

USP

Campus de São Carlos

VALERIA APARECIDA PRÓSPERI

APLICAÇÃO DE TESTES DE TOXICIDADE COM ORGANISMOS
MARINHOS PARA A ANÁLISE DE EFLUENTES INDUSTRIAIS
LANÇADOS EM ÁREAS ESTUARINAS

ORIENTADORA: DRA. MARION GROSZE NIPPER

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

VALERIA APARECIDA PRÓSPERI

**APLICAÇÃO DE TESTES DE TOXICIDADE COM
ORGANISMOS MARINHOS PARA A ANÁLISE DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS LANÇADOS EM ÁREAS
ESTUARINAS**

DEDALUS - Acervo - EESC



31100036152

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

São Paulo

1993



Class.	Tese - EPSC
Curr.	4603
Tombo	045/94

Engenharia Ambiental

st 0739923

Ao meu pai que pegou um "trem azul" e que com certeza estaria radiante...

À minha mãe e ao meu irmão que são meu porto seguroe,

Ao Edu "clareador das minhas idéias".

AGRADECIMENTOS

À DRA. MARION GROSZE NIPPER, pelo apoio e amizade desde os tempos da "bolsa de aperfeiçoamento" e orientação neste trabalho.

Ao NEEMIAS e ALCIDES que deram o primeiro empurrão para o meu ingresso na carreira científica.

Ao CEBIMar-USP , em especial ao DR. JOÃO EDMUNDO LUNETTA, pela cessão dos laboratórios onde foram realizados todos os experimentos .

Ao VALMIR pelo apoio e tantos incentivos desde a época dos primeiros passos na graduação.

Ao ÁLVARO, grande amigo, sempre disposto para conversas científicas e papos sobre a vida ...além disso obrigada pelo auxílio na confecção das fotografias e pelo que sei sobre "como fotografar em microscópio".

Aos companheiros do Setor de Toxicologia Aquática e Ensaio Biológicos - PEDRO, UDE, ROSALINA e ELENITA onde iniciei minha carreira científica pelo incentivo, crédito e apoio e, em especial, ao EDU BERTOLETTI, grande amigo, parceiro de discussões científicas e "elucubrações mentais", a quem também dediquei esse trabalho.

À DENISE pelo apoio e empréstimo do seu computador nos momentos de "pane geral".

Ao pessoal da Regional de Cubatão, BRUN, PEDRO PAULO e CENEDESI que participaram dos contatos com as indústrias e em especial ao JULIÃO que efetuou as coletas dos efluentes sob chuva ou sol, sempre de bom humor.

À equipe da biblioteca/Cetesb, em especial à ARLETE e MARGO, pelas dicas durante a revisão da bibliografia.

Aos laboratórios de química/CETESB, pela realização das análises químicas.

Aos funcionários e amigos do Cebimar, em especial ao JOSEILTON, MOISÉS, ELSON, e ADRIANO, que me auxiliaram nas coletas dos organismos, mesmo em dia de "mar brabo" e ao Wagnei pelo auxílio na biblioteca.

À Marisa Curi pelo desenho das cubas dos misidáceos.

Às diretorias das indústrias COSIPA e ULTRAFÉRTIL/JARDIM SÃO MARCOS, cujos efluentes foram objeto desse estudo.

Aos amigos que percorreram comigo momentos nem sempre agradáveis, mas cuja presença tornou tudo mais leve... ELIETE, MARISTELA, DERVILE, SYL, MAURO, BIRO, SONIA, MARTA LAMPARELLI, DÉBORA, MILA, CARLOS, MARTA MARQUES, CRISTIANA e SATHIE.

À REGINA, que mesmo sabendo o que significaria "converter meus arquivos", não fugiu da raia e foi meu braço direito durante a impressão deste trabalho.

À "dona" Leide, "seu" Carlinhos, Beto "jacaré" e Carla, meus primeiros e grandes amigos de São Sebastião.

Ao meu irmão, WAGNER, e minha mãe, LOURDES, que sempre seguraram as pontas.

Ao ALBERTO pela paciência, incentivos e sonhos...

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 - ÁREA DE ESTUDO E EFLUENTES ANALISADOS.....	18
2.1.1 - Procedimentos de amostragem.....	19
2.1.2 - Procedimentos com o efluente.....	20
2.1.2.1 - Análises químicas dos efluentes.....	20
2.1.2.2 - Salinização.....	21
2.2 - ESPÉCIES EXPERIMENTAIS	22
2.2.1 - <i>Mysidopsis juniae</i>	22
2.2.2 - <i>Artemia</i> sp.....	23
2.2.3 - <i>Temora stylifera</i> e <i>Acartia lilljeborgi</i>	24
2.2.4 - <i>Lytechinus variegatus</i>	24
2.3 - TESTES DE TOXICIDADE.....	25
2.3.1 - <i>Mysidopsis juniae</i>	26
2.3.2 - <i>Artemia</i> sp.....	28
2.3.3 - <i>Temora stylifera</i> e <i>Acartia lilljeborgi</i>	29
2.3.4 - <i>Lytechinus variegatus</i>	31
2.3.4.1 - Coleta dos organismos.....	31
2.3.4.2 - Obtenção dos gametas	31
2.3.4.3 - Teste para avaliação da taxa de fecundação	32
2.3.4.4 - Teste para avaliação do desenvolvimento embriolarval	34
2.4 - CONTROLES EXPERIMENTAIS.....	35
2.5 - PARÂMETROS CONTROLADOS A CADA TESTE	36
2.6 - SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	36
2.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
2.8 - LAVAGEM DE VIDRARIA	38

3 - RESULTADOS	39
3.1 - TESTES DE TOXICIDADE.....	39
3.1.1 - Ensaios com o efluente da COSIPA	39
3.1.1.1 - <i>Mysidopsis juniae</i>	39
3.1.1.2 - <i>Artemia</i> sp.....	40
3.1.1.3 - <i>Temora stylifera</i> e <i>Acartia lilljeborgi</i>	41
3.1.1.4 - <i>Lytechinus variegatus</i> - testes para avaliação da taxa de fecundação	42
3.1.1.5 - <i>Lytechinus variegatus</i> - testes para avaliação do desenvolvimento embriolarval.....	43
3.1.2 - Ensaios com o efluente da ULTRAFÉRTIL	44
3.1.2.1 - <i>Mysidopsis juniae</i>	44
3.1.2.2 - <i>Artemia</i> sp.....	44
3.1.2.3 - <i>Lytechinus variegatus</i> - testes para avaliação do desenvolvimento embriolarval.....	45
3.1.3 - Análises físico-químicas das soluções-teste	45
3.1.3.1 - Temperatura da água	45
3.1.3.2 - pH	45
3.1.3.3 - Oxigênio dissolvido.....	46
3.1.3.4 - Salinidade	47
3.1.4 - Variabilidade dos efluentes	47
3.1.5 - Testes com substâncias de referência	48
3.1.6 - Análise do efeito do uso de salmoura sobre os organismos-teste, nas diferentes salinidades	49
3.1.7 - Influência da salinidade sobre a toxicidade da substância de referência	50
3.2 - ANÁLISES QUÍMICAS	51
3.2.1 - Efluente da COSIPA.....	51
3.2.2 - Efluente da ULTRAFÉRTIL.....	51
4 - DISCUSSÃO	53
5 - CONCLUSÕES	74
6 - RESUMO	76
7 - SUMMARY	77
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
TABELAS	96
FIGURAS	109
ANEXOS	119

1. INTRODUÇÃO

Através das gerações, desde as mais primitivas culturas, foram reunidas informações a respeito de fenômenos tóxicos indicativos do que deve ser evitado pelo homem, ao se alimentar. Da mesma maneira os animais possuem alguma experiência e evitam algumas plantas que possam causar dano à sua saúde. Ao lado desses fenômenos que há milênios controlam o equilíbrio biológico da fauna e flora, os fenômenos tóxicos artificialmente criados pelo homem tem aumentado desde o início da era industrial (AUBERT, 1975).

