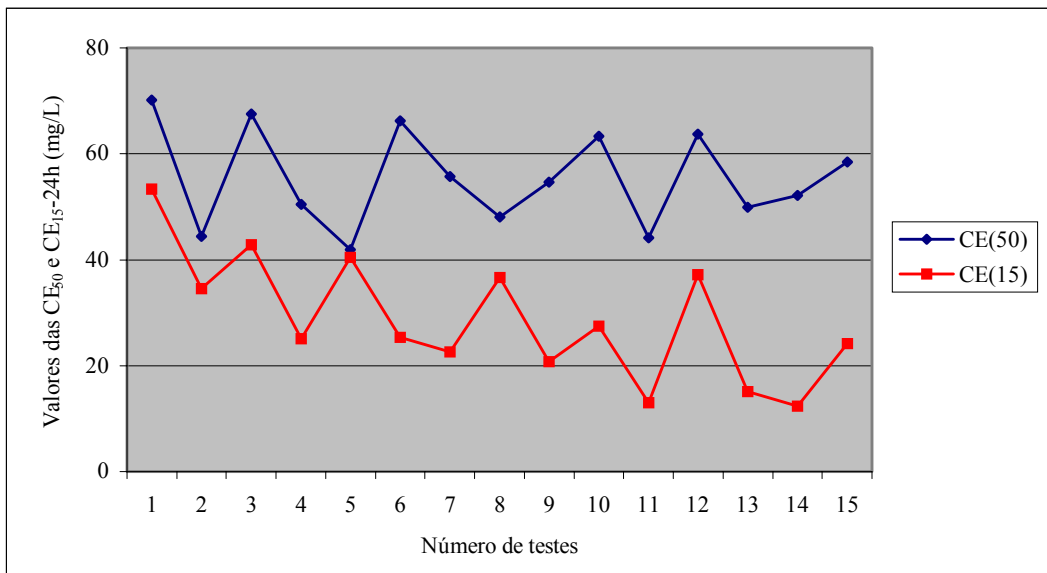


Figura 11: Comparação dos valores das CE_{50} e CE_{15-24h} em testes de toxicidade realizados com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* e a substância fenol.

4.1.3 – PRECISÃO ANALÍTICA DOS RESULTADOS

A precisão analítica dos testes foi calculada com base nos coeficientes de variação para os diferentes níveis de efeito, CE_{50-24h} e CE_{15-24h} . É possível observar (Figura 12), que os coeficientes de variação apresentaram valores mais elevados para o nível de efeito de 15% para todas as substâncias de referência analisadas. Para o nível de efeito de 50%, os valores mantiveram-se mais baixos, embora, a substância de referência 4-clorofenol tenha apresentado valores menores que 30% para ambos níveis de efeito biológico.

Para o 4-clorofenol os coeficientes de variação encontrados foram de 19,21 e 28,35 %, respectivamente, para os níveis de efeito de 50 e 15%. Para o fenol os coeficientes de variação encontrados foram de 16,50 e 41,18 % para os níveis de efeito acima citados, enquanto o DSS manteve a tendência de valores menores (21,32 %) para o nível de 50%; todavia para o nível de 15% esse valor foi maior (46,37 %).

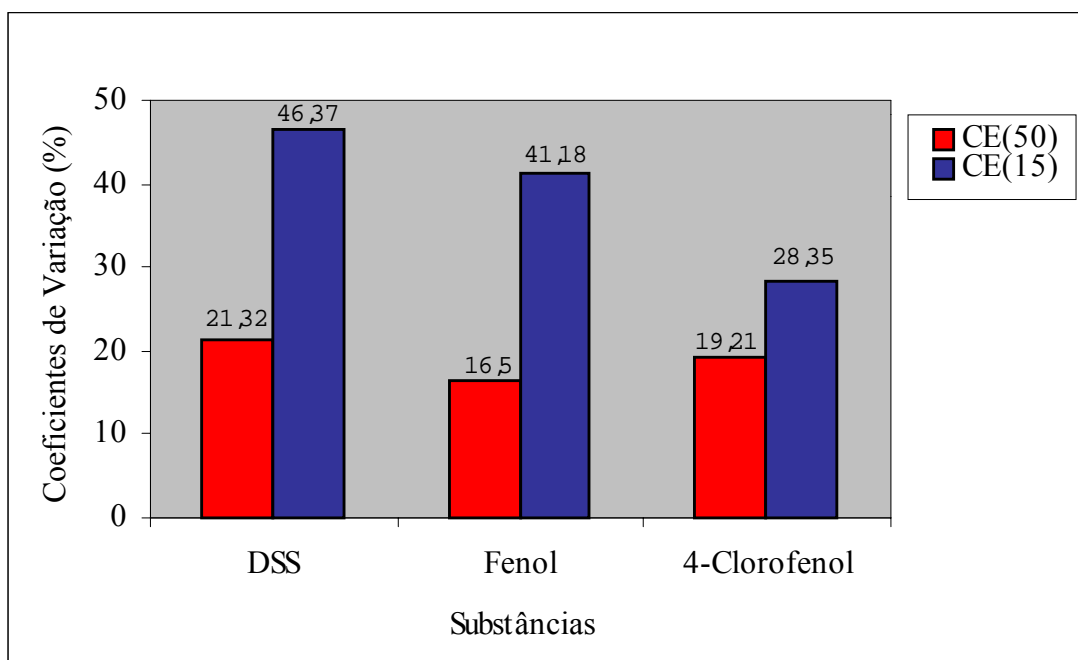


Figura 12: Coeficientes de variação (C.V), calculados com base nas médias das CE_{50} e CE_{15-24h} obtidas nos testes realizados com a ostra *Crassostrea rhizophorae*, e as substâncias de referência analisadas.

4.1.4 – ESTABELECIMENTO DE CARTAS CONTROLE DE SENSIBILIDADE

Testes com substâncias de referência são usados, dentre outros objetivos, para demonstrar a habilidade técnica de pessoal em laboratório e para se obter resultados consistentes e precisos com um determinado organismo teste. Essa prática é realizada utilizando as mesmas técnicas que tem sido desenvolvidas por laboratórios de análises químicas durante os últimos 20 anos. Uma dessas técnicas é a carta controle (Environment Canada, 1990).

Para o estabelecimento de cartas controle de sensibilidade são necessários, em geral, de 15 a 20 testes (Environment Canada, 1990), embora a U.S.EPA recomende um mínimo de cinco testes (Weber et al., 1989).

Na carta controle são plotados os resultados de uma série sucessiva de testes realizados com substâncias de referência, sendo que a abscissa apresenta a data dos testes ou o número dos testes realizados, e a coordenada indica a expressão dos resultados analíticos. Nesses testes de toxicidade as expressões são usualmente, CL_{50} e CE_{50} , as quais são variáveis contínuas que podem ser representadas com um intervalo de confiança associado (Environment Canada, 1990).

As cartas controle de sensibilidade tem por objetivo avaliar as oscilações das CE (50 ou 15) para diversas substâncias de referência estudadas, onde, a média e os valores equivalentes a \pm dois desvios padrões são projetados para delimitar a variação “natural” ou aceitável de um teste. Com 95% de confiança, 1 em cada 20 resultados de testes (5%) pode cair fora dos limites estabelecidos na carta controle. Esse evento denominado de “**outlier**” pode ocorrer ao acaso, e propõe uma revisão no sistema de testes, uma vez que as causas para essa ocorrência podem ser o erro no preparo da solução estoque, erro de cálculo da diluição, estresse dos organismos-teste, etc (Environment Canada, 1990).

Na presente pesquisa foram elaboradas as cartas controle de sensibilidade para *Crassostrea rhizophorae* em relação a cada uma das substâncias orgânicas estudadas (Figuras 13, 14, 15, 16 e 17).

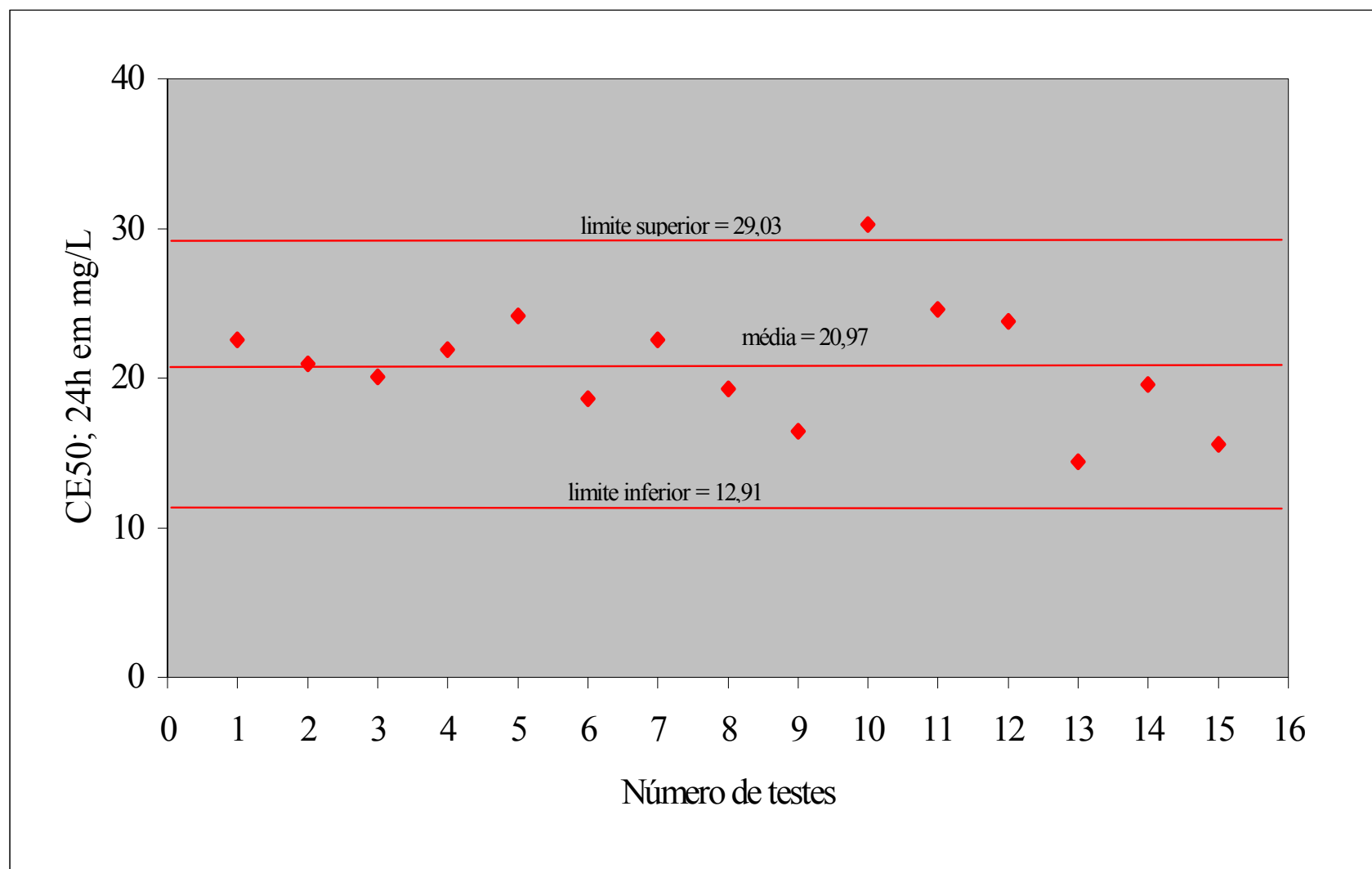


Figura 13: Carta controle de sensibilidade para embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* com base nas CE_{50} -24h obtidas em testes de toxicidade, utilizando a substância de referência 4-Clorofenol.