No Brasil, esse processo tornou-se acentuado a partir da década de 30, com a incorporação de novas técnicas de produção, pois até essa época a economia brasileira baseava-se fundamentalmente na produção agrícola (SILVA, 1978).

Como parte integrante do desenvolvimento de novas tecnologias e do processo de industrialização, surgiram os focos populacionais e o crescimento das cidades e sua urbanização. Todo esse desenvolvimento gera, conseqüentemente, uma quantidade cada vez maior de substâncias de características diversas, cujo destino final é o ambiente.

O número de substâncias sintetizadas pelo homem tem aumentado de uma maneira quase exponencial. Em 1960 haviam sido descritas cerca de um milhão de substâncias químicas e em 1980 se conheciam cinco milhões (ALBERT & GARCIA, 1985). Grande parte desses agentes químicos apresenta potencial para penetrar no meio ambiente (MAKI & BISHOP, 1985), sendo que é necessário considerar que o efeito da poluição num ambiente aquático pode

variar, pois depende do volume e características do próprio efluente e do corpo receptor em que ele flui (MACKENTHUM, 1973).

O destino e o efeito dos agentes tóxicos nos ecossistemas são abordados através da Ecotoxicologia, que é o estudo dos efeitos tóxicos na biota - particularmente nas comunidades e populações - e sua interação com os processos que controlam o funcionamento de ecossistemas definidos (BURTON, 1990).

Grande ênfase tem sido dada aos ambientes 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, 1992a).

Por serem receptores de uma grande carga poluidora oriunda das mais diversas fontes antropogênicas, existe hoje um grande esforço no sentido de se conhecer e encontrar formas de preservação desses ambientes. Embora nos diferentes ambientes naturais existam comunidades adaptadas capazes de suportar as condições existentes, bem como suas flutuações naturais (TOMMASI, 1979), a mudança nos fatores ambientais, como a introdução de compostos químicos, pode induzir alterações na sua estrutura e acarretar situações críticas, dizimando diferentes organismos.

Quando duas substâncias químicas são dissolvidas e misturadas, permanecerão com suas identidades ou combinarão. No primeiro caso, substâncias químicas individuais manterão sua forma original e agirão independentemente ou juntamente nos sítios receptores dos organismos podendo produzir uma ação tóxica maior, menor ou igual à soma dos efeitos

individuais. Quando se combinam a ação tóxica é modificada (ANDERSON & D'APOLLONIA, 1978).

Os organismos respondem individualmente e expressam o efeito através do comportamento, bioquímica ou fisiologicamente, e a resposta conjunta desses organismos pode acarretar uma modificação da população e da comunidade. Nesse sentido, o próprio ecossistema é alterado, porque os organismos individualmente controlam o estado e processos da mudança dos ecossistemas (NEUHOLD, 1985).

O risco de bioacumulação de contaminantes, efeitos crônicos que podem comprometer processos biológicos e os efeitos agudos que podem levar à morte uma série de organismos num curto espaço de tempo, necessitam de estudo, avaliação e proposição de medidas preventivas e/ou corretivas.

Até meados da década de 80, a caracterização dos poluentes foi efetuada, predominantemente, através de análises físicas e químicas. Em função dessa caracterização, os órgãos de controle da poluição têm exigido a adequação dos parâmetros que, eventualmente, não atendam à legislação vigente. No entanto, alguns estudos demonstraram que o atendimento aos padrões da legislação, em termos de análises físicas e químicas, não é suficiente para evitar a toxicidade de um efluente líquido a organismos aquáticos (BERTOLETTI, 1990a).

Considerando a existência de um reduzido número de substâncias químicas cujos efeitos sobre a biota sejam bem conhecidos, a utilização da concentração de contaminantes tóxicos como forma de controle poderá, ainda, não ser satisfatória. Por exemplo, efluentes industriais complexos, oriundos de processos industriais, ao entrar num corpo receptor podem conter uma grande

variedade de substâncias. Essas substâncias podem ser mascaradas ou ocorrer em tão baixas concentrações que não poderão ser determinadas pela análise química (AUBERT, 1975), de tal forma que monitorar a qualidade da água somente por esse tipo de análise torna-se insuficiente.

Um instrumento importante no controle do ambiente aquático, que considera o efeito da somatória das condições ambientais sobre organismos ecologicamente representativos, é o teste de toxicidade.

Ao tentarmos estabelecer uma relação de causa e efeito quando observamos, num corpo d'água, grande número de organismos adversamente afetados, temos em mente o resultado de um teste de toxicidade. O resultado, obtido por esse tipo de avaliação, está vinculado à capacidade natural dos organismos suportarem o estresse a que estão submetidos no seu ambiente.

Esses testes podem ser utilizados para responder muitos tipos de questões (SPRAGUE, 1973; BRUNGS & MOUNT, 1978; MACEK, 1980; REISH, 1987):

- 1 - O material é letal ao organismo teste e em que concentração?
- 2 - Quais são os efeitos de uma substância tóxica sobre os organismos expostos a concentrações subletais por parte ou todo o ciclo de vida?
- 3 - Qual organismo é mais sensível?
- 4 - Sob quais condições os despejos são mais tóxicos?
- 5 - A toxicidade pode mudar quando o material entra no ambiente?

6 - Em que grau o recurso hídrico é afetado, seja por meio de liberações acidentais ou episódicas?

Prestam-se, ainda, para:

1 - Determinar quais componentes do despejo são tóxicos

2 - Monitorar a qualidade de um despejo existente ou do corpo hídrico

3 - Identificar limites aceitáveis para uma emissão segura

Desde o início da década de 30, testes de toxicidade aguda foram conduzidos para estabelecer essa relação de causa e efeito entre a presença de contaminantes químicos na água e o que ocorria com as populações de peixes de água doce. Os estudos iniciais usaram espécies convenientes e posteriormente uma variedade de organismos começaram a ser utilizados, demonstrando que diferentes espécies apresentavam diferentes respostas diante de exposições agudas a substâncias químicas (MACEK, 1980).

Testes com organismos marinhos, para os quais os protocolos científicos dos testes com água doce foram adaptados, tiveram início posteriormente e foram expandidos a partir da década de 70 (REISH, 1987).

SAMOILLOFF & WELLS (1984) mencionam que, de maneira geral a ecotoxicologia marinha e de água doce são similares. A ecotoxicologia marinha estuda o impacto da atividade humana nos ecossistemas marinhos e tem como objetivo manter a qualidade desse ambiente, em associação com o crescimento econômico e tecnológico das nações envolvidas.

Segundo esses autores um maior número de atividades com água doce foi realizado até então, porque os efeitos tóxicos relacionam-se mais rapidamente com a saúde humana, aspectos econômicos e ecológicos, enquanto que os efeitos estéticos são considerados secundários. Já na ecotoxicologia marinha, onde não ocorre o uso direto da água para consumo, somente uma drástica contaminação causará um efeito direto na saúde humana, sendo mais ênfase dada para as consequências estéticas e econômicas.