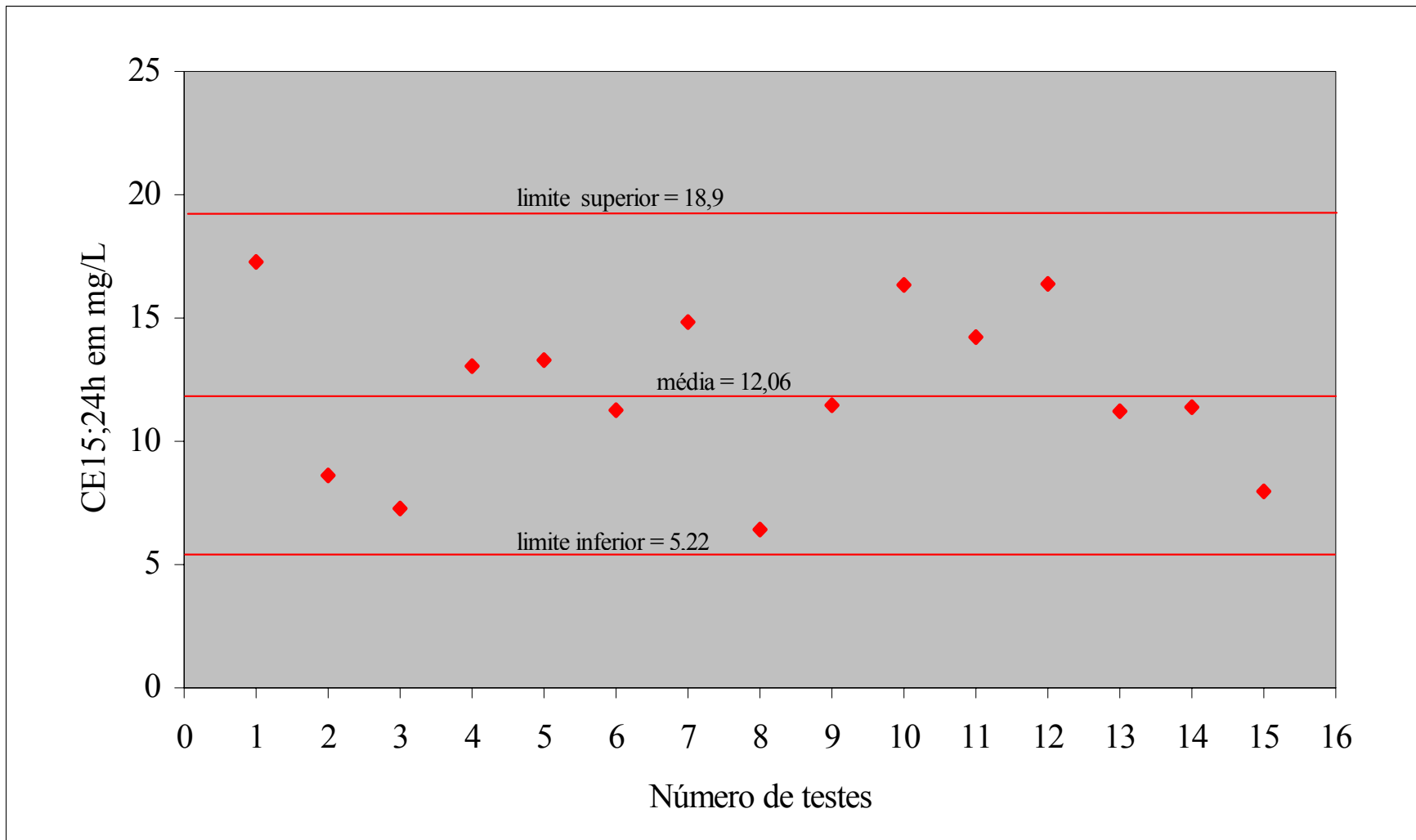


Figura 14: Carta controle de sensibilidade para embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* com base nas CE_{15-24h} obtidas em testes de toxicidade, utilizando a substância de referência 4-Clorofenol.

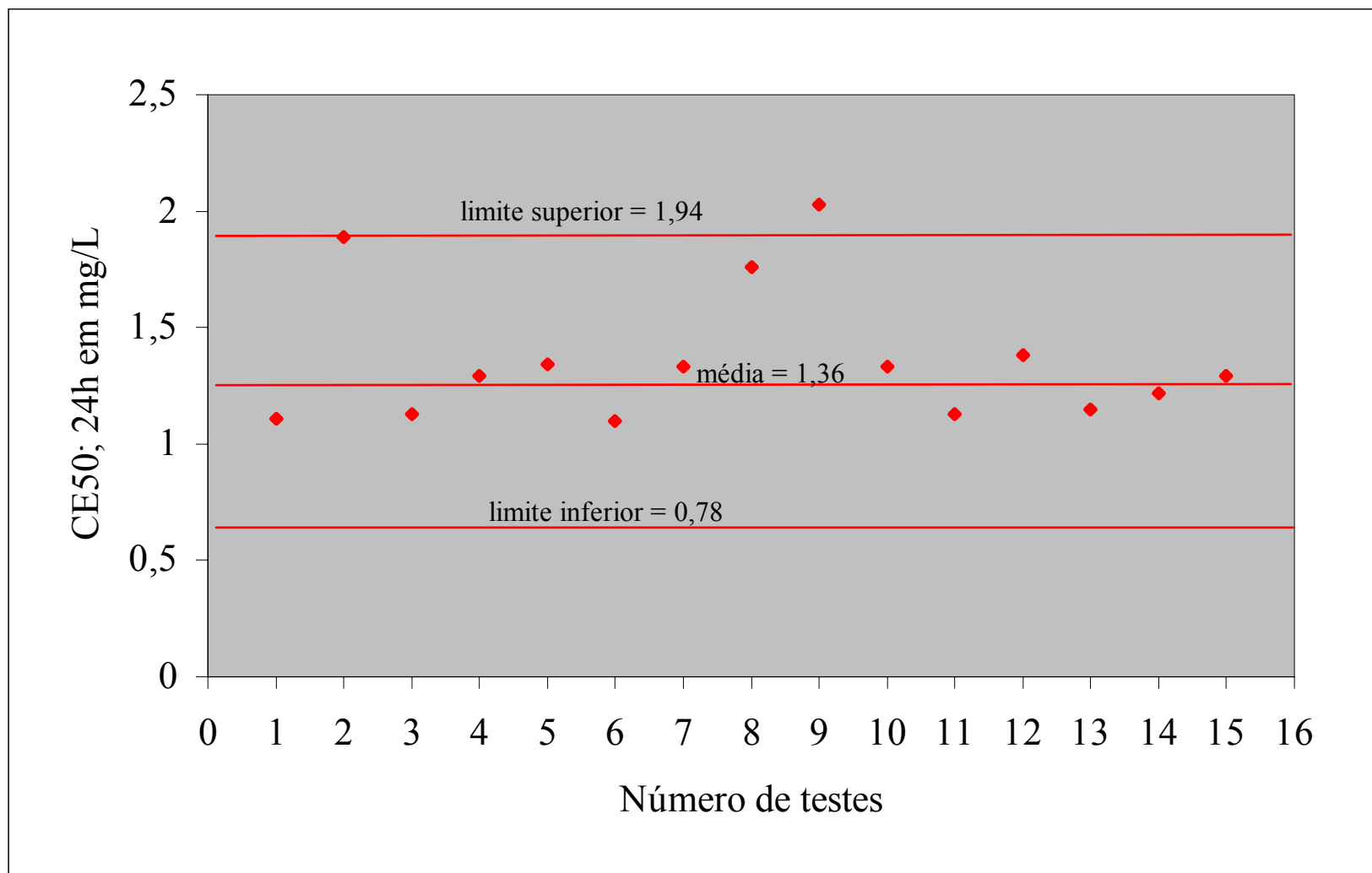


Figura 15: Carta controle de sensibilidade para embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* com base nas CE₅₀- 24h obtidas em testes de toxicidade, utilizando a substância de referência DSS.

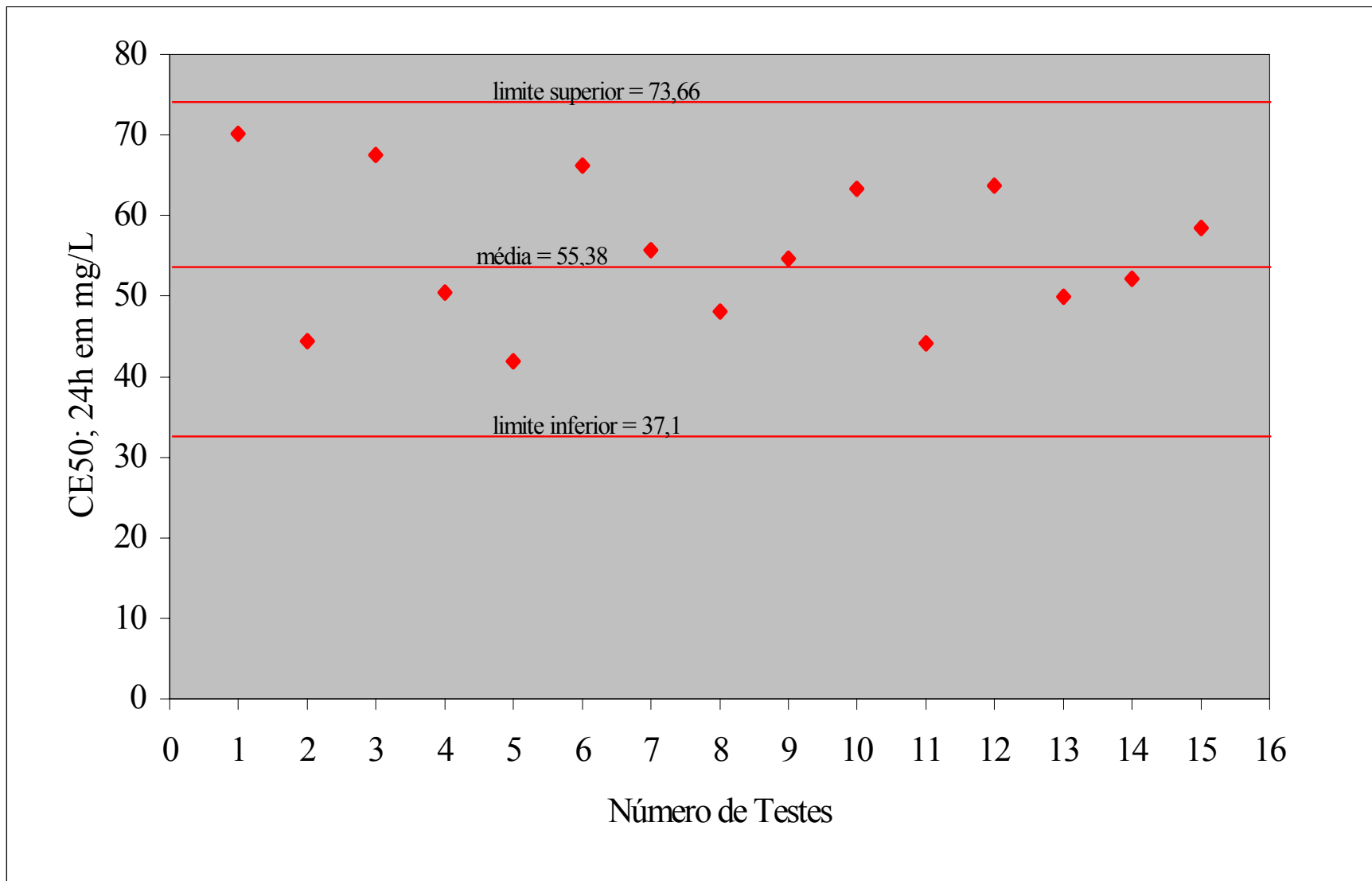


Figura 16: Carta controle de sensibilidade para embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* com base nas CE_{50} - 24h obtidas em testes de toxicidade, utilizando a substância de referência fenol.

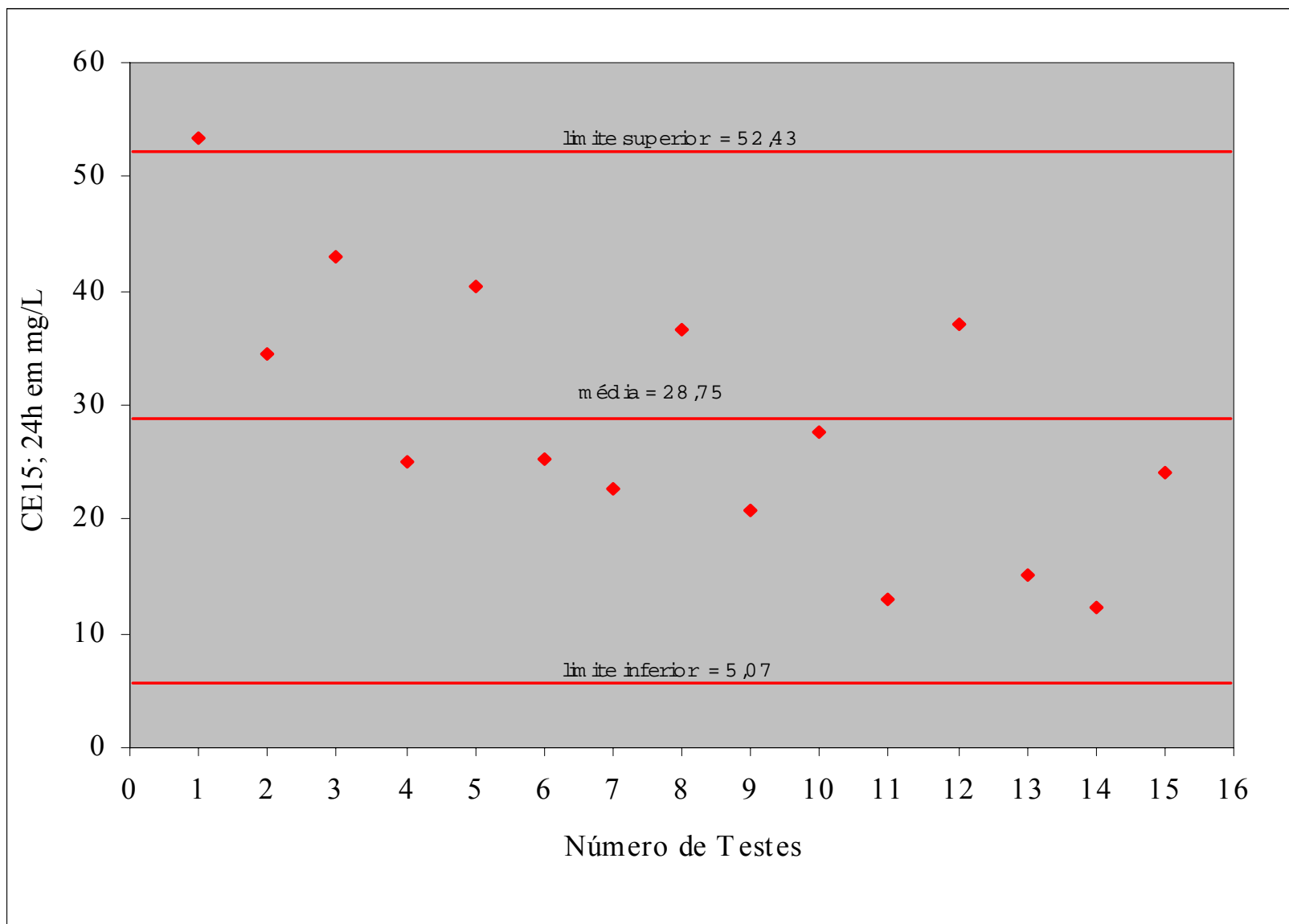


Figura 17: Carta controle de sensibilidade para embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* com base nas CE₁₅- 24h obtidas em testes de toxicidade, utilizando a substância de referência fenol.

4.1.5 – MEDIDAS DE PH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO

A medida dos parâmetros pH e oxigênio dissolvido foram efetuados comomitantemente aos testes de toxicidade; e não apresentaram uma variação expressiva entre as substâncias, com relação aos valores obtidos (Tabela 5).

Tabela 5 – Medidas de pH e oxigênio dissolvido de amostras de testes de toxicidade, com as substâncias de referência utilizadas.

Substâncias	Amplitude	
	pH (mol/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)
Fenol	8,38 – 8,11	4,2 – 3,7
4-clorofenol	8,41 – 8,08	4,2 – 3,1
DSS	8,34 – 8,14	5,5 – 4,4

4.2 – ANÁLISE QUALITATIVA

4.2.1 - AÇÃO TÓXICA DE SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA EM *Crassostrea rhizophorae*.

A análise qualitativa refere-se às observações feitas quanto as anormalidades apresentadas pelas larvas D, submetidas à ação tóxica das substâncias de referência, fenol, 4-clorofenol e DSS, utilizadas nos testes executados.

O comportamento das substâncias orgânicas, em termos de anormalidades apresentadas não difere entre si. De forma geral, apresentam variados tipos de anormalidades, sem o aparecimento de um tipo específico de deformidade associada à um determinado tóxico. As principais anormalidades determinadas pelas substâncias de referência utilizadas no presente trabalho, podem ser visualizadas nas figuras a seguir apresentadas:

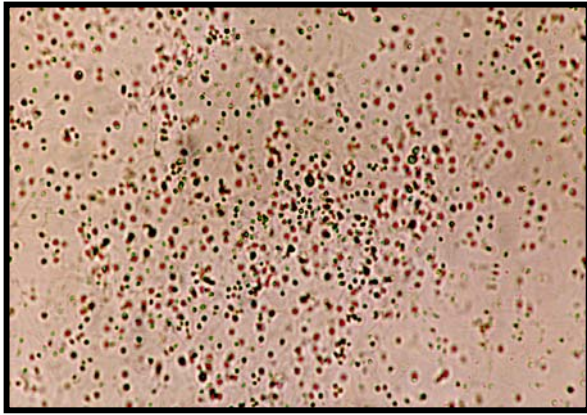


Figura 18: Espermatozoides de *Crassostrea rhizophorae*. Aumento: 200 X.

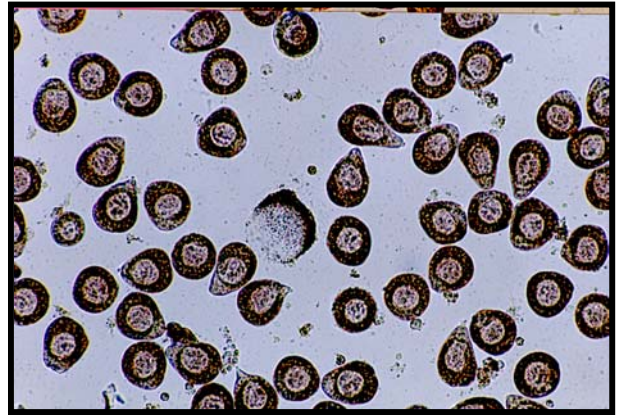


Figura 19: Ovócitos de *Crassostrea rhizophorae*. Aumento: 200 X.

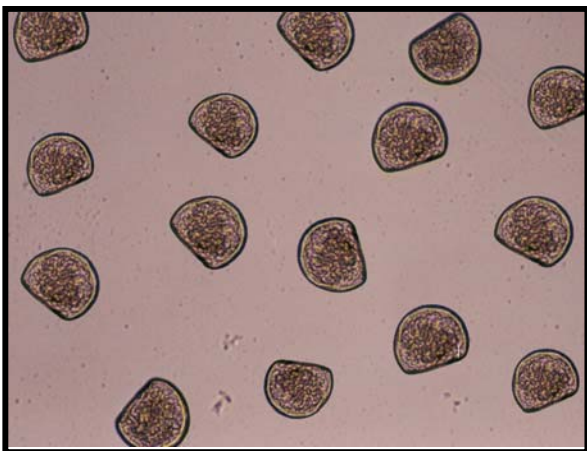


Figura 20: Larvas D normais em amostra de controle de teste de toxicidade com *Crassostrea rhizophorae*. Aumento: 100 X.