Os testes de toxicidade, em laboratório, podem ser agudos ou crônicos. Nos testes de toxicidade aguda, o organismo é exposto durante curto período de tempo, geralmente 48 a 96 horas, a concentrações elevadas de um agente tóxico. Esses testes podem fornecer resultados rápidos e reproduzíveis, com curvas de concentração-resposta, para identificar e estimar os efeitos de substâncias químicas a organismos aquáticos.

Os efeitos tóxicos podem ser caracterizados através da letalidade, imobilidade, inibição do crescimento, alteração do comportamento ou da reprodução, anomalias, etc. A imobilidade ou letalidade são os parâmetros observados nos testes de toxicidade aguda, enquanto que os demais parâmetros, considerados subletais, são avaliados nos testes de toxicidade crônica.

A necessidade de testes mais rápidos, com menor custo e testes mais sensíveis para determinar concentrações ambientais seguras para substâncias químicas tóxicas foi evidenciada através da publicação do Toxic Substances Control Act, em 1976, que considerou a produção estimada de 1000 novas substâncias químicas a cada ano. Através da solicitação, à "Environmental Protection Agency (USEPA)" e indústrias, da avaliação de impacto ambiental de novos produtos químicos antes da produção comercial, as pesquisas nos

EUA passaram a se dirigir para a contemplação dessa solicitação (McKIM, 1985).

Para o desenvolvimento inicial dos testes de toxicidade crônica considerava-se que todo o ciclo de vida do organismo deveria ser avaliado. Em função da própria biologia dos organismos utilizados em testes, cujos ciclos de vida muitas vezes duravam mais do que 12 meses, foram realizados estudos para se verificar a possibilidade de se efetuar testes com determinados estágios do ciclo de vida, considerados mais sensíveis.

Surgiram então os testes de toxicidade crônica de curta duração, inicialmente com peixes que, de acordo com alguns estudos efetuados com agentes químicos selecionados apresentam os estágios iniciais como os mais sensíveis no ciclo de vida (PICKERING & THATCHER, 1970; McKIM *et al.*, 1978).

No Brasil, a partir da década de 70, através da implantação na CETESB de um laboratório de ensaios biológicos, foram desenvolvidos e padronizados testes de toxicidade com organismos de água doce (NAVAS-PEREIRA *et al.*, 1987). Esses testes, com organismos de água doce, têm sido utilizados em vários estudos, como instrumento de controle da qualidade de efluentes líquidos.

WFO
→ Posteriormente, testes com organismos marinhos começaram a ser desenvolvidos, implantados e normalizados nesta Companhia (PRÓSPERI & NIPPER, 1989a,b; NIPPER *et al.*, 1990, 1991, 1992, 1993; NIPPER & PRÓSPERI, 1992,1993; CETESB, 1992a,b). Entretanto, não existem

disponíveis, até o momento, testes com organismos autóctones para avaliação de efeitos tóxicos em áreas estuarinas.

Sendo uma região de mistura de água doce e salgada, os estuários possuem uma complexidade não encontrada nos demais ambientes aquáticos, apresentando: 1) uma elevada proporção de larvas de espécies bentônicas no plâncton; 2) migrações estacionais e com correntes de maré, de muitos peixes e invertebrados; 3) oscilações de correntes de maré, ocorrência de mecanismos de misturação, e de gradientes de concentração de sais devido a diferentes taxas de diluição; 4) uma excepcional importância das espécies sésseis (TOMMASI, 1979).

Diversos ecossistemas, altamente produtivos sob o ponto de vista de recursos naturais renováveis, podendo ser citadas as áreas de mangue, estuários, planícies inundáveis, são encontrados nas regiões litorâneas e costeiras do Brasil.

Os estuários são, ainda, reconhecidos como áreas altamente férteis, sendo criadouros naturais de espécies continentais e marinhas (FERREIRA, 1979; DeWITT *et al.*, 1989). Grande parte da população humana que reside ao redor dessas regiões, sobrevive da pesca ou da exploração dos demais recursos existentes. Sendo ambientes confinados, qualquer agressão sobre os mesmos afeta fortemente a comunidade biológica e diretamente as atividades pesqueiras que apresentam grande importância econômica.

DAY *et al.* (1989) identificam quatro categorias gerais de impacto em ecossistemas estuarinos: enriquecimento através de material orgânico, nutrientes inorgânicos ou calor; alterações físicas; mudança direta na estrutura

da comunidade através de coleta ou introdução de espécies exóticas; introdução de materiais tóxicos.

Segundo USEPA (1973), a adição de poluentes nos ecossistemas estuarinos provoca efeitos diversos sobre a biota, dentre os quais :

- 1 - redução do influxo de energia para o ecossistema;
- 2 - aumento do influxo de matéria orgânica e de nutrientes;
- 3 - ocorrência de condições extremas intoleráveis a certos organismos;
- 4 - redução do desempenho de indivíduos, devido à toxicidade crônica;
- 5 - interferência no fluxo de energia da cadeia alimentar;
- 6 - redução da diversidade e biomassa.

Portanto, esses ambientes, como receptores de despejos de rios, cidades e indústrias ao longo de suas margens, são imediatamente mais suscetíveis a prejuízos do que qualquer outro tipo de ecossistema costeiro.

Desta forma, além das condições ambientais naturalmente difíceis às quais os organismos estuarinos são expostos, a ação do homem vem colaborando para o agravamento da sua situação (TOMMASI, 1979).

Diversas atividades humanas realizadas ao redor de estuários ou áreas costeiras têm ocasionado sérios problemas de contaminação (WAGENER, 1990; TOMMASI, 1990), sendo que a introdução de despejos industriais e domésticos é um problema em ascensão.

Desde o início da colonização tem ocorrido a ocupação da faixa litorânea brasileira, "inicialmente para as atividades portuárias, voltadas ao suporte de um modelo primário-exportador. A fase de industrialização, marcada pelo esgotamento do modelo precedente, conduziu a uma intensificação no uso dos ecossistemas litorâneos, principalmente os lagunares e estuarinos, mediante a implementação de projetos industriais. Além disso houve a ampliação de portos e terminais para escoamento de produtos agrícolas e minérios, sua integração aos grandes complexos minero-siderúrgicos, químicos e petroquímicos, caracterizados por indústrias pesadas" (DIEGUES, 1988).

Segundo este autor, a degradação dos ecossistemas litorâneos é mais forte quando um processo desordenado da urbanização, que gera poluição por esgotos domésticos, corte de vegetação de mangue, etc. se associa à implantação de polos químicos situados em geral em distritos industriais. Nestes casos, a forte degradação ambiental ameaça tornar-se crônica, de caráter irreversível, a exemplo da região carboquímica de Santa Catarina, Baía de Todos os Santos, Baía da Guanabara, região estuarina de Vitória, e a região estuarina de Santos-Cubatão.

Avaliando as águas desta última região, a caracterização química completa de águas que recebem efluentes domésticos e industriais de várias naturezas torna-se praticamente inviável técnica e economicamente, devido principalmente à elevada quantidade e complexidade de agentes químicos presentes (ZAGATTO *et al.*, 1985).