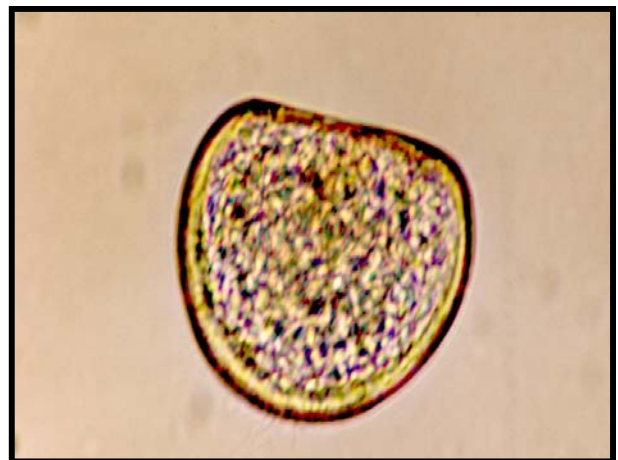


Figura 21: Larva D normal submetida a 10 mg/L da substância de referência 4-clorofenol. Aumento: 400 X.

As anormalidades evidenciadas pelas larvas D, sob a ação tóxica do orgânico fenol, não diferem daquelas apresentadas pelo 4-clorofenol. Normalmente são: deslocamento do manto, extrusão do material interno, reentrâncias e fraturas a nível de concha, dentre outras.

ANORMALIDADES EM EMBRIÕES DE OSTRA *C. RHIZOPHORAE* SOB AÇÃO TÓXICA DO 4-CLOROFENOL

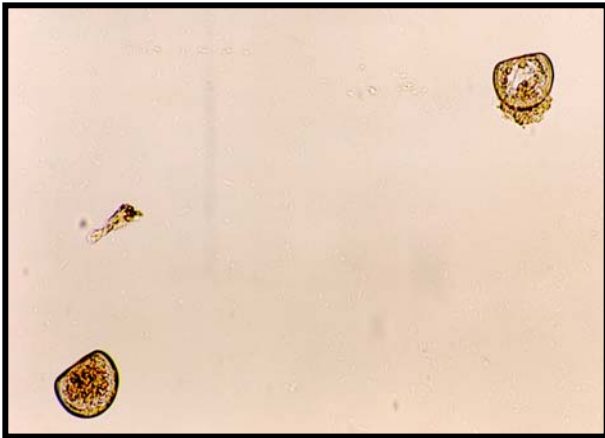


Figura 22: Larvas D normal e anormal submetidas a 15 mg/L de 4-clorofenol, onde se vê extrusão do material interno. Aumento: 100 X.



Figura 23: Larvas D normais submetidas a 22 mg/L de 4-clorofenol. Aumento: 200 X



Figura 24: Larva D anormal submetida a 32 mg/L de 4-clorofenol, apresentando extrusão de material interno. Aumento: 200 X.

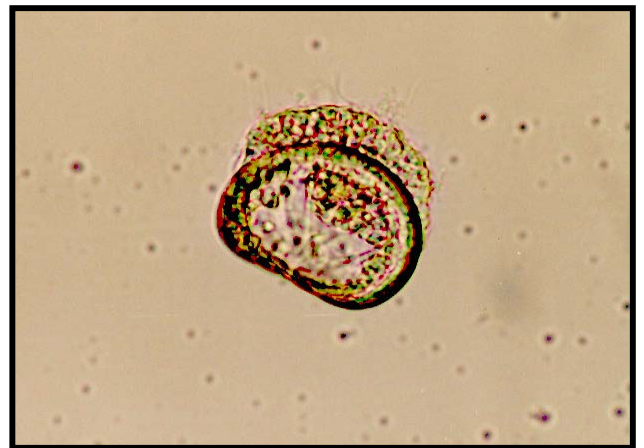


Figura 25: Larva D anormal sob efeito de 46 mg/L de 4-clorofenol, apresenta extrusão de material interno. Aumento: 200 X.

ANORMALIDADES EM EMBRIÕES DE OSTRA C. RHIZOPHORAE SOB AÇÃO TÓXICA DO FENOL

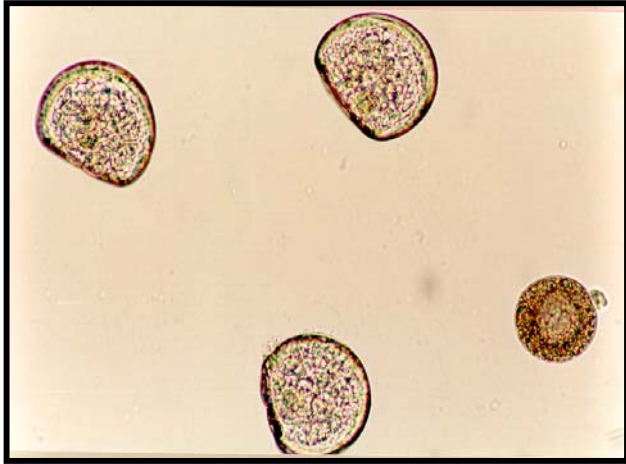


Figura 26: Larvas submetidas a 19 mg/L de fenol. Larvas normais, anormal e ovócito. Aumento: 200 X.

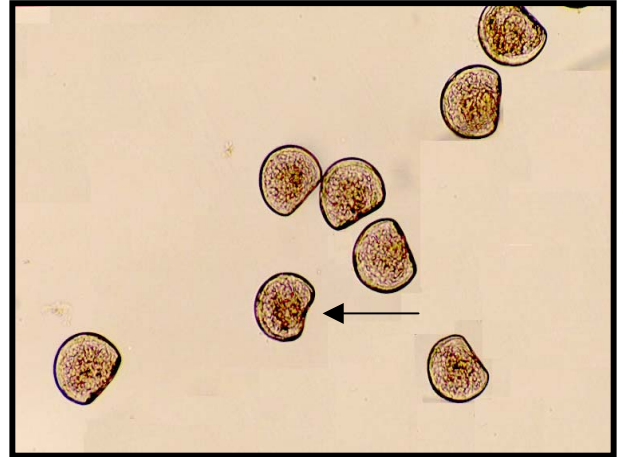


Figura 27: Larvas D normais, larva anormal com depressão na região do umbo. Larvas submetidas a 27 mg/L de fenol. Aumento: 100 X.



Figura 28: Larva D anormal submetida a 27 mg/L de fenol. Observa-se extrusão de material interno. Aumento: 400 X.



Figura 29: Larva D anormal, apresentando extrusão de material interno e deformidade a nível de concha, submetida a 37 mg/L de fenol. Aumento: 200 X

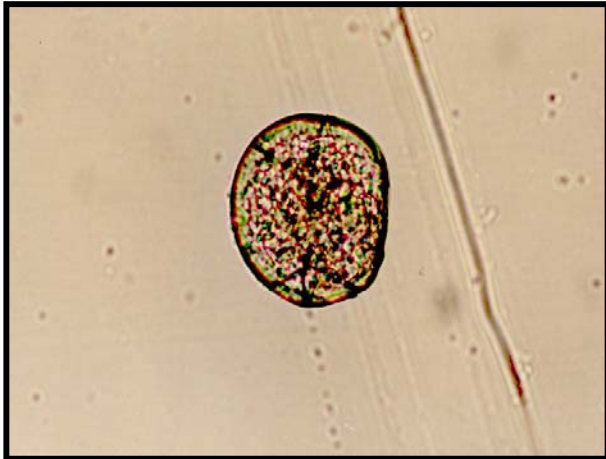


Figura 30: Larva D anormal sob efeito de 52 mg/l de fenol, verifica-se fraturas em torno da concha. Aumento: 200 X.

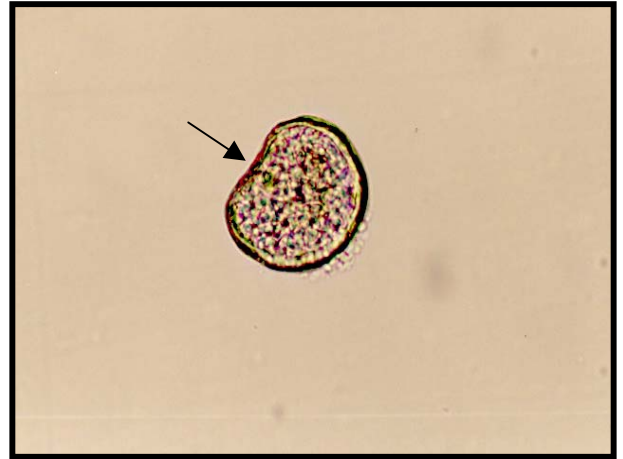


Figura 31: Larva D anormal sob efeito de 52 mg/L de fenol. Verifica-se depressão na região do umbo. Aumento: 200 X



Figura 32: Larva D anormal, submetida a 52 mg/L de fenol, onde se observa fratura na região do umbo. Aumento:400 X.

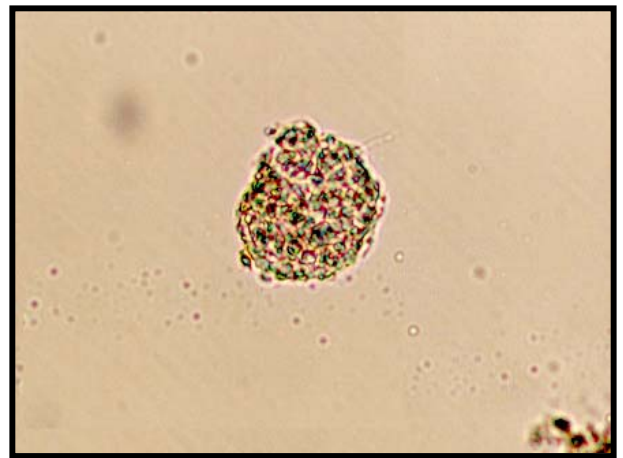


Figura 33: Larva sem concha submetida à ação tóxica de 72 mg/l de fenol. Aumento: 200 X.