A região do estuário de Cubatão vem sendo impactada por despejos de efluentes desde o início do século. As atividades industriais iniciais de Cubatão

estavam ligadas à cana-de-açúcar e olarias, e foram posteriormente substituídas pelos curtumes, que também desapareceram e encerraram a fase primária da indústria nesta região (BRANCO & SÁ, 1974).

A partir de 1926, com a instalação da Usina da Light, a implantação do Parque Industrial foi facilitada e a inauguração da Refinaria Presidente Artur Bernardes representou um marco na formação do atual complexo petroquímico.

Em 1963, a Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA) veio incrementar a base industrial em formação, enquanto que a Ultrafertil S/A - Indústria e Comércio de Fertilizantes foi fundada em 1968 e inaugurada em 1970.

A CETESB já realizou trabalhos em áreas próximas ao estuário do Rio Cubatão (CETESB, 1978; BOLDRINI *et al.*, 1990) e, particularmente no período de 1984 a 85, foi desenvolvido um projeto para avaliação da toxicidade das águas, sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão (ZAGATTO *et al.*, 1986). Um dos resultados do referido projeto revelou que a COSIPA era responsável pela maior carga tóxica lançada ao ambiente e, juntamente com a ULTRAFÉRTIL somavam uma contribuição em termos de porcentagem relativa de carga tóxica, de 56,2%, sendo que a maior parte dos efluentes da primeira indústria e o volume total da segunda são lançados diretamente no estuário.

Como já foi mencionado, devido à indisponibilidade de organismos estuarinos autóctones e, tendo como base um princípio da toxicologia aquática, que se refere ao fato de que um único organismo ou ciclo de vida não pode responder a todas as questões a respeito da segurança de uma dada substância, foram efetuados no presente trabalho, testes com organismos marinhos, dentre

os quais três tipos de teste de toxicidade aguda com crustáceos incluindo os copépodos *Acartia lilljeborgi* e *Temora stylifera*, o misidáceo *Mysidopsis juniae* e o branquiópodo *Artemia* sp, e dois tipos de testes de toxicidade crônica de curta duração com o equinodermo *Lytechinus variegatus*.

Essas espécies foram escolhidas com base em estudos anteriores (NIPPER *et al.*, 1990, 1991), que por sua vez foram baseados na literatura internacional.

Gametas e embriões de ouriços tem sido utilizados como sistema biológico básico para pesquisa por fisiologistas, bioquímicos e biólogos experimentais desde meados de 1800 (GIUDICE, 1973; MONROY, 1986).

DINNEL *et al.* (1988) cita que a utilização de alguns estágios do ciclo de vida, especialmente gametas e embriões, em testes ecotoxicológicos foi estabelecida por diversos pesquisadores que investigaram os efeitos de metais na fertilização e desenvolvimento, nas décadas de 20 e 30. Segundo KOBAYASHI (1971) essas fases são críticas para o crescimento normal dos ouriços e sensíveis para detectar efeitos da poluição em ambientes marinhos.

A expansão da utilização desses organismos ocorreu devido à sensibilidade, facilidade de obtenção de gametas, baixo custo, rapidez na execução dos experimentos e ocorrência cosmopolita (DINNEL & STOBER, 1985; KOBAYASHI, 1984). Uma grande variedade de métodos utilizando células espermáticas e/ou embriões frente a muitas substâncias, que incluem metais (LILLIE, 1921; HOADLEY, 1923; KOBAYASHI, 1977, 1980, 1981; DINNELL *et al.*, 1989), petróleo (ALLEN, 1971; CHIA, 1973; LONNING & HAGSTRÖN, 1975; STRAUGHAN, 1976), óleos e dispersantes

(KOBAYASHI, 1981), esgotos municipais (MUCHMORE & EPEL, 1973; DINNEL *et al.*, 1981; 1987) passou a ser utilizada devido a esses motivos.

DINNEL *et al.* (1981) em uma comparação dos resultados de testes com equinodermos, com dados previamente obtidos em vários ensaios com peixes, evidenciaram que esses organismos mostraram-se cerca de 5 a 10 vezes mais sensíveis a efluentes de estação de tratamento de esgotos clorados, reafirmando a alta sensibilidade dos testes realizados com equinodermos.

A padronização de metodologias utilizando equinodermos já existe em países como os EUA (USEPA, 1988, 1992), Canadá (EPS, 1991), e, mais recentemente no Brasil, através da norma L5.250 elaborada na CETESB (1992b), que indica o uso do teste crônico de curta duração com embriões de *Lytechinus variegatus*.

Em seu trabalho sobre testes ecotoxicológicos marinhos com zooplâncton, WELLS (1984) faz um apanhado dos principais grupos taxonômicos utilizados. Dentre os crustáceos, são citados os outros três grupos com os quais foram executados experimentos no presente projeto - náuplios de *Artemia* sp, copépodos e misidáceos.

Experimentos toxicológicos com misidáceos começaram a ser realizados também na década de 70. ANDERSON *et al.* (1974) demonstraram, através de testes estáticos, que a espécie *Mysidopsis almyra* foi a mais sensível dentre 5 espécies de peixes e crustáceos utilizadas, a extratos solúveis de óleos crus e refinados.

Em uma avaliação do potencial de utilização de crustáceos em testes de toxicidade, em função da grande variedade de métodos desenvolvidos com organismos desta classe, GENTILE *et al.* (1984) também apontaram a Família Mysidae como favorável, devido à facilidade de manutenção e cultivo em laboratório, e sensibilidade a uma variedade de substâncias.

A revisão efetuada por NIMMO & HAMAKER (1982) sobre misidáceos, já apontava sua larga utilização na toxicologia aquática, em testes de toxicidade aguda e crônica e ainda indicava sua utilização no futuro, para avaliação da qualidade de sedimento e estudos de comportamento.

Considerando seu curto ciclo de vida, de cerca de 25 dias a 15°C para *Mysidopsis bahia* (GENTILE *et al.*, 1984) ou 16 a 18 dias a 25°C para *M. juniae* (BADARÓ-PEDROSO, 1993), mostram-se como organismos que se prestam à utilização em testes de toxicidade crônica. Segundo o primeiro autor, essas vantagens têm reforçado seu uso em programas especificamente designados para relacionar efeitos a curto e longo prazo.

A UNEP(1989) através das suas publicações que fornecem métodos de referência para estudos de poluição marinha, padronizou metodologia para utilização de crustáceos, indicando entre eles os organismos da ordem Mysidaceae. Os EUA, através da U.S. Environmental Protection Agency, adotou em seus protocolos a utilização de *M. bahia* (USEPA, 1988, 1991a, 1992). Essa tem sido uma das espécies mais extensivamente utilizadas em experimentos ecotoxicológicos para estudo e subsequente regulamentação de despejos de fontes pontuais de poluentes em corpos d'água marinhos e estuarinos (WARD, 1989).

No nosso país, através da norma L5.251 (CETESB, 1992a), foi padronizada a metodologia para teste de toxicidade aguda com crustáceos misidáceos da espécie *Mysidopsis juniae*.

Com relação aos copépodos, existem muitos estudos devido à sua importância ecológica, fácil manutenção, cultivo e testes com um grande número de gêneros (WELLS, 1984).

Muitos organismos do zooplâncton, dentre os quais os copépodos, são fonte alimentar primária de várias espécies de peixes e de estágios larvais de outras espécies. Elevadas concentrações de substâncias químicas podem resultar no desaparecimento de alguns peixes, mesmo não sendo afetados diretamente, uma vez que sua fonte alimentar pode ter sido extinta (BAUDOUIM & SCOPPA, 1974).

SOSNOWSKI & GENTILE (1978) compararam populações de copépodos naturais e cultivadas em laboratório, frente ao cádmio, cobre e mercúrio e os resultados para as duas primeiras substâncias indicaram não haver diferença entre as populações, enquanto que os dados com mercúrio mostraram pequena variação e a comparação revelou-se inconsistente.

Copépodos calanóides, entre outros, foram relacionados como organismos que poderiam ser utilizados em testes de toxicidade, enfatizando que alternativamente indivíduos para testes poderiam ser coletados diretamente do campo e aclimatados durante 24 a 48 horas antes do uso (STEBBING *et al.*, 1980), enquanto que o APHA; AWWA; WPCF(1989) e UNEP (1989) apresentam método padronizado para *Acartia tonsa*.

Náuplios de *Artemia* sp tem sido objeto de estudos de toxicidade desde a década de 50 , porque não exigem a manutenção de culturas estoque (SORGELLOOS *et al.*, 1978; VANHAECKE *et al.*, 1980; VANHAECKE & PERSOONE, 1981), além de serem largamente cultivados como alimento para peixes e microcrustáceos (LÉGER *et al.*, 1987).

SORGELLOOS *et al.*(1978) demonstraram que os náuplios no estágio II são mais sensíveis que no estágio I, enquanto que entre os estágios II e III não foi observada diferença significativa. TARPLEY (1958) também não encontrou diferença entre os estágios III, V, VII, IX e XI.

No estágio I o trato digestivo desses crustáceos não entra em contato com o meio externo e sua alimentação consiste do próprio vitelo. Com a mudança para o estágio II os náuplios começam a se alimentar de material particulado existente no meio, através da ingestão contínua da água circundante. Esse é o motivo da utilização de náuplios de *Artemia* sp no segundo estágio para testes de toxicidade.

Sua utilização é documentada para testes com pesticidas (TARPLEY, 1958), óleos, dispersantes e compostos petroquímicos (ZILLIOUX *et al.*, 1973; PRICE *et al.*, 1974; VERRIOPOULOS *et al.* 1986; VITAL & VEIGA, 1990) e metais (COX, 1974; SALIBA & KRZYZ, 1976).

Em um estudo que visava fornecer dados para classificação de dispersantes em circulação no mercado brasileiro, foi escolhida *Artemia salina* como organismo teste para avaliação da toxicidade destes produtos (CETESB, 1982).

A norma L5.021 (CETESB, 1991) padroniza o teste de toxicidade aguda com esse organismo frente a dispersantes de petróleo e outras substâncias químicas.

Assim, com o propósito de aplicar e avaliar a viabilidade de uso dos métodos disponíveis com organismos marinhos, no controle da toxicidade de efluentes líquidos que são lançados em ambientes estuarinos, foram realizados testes de toxicidade com os organismos acima mencionados utilizando-se os efluentes industriais de uma indústria siderúrgica, COSIPA, e de uma fábrica de fertilizantes, a ULTRAFÉRTIL/JARDIM SÃO MARCOS, ambos lançados no estuário do Rio Cubatão.

Esses resultados poderão indicar, dentre os diferentes métodos utilizados, aqueles que poderão ser recomendados para aplicação no controle de efluentes industriais lançados em ambientes estuarinos, e fornecer subsídios para o estabelecimento de critérios de emissão de efluentes líquidos nesses ambientes.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - ÁREA DE ESTUDO E EFLUENTES ANALISADOS

Tanto a COSIPA quanto a ULTRAFÉRTIL possuem um complexo portuário constituído por um pier e dois cais, estando ligados ao mar por um canal de aproximadamente 5Km de extensão. Parte do efluente da primeira e o volume total dos efluentes da segunda são lançados diretamente no estuário do Rio Cubatão.

Os poluentes lançados no estuário vão se dispersando, em seu movimento oscilatório (para montante e para jusante), produzido pelas marés, apresentando um deslocamento efetivo resultante, para jusante, até transladar-se ao mar aberto (OCHIPINTI, apud TOMMASI, 1979).

De acordo com o modelo de circulação estuarina proposto por PONÇANO (1985) é na altura dos largos Canéu e Candinho que ocorre um aporte considerável de água marinha para o interior do estuário e, conseqüentemente condições favoráveis para a coagulação eletrolítica dos sedimentos finos. Nessa área se estendem os manguezais e o autor conclui que os sólidos de origem fluvial ficam aí retidos preferencialmente. Portanto, os sedimentos carregados pelo Rio Cubatão, juntamente com sua carga poluidora, devem ficar retidos na faixa de domínio da vegetação de mangue e na altura do largo do Canéu.

Na figura 1 pode ser observado o posicionamento das indústrias na região estuarina de Cubatão. Na tabela 1 são fornecidos subsídios auxiliares

para o conhecimento da composição final dos efluentes das duas indústrias, através da análise das matérias primas utilizadas e dos produtos elaborados.

Foram realizadas cinco campanhas de amostragem do efluente final da COSIPA, resultante dos processos das unidades de alto forno, laminação, coqueria, aciaria e calcinações, e três campanhas com o efluente final da ULTRAFÉRTIL/Jardim São Marcos, proveniente das unidades de amônia, fosfato diamonio, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico e nitrato de amônia. Na tabela 2 constam as unidades que estavam em operação gerando efluentes para o ponto de descarte, no momento das diferentes campanhas de coleta.

2.1.1 - Procedimento de amostragem

Foram coletados volumes iguais, de hora em hora, no decorrer de seis horas, gerando uma amostra composta, num total de 30 litros, para a realização de todos os experimentos e análises químicas. Na ULTRAFÉRTIL as amostras foram coletadas diretamente da tubulação pela qual é efetuado o descarte. Na COSIPA, as coletas foram realizadas em períodos de maré baixa, num canal que capta os efluentes das várias unidades em operação, e que na maré alta recebe influência direta do estuário, o que seria indesejável, devido à diluição com água estuarina.

Nessa indústria a amostragem começou, no mínimo, uma hora após o início da maré vazante em Santos (tab. 2), de forma a garantir a coleta do efluente sem influência da cunha salina, uma vez que as mesmas amostras

foram utilizadas pela equipe da CETESB em São Paulo, para execução de testes em paralelo com organismos de água doce.

Após a coleta e composição das amostras, os efluentes, armazenados em frascos descartáveis e acondicionados em caixas de isopor com gelo, foram encaminhados ao Centro de Biologia Marinha da USP, em São Sebastião, sendo transferidos para geladeira e utilizados no dia seguinte para a realização dos testes de toxicidade com os organismos marinhos, para o presente trabalho.

Paralelamente, como parte de um projeto mais abrangente, foram realizados nos laboratórios da CETESB em São Paulo, testes de toxicidade com o peixe de água doce, *Cheirodon notomelas*, e os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, e com a bactéria marinha *Photobacterium phosphoreum*. Os dados obtidos com esses organismos serão discutidos oportunamente.

2.1.2 - Procedimentos com o efluente

2.1.2.1 - Análises químicas dos efluentes

Subamostras dos efluentes foram enviadas aos laboratórios de análises físico-químicas da CETESB em São Paulo e Santos. Os parâmetros abaixo mencionados foram selecionados para análise, devido à sua detecção em elevadas concentrações em estudo anterior realizado pela CETESB (ZAGATTO *et al.*, 1986):

- Efluente da COSIPA: cloretos, DBO, DQO, fenóis, fluoreto, nitrogênio amoniacal, nitrato, óleos e graxas, resíduo sedimentável, cianeto, os metais cromo hexavalente, ferro, cobre, manganês, zinco, níquel, estanho, na forma solúvel e total e boro.
- Efluente da ULTRAFÉRTIL: fluoreto, nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito, óleos e graxas, resíduo sedimentável, sílica, ortofosfato e fosfato total.