ANORMALIDADES EM EMBRIÕES DE OSTRA CRASSOSTREA RHIZOPHORAE SOB AÇÃO TÓXICA DO DSS

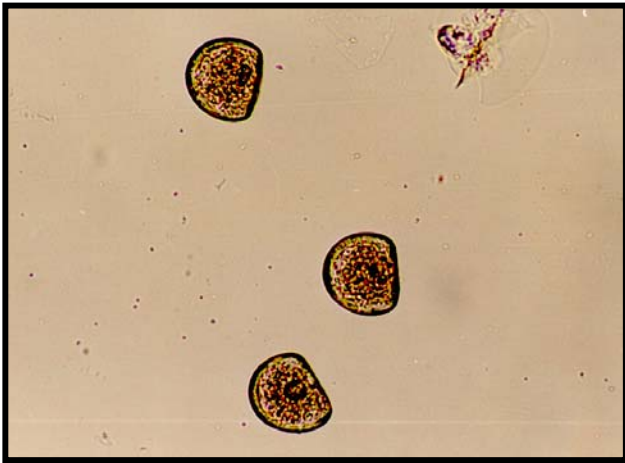


Figura 34: Larvas D normais sob efeito de 0,32 mg/L de DSS. Aumento: 100 X.

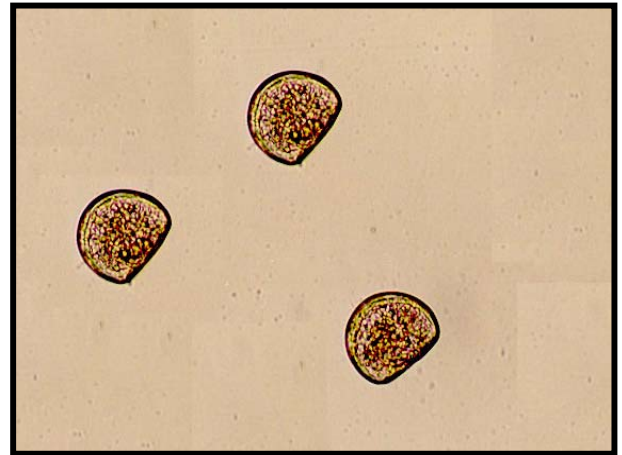


Figura 35: Larvas D normais sob efeito de 0,56 mg/L de DSS. Aumento: 100 X.

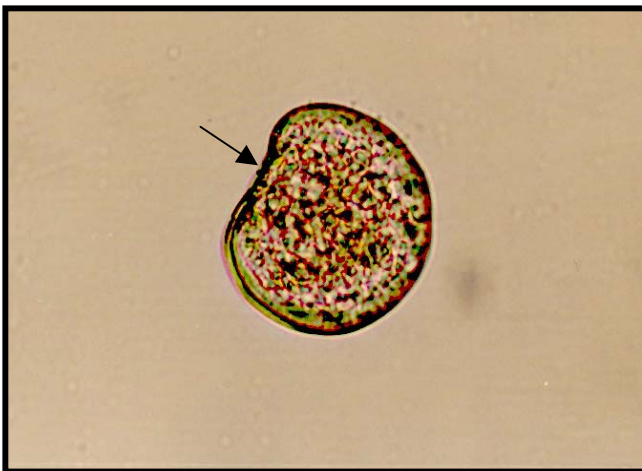


Figura 36: Larva D anormal com leve depressão na região do umbo. Sob efeito de 1,0 mg/L de DSS. Aumento: 400 X.



Figura 37: Larva D anormal, de aspecto disforme, submetida a 1,8 mg/l de DSS. Aumento: 200 X.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO EFETIVA E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

5.1.1 – DSS (DODECIL SULFATO DE SÓDIO)

O DSS é um detergente aniônico que atua ao nível de brânquias, causando inchaço e necrose (Leland & Kuwabara, 1985). É usado como detergente, principalmente na indústria têxtil, e como ingrediente de creme dental, banhos de espuma, cremes emolientes, cremes depilatórios, loções para mãos e xampus.

Algumas evidências mostram que a ação dos surfactantes presentes nos dispersantes, assim como em detergentes, em organismos aquáticos, está associada a sua capacidade em diminuir a tensão superficial das soluções, o que acarreta mudanças na permeabilidade celular (CETESB, 1989).

Resultados encontrados na literatura demonstram que embriões de ostra apresentam uma maior sensibilidade ao DSS que outros organismos testados. Segundo De Araújo et al., (1999), a média das CE_{50-24} horas e o desvio padrão para náuplios de *Artemia salina* em 6 testes realizados foi de 31,61mg/L e 6,25 respectivamente, sendo que o coeficiente de variação foi 19,77%. Em 4 testes realizados com DSS e ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*), foram encontrados valores de 3,03 mg/L e 0,80 para a média das CE_{50-24h} e desvio padrão, respectivamente, e o coeficiente de variação calculado foi de 26,49%. Já os valores encontrados para embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* foram de 1,30 mg/L para a média das CE_{50-24h} e 0,23 para o desvio padrão, sendo o coeficiente de variação calculado de 17,69%.

Testes de toxicidade com DSS utilizando embriões de ostra (De Araújo et al., 1999) apresentaram uma sensibilidade cerca de 30 vezes maior que aqueles com náuplios de *Artemia salina* e três vezes maior que os testes com embriões de ouriço-do-mar. No entanto, outros dados encontrados em literatura divergem dos encontrados por De Araújo et

al., (1999) para *Artemia salina*. Valores médios de CE₅₀-24 horas de 22 mg/L foram encontrados para o mesmo organismo por Veiga et al., (1989).

Segundo a U.S.EPA (U. S. Environmental Protection Agency, 2002) a média das CE₅₀-24 horas obtida em dezoito testes com *Daphnia magna* foi de 16,9 mg/L e o coeficiente de variação 38%. Já a média das CE₅₀-48 horas, obtida em dezenove testes foi de 12,15 mg/L e o coeficiente de variação foi de 31%, evidenciando-se uma maior variação na sensibilidade dos organismos quando expostos a um período de tempo maior.

Ainda com base na U.S.EPA (2002), a média das CE₅₀-24 horas obtida em dezenove testes realizados com *Daphnia pulex*, foi de 16,15 mg/L e o coeficiente de variação, 24%. Os resultados obtidos para um tempo de exposição maior, em dezenove testes realizados, foi de 11,4 mg/L para a média das CE₅₀-48 horas e 34% para o coeficiente de variação.

Para o *Pimephales promelas* a média das CE₅₀-96 horas em nove testes realizados com DSS foi de 8,6mg/L e o coeficiente de variação 20% (U.S.EPA, 2002).

Esses dados concordam com os descritos por De Araújo et al., (1999), onde se confirma a maior sensibilidade dos embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* para o DSS em relação a outros organismos-teste estudados. Também corroboram os resultados obtidos no presente trabalho, onde foram encontrados uma média de 1,36 mg/L para as CE(50) calculadas e 0,69 mg/L para as CE(15), ambas para um período de 24 horas de exposição.

Apesar de não recomendado como substância de referência adequada para todos os casos, o DSS demonstrou boa reprodutibilidade de resultados, condição importante em testes de toxicidade. Com relação à precisão analítica dos resultados do presente estudo, pode-se afirmar que o DSS apresenta respostas apropriadas, para o nível de efeito convencionalmente calculado (CE₅₀-24h), com coeficiente de variação de 21,32%, estando de acordo com o valor recomendado em literatura (< 40%), segundo Environment Canada (1999). Já o coeficiente de variação calculado para o nível de efeito biológico alternativo

(CE₁₅-24h) foi mais elevado (46, 37%), porém, bastante próximo daquele recomendado em literatura como aceitável em testes de toxicidade (Environment Canada, 1999). Valores de CE(15) mais elevados que CE(50) são esperados, uma vez que há uma tendência de maior variabilidade dos resultados em níveis de efeito menores (Bertoletti, 2000).

Os dados apresentados por Bertoletti (2000), utilizando como organismo-teste, o *Danio rerio*, confirmam o resultado obtido neste trabalho para o DSS; segundo aqueles dados os coeficientes de variação mostraram-se mais elevados no nível de efeito de 1%, tanto pelo método do ICp quanto pelo Probitos, ambos em 168 horas de exposição. Segundo o método ICp para o nível de 15% o coeficiente de variação calculado foi de 26%, em contrapartida, para o nível de 1% o C.V foi mais elevado (105%). Quando utilizado o Probitos, esses valores variaram menos, embora mantendo a tendência de coeficiente de variação mais altos em níveis de efeito menores, onde, para 15% de efeito, o C.V foi de 38% e para 1%, foi de 54%.

5.1.2 - FENOL

Os fenóis são compostos orgânicos que, em geral, não ocorrem naturalmente nos corpos de água. A presença dos mesmos, se deve principalmente aos despejos de origem industrial. São compostos tóxicos aos organismos aquáticos, em concentrações bastante baixas e podem causar paralisia do sistema nervoso (Alabaster e Lloyd, 1980). Para o homem o fenol é considerado um grande veneno trófico; quando ingerido causa cauterização no local em que ele entra em contato.

Os testes de toxicidade, tanto crônica quanto aguda, consistem na determinação do potencial tóxico do agente químico ou de uma mistura complexa, sendo os efeitos desses poluentes detectados através das respostas de organismos vivos.

Com referência aos fenóis, os dados de literatura (U.S.EPA, 1980f; Walker, 1988) apresentam discrepância com relação aos valores dos coeficientes de variação encontrados. Há uma variação bastante grande de valores mesmo utilizando o mesmo organismo-teste.

Além disso, a escassez de dados de literatura para o fenol sobre ostras do gênero *Crassostrea* limitam um estudo comparativo; assim, outros organismos-teste foram utilizados para comparar os valores encontrados no presente trabalho.

Segundo a U.S.EPA (1980f) testes agudos utilizando *Daphnia magna* e *Daphnia pulex* (ambas com 5 testes) apresentaram um C.V de 4,9 e 6,5%, respectivamente. Em contrapartida Walker (1988), em testes conduzidos com *Daphnia magna*, encontrou uma variabilidade bastante elevada, um coeficiente de variação de 118%, embora o autor tenha salientado que os testes foram executados em diferentes laboratórios e sob diferentes condições, embora não especificadas.

Ainda utilizando como organismos-teste a *Daphnia magna* foram realizados doze testes agudos num período de três meses, onde o coeficiente de variação encontrado foi de 28% (Environment Canada, 1990). Para o mesmo organismo, uma CL_{50-48h} de 21 mg/L foi calculada (Dowden et al., 1962).