Os métodos de análise foram baseados na 17ª edição de APHA; AWWA; WPCF (1989). As análises foram efetuadas por absorção atômica (Cu, Fe, Mn, Ni, Sn e Zn, frações solúvel e total), colorimetria (B, Cl⁻, Cr⁶⁺, CN, Fenóis, NO₂, NO₃, N-amoniacal, ortofosfato, sílica e fosfato), gravimetria (óleos e graxas), cone Inhoff (resíduo sedimentável) e eletrodo íon-seletivo (F⁻).

2.1.2.2 - Salinização

Como a salinidade dos efluentes era zero, foi necessário realizar o processo de salinização através do acréscimo de salmoura, para utilização das amostras em experimentos com organismos marinhos. A literatura internacional menciona dois processos para obtenção da salmoura: evaporação lenta da água do mar a temperatura inferior a 40°C ou congelamento, seguido de descongelamento e retenção da fração salina. Os dois processos foram utilizados no presente trabalho.

O cálculo do volume de salmoura a ser adicionado ao efluente, para obtenção da salinidade desejada, foi efetuado a partir da fórmula sugerida por SALOMÃO (1978):

$$V_s = \frac{V_t}{\frac{S_s - S_d}{S_d - S_e} + 1}$$

onde,

V_s = volume de salmoura a ser adicionado ao efluente

V_t = volume total a ser preparado

S_s = salinidade da salmoura

S_d = salinidade desejada

S_e = salinidade do efluente

As demais diluições foram preparadas a partir das amostras do efluente assim salinizadas, para utilização nos testes de toxicidade.

Dentre as várias formas para indicação de unidade de salinidade, optou-se, no presente trabalho, pela expressão " $\times 10^{-3}$ ".

2.2 - ESPÉCIES EXPERIMENTAIS

2.2.1 - *Mysidopsis juniae*

É uma espécie de hábitos epibênticos, pertencente ao Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Malacostraca, Subclasse Eumalacostraca, Superordem Peracarida, Ordem Mysidacea (BARNES, 1984) (fig. 2). A

principal característica sistemática para a diferenciação de outras espécies é o formato do telson (fig. 3).

São organismos canibais ou omnívoros, conhecidos por serem predadores de outros crustáceos, como os copépodos, e por filtrarem diatomáceas (MAUCHLINE, 1980). Segundo LUSSIER *et al.*(1985) a reotaxia positiva e a agitação dos sedimentos de fundo para a ressuspensão das partículas de sedimento apresentada por esse gênero, são fatores importantes no seu comportamento alimentar.

2.2.2 - *Artemia* sp

Pertence ao Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Branchiopoda, Ordem Anostraca (BARNES, 1984) (fig. 4). Segundo esse autor *Artemia* sp pode tolerar salinidades que flutuam desde 10 por cento de água do mar até o ponto de saturação do cloreto de sódio.

Os náuplios são facilmente obtidos através da hidratação de cistos obtidos comercialmente, que podem ser estocados por longos períodos. Após a eclosão, o primeiro estágio naupliar não apresenta contato com o meio externo, mas já no segundo estágio, após aproximadamente 24 horas, passam a se alimentar, através de atividades filtradoras, de material particulado contido na água.

2.2.3 - *Temora stylifera* e *Acartia lilljeborgi*

São organismos essencialmente planctônicos, pertencentes ao Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Copepoda, Ordem Calanoida, tendo antenas muito longas e apêndices cobertos por longas e delicadas cerdas que aumentam a flutuação (BARNES, 1984) (figs. 5 e 6). Ainda segundo este autor, os copépodos planctônicos são principalmente filtradores e as segundas maxilas estão modificadas para atuarem como apêndices filtradores, sendo o fitoplâncton a principal dieta dessas espécies.

2.2.4 - *Lytechinus variegatus*

Espécie pertencente ao Filo Echinodermata, Classe Echinoidea, Subclasse Euechinoidea, Superordem Echinacea, Ordem Temnopleuroidea (BARNES, 1984). Ocorre na região litorânea, sobre substratos arenosos e lodosos.

Os indivíduos não apresentam dimorfismo sexual, tendo carapaça regularmente hemisférica e achatada inferiormente, de cor verde com as zonas inter-ambulacrais e os espaços entre os poros mais claros, e coloração dos espinhos variando desde o verde até púrpura arroxeado com tons esverdeados. Essa espécie é bastante comum na região do Caribe e na Costa Atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do Norte (EUA) até a Costa Sudeste do Brasil (GIORDANO, 1986).

A espécie *L. variegatus* foi selecionada para utilização em testes de toxicidade por apresentar-se fértil o ano todo na região de São Sebastião, área

em que o estudo foi efetuado, viabilizando assim a execução de ensaios com gametas e embriões. Os óvulos apresentam cor amarelo-alaranjada, os espermatozoides são esbranquiçados e a membrana de fecundação dos ovos é facilmente visualizada (fig. 7). O desenvolvimento embrionário tem duração aproximada de 24 horas, a 25°C, após o que a larva pluteus pode ser observada nos controles experimentais. As figuras 8 e 9, respectivamente, apresentam a larva pluteus normal e anormal.

2.3 - TESTES DE TOXICIDADE

Foram realizados testes de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*, *Acartia lilljeborgi* ou *Temora stylifera* e *Artemia* sp, e testes de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*.

Visando à avaliação da variação da salinidade sobre a toxicidade dos efluentes, e compreensão de seus possíveis efeitos no estuário, testes com *Artemia* sp foram realizados também às salinidades de 15 e 21x10⁻³, e com *M. juniae* a 21x10⁻³, além da salinidade marinha normal, de 34x10⁻³.

Para os testes de toxicidade com efluentes, considerou-se como controle efetivo aquele preparado com água destilada acrescida de salmoura, na mesma proporção da maior concentração obtida para o efluente após a salinização.

Todos os frascos-teste contendo diluições do efluente foram preparados imediatamente antes da obtenção de gametas, no caso de *L. variegatus*, ou da randomização dos demais organismos-teste, e mantidos em incubadora a 25 ± 2°C até que fossem adicionados os organismos.

Em todos os experimentos os frascos-teste foram randomizados, e a numeração devidamente anotada nas respectivas fichas de controle, que também continham todas as informações dos parâmetros analisados a cada teste.

2.3.1 - *Mysidopsis juniae*

O teste de toxicidade aguda, com duração de 96 horas consiste na exposição de jovens, com 3 dias de idade, às soluções-teste. O encerramento é efetuado através da contagem dos organismos vivos e mortos em cada réplica.

Exemplares de *M. juniae* foram coletados com uma rede cônica de malha de 0,5mm, por meio de arrasto horizontal, próximo ao fundo arenoso, em profundidade de aproximadamente 1m, na praia do Segredo, em São Sebastião. As fêmeas grávidas contendo embriões no marsúpio foram triadas em laboratório.

No mínimo 600 fêmeas, das quais vários exemplares foram observados ao microscópio para confirmação da espécie através da verificação do telson, foram separadas para cada experimento.

Após a separação, foram mantidas por um período de 24 horas em cubas de 13 litros, na proporção de 1 fêmea/50ml de água do mar filtrada, dentro de redes de filó (fig. 10), sendo alimentadas com 50 náuplios de *Artemia* sp por misidáceo. A função desta rede era permitir a passagem dos filhotes para fora da mesma, mas impedir que o mesmo ocorresse com as fêmeas, com o objetivo

de facilitar a sua separação no dia posterior ao nascimento dos jovens. Desta forma, o diâmetro da malha da rede foi determinado em função do tamanho das fêmeas e dos organismos recém-nascidos. As fêmeas foram devolvidas ao mar após a obtenção dos jovens.

Os jovens recém-nascidos foram mantidos por um período de 72 horas, a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, alimentados com 30 náuplios de *Artemia* sp por misidáceo por dia, quando então eram iniciados os testes de toxicidade.

Para dar início aos ensaios, os jovens foram transferidos um a um, com pipeta de boca larga, para placas plásticas onde foram randomizados, num total de 10 organismos por réplica, e posteriormente foram transferidos novamente um a um com o mesmo tipo de pipeta, para os frascos-teste.

Os testes foram realizados em béqueres de 400ml contendo 200ml de solução-teste, num total de 3 réplicas para cada concentração de efluente. Após o acréscimo dos organismos a cada réplica, o experimento foi mantido em incubadora a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12h claro-12h escuro.

Diariamente os indivíduos foram alimentados na mesma proporção do período de aclimação, ou seja, 30 náuplios de *Artemia* sp por misidáceo por dia, e os mortos foram contados e retirados de cada réplica. O encerramento do teste, após 96 horas, consistiu da contagem final do número de vivos e mortos por réplica.

2.3.2 - *Artemia* sp

O teste de toxicidade aguda, com duração de 48 horas, consiste na exposição de náuplios de *Artemia* sp no estágio II às soluções teste, com análise do número de organismos mortos ao final do período de exposição.

Para obtenção de organismos para teste, cistos de *Artemia* sp, provenientes de Macau/RN, foram hidratados na proporção de 0,05g de cistos/500ml de água do mar, em béqueres de 1 litro, mantidos em incubadora à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com aeração suave, de forma a se manter os cistos em suspensão, nas respectivas salinidades-teste (15, 21 ou 34×10^{-3}). A eclosão ocorreu após 24 horas e através da incidência direta de um fecho de luz os náuplios foram facilmente coletados, uma vez que esses organismos apresentam fototactismo positivo. Os organismos recém-eclodidos foram transferidos para outros béqueres contendo o mesmo volume de água do mar, nas respectivas salinidades-teste, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para aclimação por 24 horas, ou seja, até o início do experimento, quando estivessem no estágio II. Esse processo foi efetuado em incubadora com fotoperíodo de 12h claro-12h escuro.

Para a realização dos ensaios de toxicidade, o volume final de cada réplica contendo soluções-teste foi de 100ml. Todas as concentrações-teste foram preparadas com volume final de 90ml para que, com o acréscimo de 10ml de água de diluição, onde os organismos eram randomizados para serem acrescentados aos frascos-teste, fossem atingidos o volume e a concentração

final desejados. Por exemplo:

. Maior concentração do efluente após salinização: 80%

. Concentração final desejada: 20% de efluente

. Volume final da concentração-teste = 100ml

Portanto, $C_1V_1 = C_2V_2 \implies 80.V_1 = 20.100 \implies V_1 = 25\text{ml}$

Ou seja, seria necessário adicionar ao frasco-teste, 25ml do efluente a 80% + 75ml de água de diluição, para se atingir a concentração desejada. Entretanto apenas 65ml foram colocados além dos 25ml do efluente, uma vez que os outros 10ml foram adicionados juntamente com os organismos-teste.

Nesses experimentos foram utilizados frascos de vidro refratário, com 20 organismos por réplica, num total de 3 réplicas para cada concentração de efluente. Após 24 horas os indivíduos mortos de cada réplica foram retirados e seu número foi anotado. O encerramento do teste consistiu da contagem dos organismos vivos e mortos de cada frasco-teste, ao final de 48 horas.

2.3.3 - *Temora stylifera* e *Acartia lilljeborgi*

O teste de toxicidade aguda, com duração de 48hs, consiste na exposição de adultos de uma dessas espécies às soluções-teste, para análise do número de organismos mortos ao final do teste.

Os copépodos foram coletados através de arrasto vertical diurno, no canal de São Sebastião, com rede de malha de 100 μm , em profundidades de 5 a 20m, sendo transportados imediatamente para o laboratório.

As amostras de zooplâncton, ao chegarem no laboratório, eram divididas em cristalizadores com aeração suave e aumentava-se o volume com água do mar, à temperatura de coleta, para facilitar o processo de triagem, que era realizado sob lupa.

Após a triagem, efetuada com pipeta de borda arredondada, os organismos eram mantidos em cubas de 3 litros contendo água do mar filtrada, com aeração suave, na proporção de 20 organismos/l, em incubadora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12h claro-12h escuro durante 24 horas, para aclimação. A alimentação durante este período consistiu da microalga *Tetraselmis gracilis* na proporção de 2×10^4 células/ml de água nas cubas.

Uma vez terminado o período de aclimação, os exemplares adultos de copépodos foram randomizados e transferidos um a um, num total de 10 organismos por réplica, para placas plásticas, antes de serem acrescentados às concentrações-teste.

Frascos de polietileno com tampa, contendo 50ml de solução-teste, foram utilizados para execução dos experimentos. Para cada réplica, num total de 3 réplicas para cada concentração de efluente, foram adicionados os 10 organismos e 2×10^4 células/ml de *Tetraselmis gracilis*. A alimentação foi fornecida apenas no início do experimento.

Ao término de 24 horas o número de indivíduos mortos foi anotado e os mesmos foram retirados. O encerramento do teste, realizado após 48 horas, consistiu da contagem final do número de organismos vivos e mortos em cada

réplica. Foram considerados mortos, os organismos que não reagiam, por 30 segundos, a um leve toque com a ponta da pipeta Pasteur.

2.3.4 - *Lytechinus variegatus*

2.3.4.1 - Coleta dos organismos

Cerca de 15 ouriços foram coletados para cada teste, através de mergulho livre no canal de São Sebastião, e trazidos ao laboratório, onde foram mantidos em caixas com água do mar corrente e alimentados com algas coletadas próximas à área de coleta dos organismos.

Foram utilizados gametas de, no mínimo, três exemplares de cada sexo, em cada experimento. Após a coleta dos gametas, todos os animais foram lavados com água corrente e devolvidos ao mar.

2.3.4.2 - Obtenção de gametas

A liberação de gametas foi induzida pela injeção de 5ml de KCl 0,5M, na região perioral, sendo 2,5ml injetados em dois pontos opostos. Imediatamente após a aplicação do KCl os gametas foram liberados através dos gonóporos situados na região aboral dos indivíduos.

Os óvulos foram coletados diretamente em água do mar filtrada e mantidos em incubadora a $25 \pm 20^{\circ}\text{C}$, até o término da coleta dos gametas.