Para testes agudos com peixes, Walker (1988) verificou baixa variabilidade entre testes de toxicidade com fenol, em diferentes laboratórios e sob condições variadas. Para o “Fathead minnow” foi calculado um C.V de 38%, em 10 testes realizados. Para a truta arco-íris o C.V encontrado foi de 39%, em três testes realizados.

A CL_{50-24h} encontrada para embriões de truta foi 5 mg/L de fenol (Albersmeyer & Von Erichsen, 1979). Segundo Mitrovic et al., (1968), as trutas quando submetidas a 7,3 mg/L de fenol em duas horas de exposição; podem sofrer severos danos nas guelras e severas patologias em outros tecidos.

Ainda com relação à testes realizados com peixes, estudos com *Danio rerio*, mostraram uma CL_{50-96h} média de 177,9, 102,6 e 46,6 mg/L para embriões, larvas e jovens, respectivamente (Bertoletti, 2000). Os coeficientes de variação obtidos foram de 11% para embriões e 40% para larvas, ambos em três testes realizados. Para um período de exposição maior, as médias das $CL_{50-168h}$ foram de 98,9, 26,8 e 40,6 mg/L para embriões, larvas e jovens de *Danio rerio*, respectivamente. Os coeficientes de variação

calculados foram de 29% e 26% para embriões e larvas respectivamente, obtidos em três testes executados. Para a fase jovem do ciclo de vida desse peixe, tanto no período de exposição de 96 horas, quanto no de 168 horas, não foram calculados os coeficientes de variação.

Pesquisas realizadas confirmam uma diminuição na viabilidade de ovos em ostras da espécie *Crassostrea virginica* quando os mesmo são submetidos a 2 mg/L de fenol (Davis & Hidu, 1969). O aumento da toxicidade do fenol pode estar relacionado à variações nas condições ambientais, tais como: baixas concentrações de oxigênio dissolvido e aumentos de salinidade e temperatura (EIFAC, 1973).

Em experimentos feitos com 144 horas de duração Meinelt e Staaks (1994) obtiveram valores de CEO (concentração de efeito observado) de 80 mg/L e CENO (concentração de efeito não observado) de 40 mg/L para o fenol, em testes de toxicidade com *Danio rerio*, estes valores foram similares aos encontrados por Bertoletti (2000). Com base nesses valores pode-se inferir que a *Crassostrea rhizophorae* apresenta maior sensibilidade para o fenol que o *Danio rerio*, uma vez que a média das CE₅₀ e CE_{15-24h} encontradas foi de 55,38 e 28,75 mg/L, respectivamente.

No presente trabalho foram calculados coeficientes de variação de 16,50% para o nível de efeito de 50% e 41,18% para o nível de 15%. Numa ampla revisão de literatura, não foram encontrados dados de toxicidade do fenol para *Crassostrea rhizophorae*. Apesar da falta de dados comparativos, pode-se observar que para o nível de efeito de 50%, o coeficiente de variação encontra-se na faixa aceitável de variabilidade recomendada em literatura (valores menores que 40%) segundo Environment Canada (1999). Para o nível de efeito de 15% os valores encontrados foram mais elevados, tendência esperada em níveis de efeitos mais baixos (Bertoletti, 2000).

5.1.3 – 4-CLOROFENOL

Embora tenha seu uso recomendado pelo Environmet Canada (1990) como uma boa substância de referência em testes de toxicidade, o 4-clorofenol ainda é pouco utilizado em testes ecotoxicológicos. Utilizado em menor escala que os metais e alguns orgânicos, o 4-clorofenol tem sido usado com o objetivo de avaliar a saúde dos organismos-teste, bem como a precisão dos testes executados, conferindo a eles, maior confiabilidade.

Poucos dados de toxicidade para esta substância estão disponíveis em literatura, sendo que, para ostra da espécie *Crassostrea rhizophorae*, não existem dados publicados, o que limita uma análise comparativa consistente. Em virtude disso, outros organismos-teste foram utilizados para demonstrar o poder de ação desta substância. O 4-clorofenol apresenta estabilidade em solução; na forma cristalina emite um forte odor, sendo importante uma adequada ventilação local e aparatos de segurança para o manuseio da substância (Environment Canada, 1990).

Dois testes de toxicidade aguda (realizados em diferentes datas) utilizando a truta arco-íris e o peixe “Threespine stickleback” (*Gasterosteus aculeatus*) apresentaram como resultado, um coeficiente de variação de 20% para ambas espécies, embora deva-se ressaltar o fato desse coeficiente de variação ter sido estabelecido com apenas dois testes, número inapropriado para o estabelecimento de coeficientes de variação (Environment Canada, 1990).

Treze testes agudos foram realizados num período de 6 meses utilizando como organismos-teste a *Daphnia magna*, sendo encontrado como resultado, um C.V de 25%. Em seis outros testes realizados também com *Daphnia magna* calculou-se um C.V de 21,7% (Environment Canada, 1990).

No presente trabalho, com relação à precisão analítica dos resultados, foram calculados coeficientes de variação de 19,21% para o nível de efeito de 50% e 28,35% para o nível de 15%. Numa ampla revisão de literatura, não foram encontrados dados de toxicidade para *Crassostrea rhizophorae* em experimentos realizados com 4-clorofenol.

Tanto para o nível de 50 quanto para o de 15%, os coeficientes de variação encontraram-se numa faixa aceitável de variabilidade, ambos com valores menores que 40% (Environment Canada, 1999).

5.2 – AÇÃO TÓXICA DE SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA EM *Crassostrea rhizophorae*

Uma grande variedade de anormalidades foram verificadas como respostas à ação tóxica das substâncias utilizadas como referência (fenol, 4-clorofenol e DSS), durante a execução dos testes de toxicidade. O comportamento das substâncias de referência de natureza orgânica, não difere entre si; as anormalidades que ocorrem não possuem um padrão definido. Tanto o fenol quanto o 4-clorofenol apresentaram anormalidades bem semelhantes, em sua maioria, deslocamento do manto e extrusão do material interno. O DSS (Dodecil Sulfato de Sódio) apresenta alterações ao nível de concha, sendo comum a ocorrência de reentrâncias em torno das conchas, dentre outras anormalidades.

Segundo Nascimento et al., (1989) são considerados anormais: embriões, larvas sem conchas, larvas com conchas incompletamente desenvolvidas e larvas com conchas mal formadas, mesmo completas. Em contrapartida, são consideradas normais: larvas com conchas em forma de D perfeito, conchas vazias com formato de D perfeito e conchas menores com formato de D perfeito.

Além dessas anormalidades, as conchas podem apresentar características definidas, típicas de um tóxico específico. Podem ocorrer extrusão de material interno, abertura das conchas, descolamento do manto, fraturas em torno da concha, valvas com tamanhos diferenciadas, dentre outras deformidades.

5.3 – ANÁLISE COMPARATIVA EM RELAÇÃO AO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

As substâncias de referência estudadas mostraram boa performance na análise da precisão analítica dos resultados dos testes de toxicidade. Os coeficientes de variação encontrados variaram de acordo com o nível de efeito avaliado (50 ou 15%). Para avaliar o nível de efeito de 50% de anormalidade na população, os coeficientes de variação foram calculados, com base nas concentrações efetivas obtidas utilizando o método Trimmed Sperman Karber (Hamilton et al., 1977), para o fenol, 4-clorofenol e DSS estes foram de 16,50, 19,21 e 21,32 % respectivamente. Quando avaliado o nível de efeito de 15%, baseado nas concentrações efetivas resultante da aplicação do método ICp (Inhibition Concentration, Norberg-King, 1993), os valores encontrados foram mais elevados para o fenol (41,18%) e DSS (46,37), permanecendo menor que 40% para o 4-clorofenol (28,35%). Com base nos dados obtidos referentes aos coeficientes de variação, verifica-se que o 4-clorofenol se apresenta como a melhor substância de referência em testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* por apresentar os menores coeficientes de variação, independentemente do nível de efeito selecionado.

Apesar de mostrar boa performance na análise da precisão analítica dos testes de toxicidade executados, e de apresentar características atribuídas a uma boa substância de referência, tais como, toxicidade em baixas concentrações, não seletividade a organismos aquáticos, fácil detecção de anormalidade nas amostras analisadas, e estabilidade em solução, o 4-clorofenol ao ser manuseado, requer a utilização de aparatos de segurança, por se constituir em uma substância tóxica para o homem. Além disso, as instalações laboratoriais devem dar suporte ao uso desse tóxico, possuindo sobretudo uma capela eficiente para evitar a circulação de vapores do referido tóxico. É importante também, destinar corretamente os resíduos resultantes dos testes executados, visando a não contaminação do meio ambiente.

5.4 – ESTABELECIMENTO DE CARTAS CONTROLE DE SENSIBILIDADE

Ao final do presente trabalho foram estabelecidas as cartas controle de sensibilidade dos embriões de *Crassostrea rhizophorae* para as substâncias de referência estudadas. As cartas controle foram elaboradas visando avaliar as oscilações dos valores de CE(50) e CE(15) resultantes de testes de toxicidade. No entanto, os valores obtidos com os testes utilizando o DSS, não permitiram a elaboração da carta controle para o nível de 15% de efeito, isto porque ao calcular o limite inferior (menos 2 desvios padrões), o valor encontrado foi negativo. Este fato indica a elevada variação para o nível de efeito de 15%, conseqüentemente, as CE(15) em alguns casos, não são apropriadas para o estabelecimento de cartas controle de sensibilidade.

Verifica-se nas cartas controle elaboradas, a ocorrência de pontos fora dos limites estabelecidos (± 2 desvios padrões) para o 4-clorofenol e DSS; essa ocorrência se deu no nível de 50% de efeito. Em contrapartida, para o fenol, ocorreu no nível de 15% de efeito. Esse evento denominado de “**outlier**”, pode se dá ao acaso, sendo sua ocorrência prevista em literatura, e serve de alerta para a verificação dos procedimentos técnicos, tais como erro no preparo da solução estoque ou no cálculo das diluições; além disso, pode estar ocorrendo estresse dos organismo-testes ou até mesmo resistência no grupo de organismos testados (Environment Canada, 1990).

Portanto, a ocorrência de “**outliers**” nas cartas controle de sensibilidade elaboradas para a ostra *Crassostrea rhizophorae* não inviabiliza seu uso na avaliação das oscilações esperadas das CE(50) e CE(15) obtidos em testes de toxicidade.

5.5 - ESTABELECIMENTO DO NÍVEL DE EFEITO ALTERNATIVO PARA TESTES CRÔNICOS

Os testes de toxicidade com embriões de ostra são denominados de subcrônicos ou crônicos de curta duração pois fornecem respostas de toda fase embrionária desse organismo (Nascimento et al., 2002; Nascimento et al., 1989).

Apesar de estarem incluídos na categoria de testes crônicos de curta duração ou subcrônicos, os resultados desses testes são expressos em termos de concentração letal CL(50) ou concentração efetiva CE(50), relativos a testes de toxicidade aguda, os quais evidenciam efeitos adversos em 50% da população. Diante da necessidade de se obter respostas que propiciem maior segurança ao meio ambiente, foi proposto no presente trabalho, identificar um nível de efeito alternativo, para expressar apropriadamente, os resultados dos testes de toxicidade com embriões de ostra.

O estabelecimento de níveis de efeito alternativo foi proposto no Workshop de Pellston em 1995 (Grothe et al., 1996), com o objetivo de tornar os métodos ecotoxicológicos mais fidedignos para estimar o impacto de efluentes líquidos em corpos hídricos receptores. Nesse mesmo evento, Chapman et al., (1996) concluíram que através do conhecimento da DMS (Diferença Mínima Significativa entre um tratamento e o controle experimental de um ensaio) seria possível estabelecer o nível de efeito biológico apropriado para cada método utilizado.

O estabelecimento do nível de efeito alternativo foi feito através do cálculo das DMS (Diferença Mínima Significativa), referentes a cada teste de toxicidade realizado com as substâncias de referência em análise (Tabela 6), mediante a utilização do método estatístico Tosxtat 3.3 (Gulley et al., 1991). Posteriormente, os valores das DMS (%) obtidos foram inseridos no aplicativo excel e ordenados de modo a se obter o 75º percentil desses valores. A DMS crítica, valor obtido com base no percentil amostral determinado (75º), foi igual a 16,2 % para os 45 testes de toxicidade realizados com as três substâncias de referência em estudo.

Tabela 6 – Valores das DMS, em %, calculadas para cada substância de referência utilizada em testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*.

N.º de testes	Substâncias de Referência		
	4-clorofenol	Fenol	DSS
1	13,6	13,1	7,5
2	10,6	14,6	11,4
3	8,8	12,4	9,5
4	17	7,4	8,1
5	18,4	16,7	3,8
6	9,8	20,8	13
7	10	8,9	10
8	20	12,3	12,5
9	14,6	16,7	7,8
10	8,5	24,6	7,1
11	16,2	18,8	6,1
12	11,7	8,6	7,9
13	12	14,8	28,3
14	19,9	17,5	10,3
15	12	11,7	2,3

Tendo em vista a conveniência de se utilizar, ao menos, dois métodos estatísticos disponíveis (ICp e Probitos) no cálculo desse nível de efeito, optou-se por estabelecer o nível de 15% de efeito nos testes de toxicidade com *Crassostrea rhizophorae*. Posteriormente ao estabelecimento do nível de 15%, como nível de efeito alternativo, foram calculados os valores das CE_{15-24h} de todos os testes efetuados, através do programa ICp. Com base na média das CE_{15-24h} e do seu desvio padrão foi calculada a precisão analítica, para todas as substâncias de referência, permitindo verificar se o nível de efeito estabelecido (15%) possui variabilidade aceitável, tanto quanto os resultados obtidos para o nível de 50%.

É importante mencionar que o cálculo da DMS crítica, além de ter fornecido a concentração de efeito crônico, permitiu o cálculo da constante de proporcionalidade ($r = 0,85$) para a ostra *Crassostrea rhizophorae*.

Essa constante de proporcionalidade é utilizada em testes de hipóteses por bioequivalência, com o objetivo de avaliar a existência de efeitos tóxicos significativos, em testes com apenas um tratamento (isto é, amostras ambientais), e com isso, evitar tanto “falsos positivos” (efeitos que são estatisticamente significativos, porém não relevantes do ponto de vista biológico), quanto “falsos negativos” (existência de efeitos adversos, porém não detectados), na interpretação dos resultados (Buratini et al., 2002).

Ainda segundo Buratini et al., (2002), os valores das constantes de proporcionalidade podem variar devido à seleção do percentil amostral. Sendo os mesmos, obtidos subtraindo-se os valores relativos ao percentil selecionado, nesse caso, 75º de 100. Para o 75º percentil foram encontrados as seguintes constantes de proporcionalidade (Tabela 7).

Tabela 7 – Constantes de proporcionalidade para diversos organismos aquáticos

Teste de Toxicidade		Constante de Proporcionalidade
<i>Daphnia similis</i>	Teste agudo	r = 0,73
<i>Danio rerio</i>	Teste crônico larval	r = 0,84
<i>Pimephales promelas</i> *	Teste crônico	r = 0,84
<i>Danio rerio</i>	Teste crônico embriolarval	r = 0,83
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Teste crônico	r = 0,72
<i>Lytechinus variegatus</i>	Teste crônico de curta duração	r = 0,88
<i>Mytilus spp</i> *	Teste crônico larval	r = 0,71

* Denton & Norberg-King (1996)

O estabelecimento da concentração efetiva de 15% como apropriado para avaliar a toxicidade crônica em testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*, se constitui numa etapa importante do presente trabalho. Esse nível de efeito (15%) mostra-se eficiente, pois pode assegurar maior proteção às comunidades aquáticas, por evidenciar efeitos adversos em uma percentagem menor de indivíduos, a partir da qual, se começa a observar efeitos deletérios na população.

Além disso, a precisão analítica, verificada através do cálculo dos coeficientes de variação para esse nível de efeito, mostrou-se apropriada para avaliar variabilidade dos dados para o 4-clorofenol, que obteve um coeficiente de variação de (28,35%). Para as demais substâncias, os valores encontrados foram mais elevados (41,18 e 46,37%, para fenol e DSS, respectivamente), embora bastante próximos dos valores recomendados em literatura como ideais (< 40%), segundo o Environment Canada (1999).

6 – CONCLUSÕES

Tendo como base os resultados obtidos a partir dos testes de toxicidade realizados com as substâncias de referência, fenol, 4-clorofenol e Dodecil sulfato de sódio (DSS) e embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* como organismos-teste podemos inferir que:

- Para o 4-clorofenol os coeficientes de variação encontrados tanto para o nível de efeito de 50% quanto para o nível de 15% encontram-se dentro da faixa de variação recomendada em literatura (<40%). Diante disso, pode-se afirmar que ambos os níveis utilizados no presente trabalho são confiáveis para demonstrar precisão analítica dos resultados em testes de toxicidade.
- Em contrapartida, os coeficientes de variação para o nível de 50% de efeito tanto para o fenol quanto para o DSS mantiveram-se menores que 40%. Para o nível de 15% de efeito esses valores foram elevados, inviabilizando seu uso para demonstrar precisão analítica dos resultados em testes de toxicidade.
- O nível de efeito biológico de 15%, estabelecido para embriões da *Crassostrea rhizophorae* expostas às substâncias de referência analisadas, mostrou-se apropriado para indicar a toxicidade crônica em testes de toxicidade.
- As cartas controle de sensibilidade se constituem em ferramenta viável na comparação das CE(50) e CE(15) obtidas em testes de toxicidade com a referida ostra.
- Dentre os agentes químicos testados, o 4-clorofenol apresentou melhor performance como substância de referência nos testes de toxicidade, por apresentar características atribuídas a um bom tóxico de referência.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. D. **Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates.** Journal Fish Biol., 6: 279-298. 1974.

ABESSA, D. M. S., SOUSA, E. C. P. M & TOMMASI, L. R. **Considerações sobre o emprego da Triade de Qualidade de Sedimento em estudo da contaminação marinha.** Rel. Tec. Inst. Oceanogr., (44): 1-12. São Paulo – SP. 1998.

ALABASTER, J. S. & LLOYD, R. **Water quality criteria for freshwater fish.** London. Butterworths. FAO.296 p., 1980.

ALBERSMEYER, W. & L.VON ERICHSEN, 1959. Untersuchungen zur Wirkung von Teerbestandteilen in Abwässern. Mitteilungen, Z. Fisch. 3:29. In: **Quality Criteria for Water**, U.S. EPA, Washington. 1979. p. 183-185.

ALEXANDER, D. G. & R. Mc. V. CLARKE. **The selection and limitations of phenol as a reference toxicant to detect differences in sensitivity among groups of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*),** Water Research,12: p. 1085-1090. 1978.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard guide for conducting static toxicity tests starting with embryos of four species of salt water bivalve molluscs.** In. Annual Book of ASMT Standards. Philadelphia. E 724 – 89. 1989. p. 334-351.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de Efeitos Tóxicos Crônicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae).** 2000. f.117. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo, São Paulo.

BUIKEMA, A.L. JR.; NEIDERLEHNER, B.R. & CAIRNS, J. JR. **Biological monitoring – Part IV – Toxicity testing.** Water Research, 16 (3): 239-262, 1982.

BURATINI, S. V.; PRÓSPERI, V. A.; BERTOLETTI, E. **Levantamento da diferença mínima significativa e sua aplicação ao teste de hipóteses por bioequivalência.** In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 7., 2002, Vitória. Resumos. Espírito Santo, 2002.p. 376, ref.71.

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

CALABRESE, A.; COLLIER, R. S.; NELSON, D. A. & MAC INNES. **The toxicity of heavy metals of embryos of the American oyster *crassostrea virginica***. Mar. Biol., v.18, p. 162-166, 1973.

CETESB – Levantamento de subsídios e instrumentação para o gerenciamento de áreas costeiras ecologicamente sensíveis. Informe final, v.3. p.20. São Paulo, 1989. In: De ARAÚJO, M. M. S. **Testes de toxicidade como mecanismos de biomonitoramento e previsão de impacto ambiental - I - Comparação de sensibilidade de organismos locais ao Dodecil Sulfato de Sódio**. P.11. 1991.

CHAPMAN, G. A. et al. Methods and appropriate endpoints. In: Grothe, D. R.; Dickson, K. L.; Reed-Judkins, D.K. (eds). **Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts**.. Pensacola (FL). SETAC Press, 1996. cap. 3, p. 51-82.

DAVIS, H. C. & H. HIDU. **Effects of pesticides on embrionic development of clams and oysters and on survival and growth of the larvae**. Fish. Bull. 67:393. 1969.

DAVIS, H.C. & CALABRESE, A. **Combined effects of temperature and salinity on development of eggs and growth of *M. mercenaria* and *C. virginica*** U.S. Wildl. Serv. Fish. Bull. 63:643-655. 1969.

DAVIS, J.C. & HOOS, R.A.W. **Use of sodium pentachlorophenate and dehydroabietic acid as reference toxicants for salmínd bioassays**. J. Fish Res. Board Can. 32: 411-416. 1975.

De ARAÚJO, M.M. S. & NASCIMENTO, I. A. **Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de sensibilidade**. Ecotoxicological and Environmental Restoration. Coimbra/Portugal: Inst. Ambiente e Vida 2 (1) : 41-47. 1999.

DENTON, D.L. & NORBERG-KING, T. J. Whole effluent toxicity statistics: a regulatory perspective In: Grothe, D. R.; Dickson, k. L; Reed-Judkins, D. K. (eds). **Whole effluent toxicity testing: an evaluation of methods and prediction of receiving system impacts**. Pensacola (FL). SETAC Press. P. 83-102, 1996.

DEPLEDGE, M.H,. **New approaches in Ecotoxicology: Can inter-individual physiological variability be used as a tool to investigate pollution effects**. Ambio. 19: 251-352. 1990.

DOWDEN, B. F. & BENNETT, H.J., **Journal of water pollution control federation**. Vol. 37, n.º 9, p. 1308-1316, 1962.

EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission) – **Report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water**. EIFAC Technical Paper n.º37, FAO, Roma, 1980.

EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission) – **Water quality criteria for European freshwater fish. Report on mono-hydric phenols inland fisheries**. Water Res. 7:929. 1973.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology**. 1999. E.P.S. 1/RM/34. p.203.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. 1990. E.P.S. 1/RM/12.p. 85.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant**. 1995. E.P.S.1/RM/30, p. 56.

FINNEY, D. J., **Probit Analysis** 3rd ed. Cambridge University. Press. Cambridge. 1971.

FOGELS, A. & J. B. SPRAGUE., **Comparative short-term tolerance of Zebrafish, Flagfish and Rainbow Trout to five poisons including potencial reference toxicants**, Water Research, 11: 811-817. 1977.

FOSSI, M.C. & LEONZIO,C.,. The rational basis for the use of biomarkers as Ecotoxicological tools. In: **Non destructive Biomarkers in Vertebrates**. Fossi, M. C. and Leonzio, C.(eds) Lewis Publishers, p.271-195, 1994.

GHERARDI-GOLDSTEIN et al.,. Procedimento para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo. CETESB/PROCOP. Série Manuais/SMA, 17 p., 1990. In: BERTOLETTI, E. **Estimativa de Efeitos Tóxicos Crônicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae)**. 2000. f.117. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo, São Paulo.

“ GraphPad Software, **Instat guide to choosing and interpreting statistical tests**, 1997, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, www.graphpad.com”.

GROTHE, D.R.; DICKSON, K.L.; REED-JUDKINS, D.K. **Whole effluent toxicity testing: an evaluation of methods and prediction of receiving system impacts**. SETAC Press, Pensacola, Florida. 1996. p. 51-130.

GULLEY,D.D.; BOELTER, A.M. & BERGMAN, H.L. **Toxstat version 3.3** Univ. Wyoming (Laramie/WY/).1991. (programa de computador).

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C. E THURSTON, R. V. **Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays**. Environ. Sci. Tech. 11 (11):714-719, 1977. Correction: 12(4): p. 417. 1978 (programa de computador).

HANMER, R. W., & NEWTON, B. J. Utility of effluent toxicity tests from the U. S. Regulatory perspective. In: **Proceedings of the International Workshop on Biological Testing of Effluents**. Duluth, 1984. Proceedings – OECD/USEPA/Environment Canada, p. 353 – 367. 1984.

KELLY, J. R. & HARWELL, M.A. **Indicators of ecosystem response and recovery**. In: Levin, S. A.; Harwell, M. A.; Kelly, J. R. and Kenmdall, K, P. (eds), p. 9: 35 New York. Spring Vertag. 1989.

LELAND, H.V. & KUWABARA, J.S. Trace metals. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R.(Eds). **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington. Hemisphere Publ. p. 374 – 415. 1985.

LLOYD, R. The toxicity of mixtures of chemicals to fish: an overview of European laboratory and field experience. In: Bergman, H. L., Kimerle, R.A. e Maki, A.W. (Eds.), **Environmental hazard assessment of effluents**. Pergamon Press, Nova York, p.42-53. 1986.

LONG, E. R. & CHAPMAN, P. M.. **A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound**. Mar. Pollut. Bull., 16 (10): 405 – 415. 1985.

LOOSANOFF, V. L., & DAVIS, H.C. **Rearing of bivalve mollusks**. Adv. Mar. Biology (ed. f.s. russel), London Academic Press, 1: 1-136, 1963.

MAC INNES, J.R. & A. CALABRESE. **Combined effects of salinity, temperature and copper on embryos and early larvae of the American oyster *C. virginica***. Arch. Environmen. Contam. Toxicol. 8: 553 – 562. 1979.

MAC INNES, J.R. & A. CALABRESE. Response of embryos of the American oyster *C. virginica* to heavy metals at different temperatures, In: **Physiology and Behaviour of Marine Organisms**, D.S. McLusky and A.J. Berry (eds). Pergamon Press, Oxford, England. 1978. pp.195 – 202.

MARTIN, M.; K.E. OSBORN, P. BILLIG & N. GLICKSTEIN. **Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister*, larvae**. Mar. Poll. Bull. 12: 305 – 308. 1981.

MCKIM, J. M. Early Life Stage Toxicity Tests. In: Rand, G. M. e Petrocelli, S. R. (eds). **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington. Hemisphere Publ. 1985. p. 58-95.

MEINELTE, T. & STAAKS, G. The embryo-larval test with zebrafish (*Brachydanio rerio*): validity limits and perspectives. In: Muller, R. e Lloyd, R. (eds). **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford, FAO/Fish. News Books. P: 167-174, 1994.

MITROVIC et al., **Some pathologic effects of sub-acute and acute poisoning of Rainbow trout by phenol in hard water**. Water Res. 2:249. 1968.

MORRISON, G. et al., **Intralaboratory precision of saltwater short-term chronic toxicity tests**. Journal W. P. C. Fed. 61 (11/12). 1989.

NASCIMENTO, I. A . & LUNETTA, J.E. **Ciclo sexual da ostra de mangue e sua importância para o cultivo**. Bol. Fisiol. Animal. Universidade de São Paulo, 2:63-98. 1978.

NASCIMENTO, I.A. **Biossays of water quality in Aratu Bay, Bahia, Brazil using embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*, Guilding,**

1828. PROC. SIUEC: Planning pollution and productivity. Rio Grande/RS. V.2, p.195-212. 1982.

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; GOMES, M. G. S. et al.. **Ecotoxicological diagnosis of Aratu Bay, Bahia, Brazil: A new approach to validate a reactive short-term toxicity endpoint by comparison with intertidal benthic activity.** In State of Brazilian Aquatic Ecosystem, Journal Aquat. Ecosyst. Hlth. Mgmt. Spec. Issue.v.3, n.4, p. 449-458. 2000a

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A. et al. **Integration varying response of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry.** In: State of Brazilian Aquatic Ecosystem; Journal Aquatic Ecosystem Health and Management. Canada, Special issue, v.3, n.4, p. 485-497. 2000b.

NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.M.; NIPPER, M. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil.** Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda. São Paulo. 2002. cap. VI, p.73-81.

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A. & LEITE, M. B. N. L.. **Standardization, application and validation bioassay methods with embryos of *Crassostrea rhizophorae*, the mangrove oyster for evaluation of tropical estuarine and marine waters.** International Workshop/Salvador- Bahia - Brasil. Mark (U. K.) & UFBA, p.15. Dez/1989.

NEFF, J. M., Use of biochemical measurements to detect pollutant mediated damage to fish. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment.** ASTM STP 854 (ed) R. D. Cordell, R. Purdy, R. C. Bahner p. 155-183. 1984.

NORBERG-KING, T. J. **A linear interpolation method for sublethal toxicity the inhibition concentration (ICp) approach.** Version 2.0 (software). U.S.EPA – Duluth (MN), 1993.

PARRISH, P.R.. Acute toxicity tests. In: Rand, G. M., Petrocelli, S. R. (Eds). **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington. Hemisphere Publishing, p.31-57.1985.

PESSAH, E., P.G. WELLS, & J. R. SCHNEIDER, Dodecyl Sodium Sulphate (DSS) as an Interlaboratory Reference Toxicant in Fish Bioassays, p. 93-121, In: **Second Annual Aquatic Toxicity Workshop**, Ontario Ministry of the Environment, Toronto, Ontario. 1975.

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

RUE, W.J.; FAVA, J.A. & GROTHE, D.R.. A review of inter and intralaboratory effluent toxicity test method variability. In: Adams, W.J.; Chapman, G. A. e Landis, W. G. (Eds). **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10th volume-STP 971**. Philadelphia. ASTM. p.190-203.1988.

SANTOS, A.E.; NASCIMENTO, I.A. **Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828**. Aquaculture, v.47, p. 335-352. 1985.

SERGY, G. A. **Recommendations on aquatic biological tests and procedures for environmental protection, C & PDOE**. Environment Canada, Environmental Protection Technology Development and Technical Services Branch, Edmonton, Alberta. 1987. 102 p. 7app.

SPRAGUE, J.B. Factors that modify toxicity. In: Rand, G. M., Petrocelli, S. R. (Eds). **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington. Hemisphere Publ.1985. p.124-163.

U.S.EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Washington, U.S. EPA - Office of Water . EPA-821-R-02-012. 2002, 266p.

U.S.EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Ambient water quality criteria for phenol**, EPA 440/5-80-066. 1980f.

VEIGA, L. F. et al.,. **Avaliação da faixa de sensibilidade de *Artemia salina* ao Lauril Sulfato de Sódio**. Rio de Janeiro. PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER, 64P. IL. (Projeto 04.05.27). 1989.

WALKER, J. D., **Relative sensitivity of algae, bacteria, invertebrates and fish to phenol: Analysis of 234 tests conducted for more than 149 species**, Toxicity Assessment: An International Journal, 3: 415-447, 1988.

WEBER, C. I. et al.,. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**, 2nd edition, U. S Environmental Protection Agency, EPS/600/4-89/001.1989.

WOELKE, C. E. **Development of a receiving water quality bioassay criterion based upon the 48-hour pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo**. Wash. Dep. Fish. Technical Report 9:93 pp. 1972.