Cada lote de óvulos foi observado ao microscópio para verificação do seu estágio de maturação e possíveis anomalias. Os lotes considerados normais,

com formato esférico e tamanho homogêneo, passaram por uma rede para remoção de fezes e outros detritos e foram misturados em béquer de 1 litro contendo 600ml de água do mar filtrada. Os mesmos foram lavados três vezes antes da sua utilização, isto é, aguardou-se a sedimentação dos óvulos, descartou-se o sobrenadante e completou-se o volume para 600ml, repetindo-se o processo três vezes. Após a lavagem, foi efetuada uma diluição de 100x para realização da contagem de três subamostras dos óvulos em solução, em câmara de Sedgwick-Rafter, de forma a se calcular o volume de solução que conteria 1000 óvulos, quantidade esta a ser acrescentada a cada frasco-teste. Para isso, 1ml da solução de óvulos foi acrescentada a 99ml de água do mar.

Exemplo:

. média de 3 contagens em câmara de Sedgwick-Rafter: 50 óvulos/ml

. 50 óvulos x 100 (fator de diluição) = 5000 óvulos/ml

5000 óvulos ----- 1ml

1000 óvulos ----- X → X = 0,2ml (volume a ser
adicionado ao frasco-teste)

Os espermatozóides foram coletados com conta gotas, depositados num béquer e mantidos sobre gelo até o início do experimento. A ativação do esperma foi efetuada através da diluição de 0,5ml do "pool" de espermatozóides em 24,5ml de água do mar filtrada, o que foi denominado de solução padrão.

2.3.4.3 - Teste para avaliação da taxa de fecundação

O princípio deste teste de toxicidade de curta duração consiste da exposição dos espermatozóides, durante 60 minutos, à solução-teste, quando então são adicionados os óvulos. A seguir o teste é encerrado pela adição de

0,5ml de formol comercial. A análise da proporção de ovos(fecundados) e óvulos(não fecundados) é indicativa da viabilidade dos espermatozóides após 60 minutos de exposição à solução-teste.

Foram preparadas 4 réplicas para cada concentração de efluente , com volume final de 5ml, em tubos de ensaio.

A cada réplica foram acrescentados 100 μ l da solução padrão de espermatozóides. Após 60 minutos de exposição foram adicionados 1000 óvulos. O procedimento de adição dos gametas foi efetuado com o auxílio de pipeta automática, sendo o teste mantido em incubadora a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo o período experimental (80 minutos).

No instante do encerramento do teste, que ocorreu 20 minutos após a adição dos óvulos, as amostras foram transferidas para frascos contendo 0,1ml de formol tamponado com bórax. As amostras preservadas foram posteriormente analisadas ao microscópio, com aumento de 100x, em câmara de Sedgwick-Rafter, anotando-se o número de ovos, identificados pela presença da membrana de fecundação (fig. 7) e de óvulos em cada amostra, num total de 100 indivíduos por réplica.

Para garantir o encerramento de todas as amostras exatamente 80 minutos após o início do período de exposição, foi cronometrado o intervalo de 15 segundos para adição de cada lote de espermatozóides, e a seguir de óvulos, nas várias concentrações-teste. No instante da finalização do experimento, a transferência para os frascos contendo formol tamponado com bórax obedeceu esse mesmo intervalo cronometrado de 15 segundos.

2.3.4.4 - Teste para avaliação do desenvolvimento embrionário

O princípio do teste de toxicidade crônica de curta duração para avaliação do desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, consiste na exposição de ovos à solução-teste e sua manutenção na mesma durante todo o período de desenvolvimento embrionário, até que os organismos atinjam o estágio da larva pluteus, o que ocorre entre 24 e 28 horas, nas condições do teste. O experimento é encerrado no momento em que no mínimo 80% dos organismos no controle apresentam-se como pluteus bem desenvolvidos, com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo da larva (fig. 8).

Para dar início ao teste, a fecundação dos gametas foi realizada em béquer de 1 litro, com cerca de 500ml de água do mar, contendo óvulos e solução de espermatozóides obtidos pelo processo anteriormente mencionado. Contagens do número de ovos foram efetuadas após cerca de 10 minutos, em câmara de Sedgwick-Rafter, para garantir que houvesse no mínimo 80% de fecundação. Nessa mesma câmara, após a confirmação da taxa de fecundação, eram efetuadas três contagens, com posterior cálculo da média e obtenção do volume necessário para que 300 ovos fossem acrescentados a cada réplica.

Foram preparadas 4 réplicas para as amostras de efluentes, com volume final de 10ml, em tubos de ensaio.

Com a finalidade de se observar e confirmar, antes do encerramento do teste, o estágio em que se encontravam os organismos e evitar, dessa forma, o

encerramento prematuro do experimento, com pluteus não definidos, foram preparadas 4 réplicas adicionais com água do mar filtrada.

Vinte e quatro horas após o início do teste uma das réplicas adicionais do controle era examinada ao microscópio e, caso os pluteus apresentassem tamanho inadequado ou ainda estivessem no final da gástrula, aguardava-se mais uma hora, quando outra réplica era analisada. Esse processo geralmente oscilava entre 24 e 28 horas. Com os pluteus apresentando o tamanho dos braços no mínimo igual ao tamanho do corpo (fig. 8), as amostras eram transferidas para frascos de 11ml, contendo 0,5ml de formol tamponado com borax. A análise das amostras foi efetuada posteriormente, ao microscópio, em câmara de Sedgwick-Rafter, com aumento de 100x, anotando-se o número de embriões ou pluteus com desenvolvimento retardado ou anômalo em relação às larvas dos frascos-controle, num total de 100 organismos por réplica.

2.4 - CONTROLES EXPERIMENTAIS

Foram preparadas réplicas de controle com água do mar filtrada para cada salinidade utilizada, além de um controle adicional com água destilada e salmoura, na mesma proporção do efluente adicionado na maior concentração testada, para cada salinidade. Por exemplo: Se a maior concentração obtida para o efluente era de 80%, isso significava que os 20% restantes eram de salmoura, portanto, eram preparados controles contendo 80% de água destilada + 20% de salmoura. Os dados obtidos nestes controles com salmoura, em relação a frascos-controle com água do mar pura ou acrescida de água destilada, também foram analisados.

2.5 - PARÂMETROS CONTROLADOS A CADA TESTE

Foram anotadas nas respectivas fichas experimentais, no início e final de cada teste, as medidas de pH, OD e salinidade para cada controle experimental, maior concentração testada e efluente bruto, além da temperatura máxima e mínima na incubadora no transcorrer dos experimentos.

2.6 - SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Paralelamente a cada teste com efluente, foram realizados testes com uma substância de referência, cuja finalidade é verificar a sensibilidade do lote dos organismos utilizados em cada ensaio.

Essa verificação ocorre a partir da comparação entre a CL ou CE50 obtida no experimento em questão e resultados já tabulados anteriormente, durante o processo de estabelecimento da metodologia. Caso os resultados não se apresentem dentro do intervalo compreendido pela média dos valores de CL ou CE50 de testes anteriores, acrescida ou diminuída de duas vezes o seu desvio padrão, o teste deverá ser descartado, pois isso é um forte indicativo de que algum problema ocorreu com o lote de organismos testados (NIPPER & PRÓSPERI, 1993).

Com esse objetivo foi utilizado o dodecil sulfato de sódio ($(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na})$) para testes com *Artemia* sp e zinco, na forma de sulfato de zinco heptahidratado, para as demais espécies.

A metodologia adotada para os testes com a substância de referência foi a mesma descrita para os ensaios com efluentes, porém como controles foram preparados frascos com água do mar, para testes à salinidade de 34×10^{-3} , ou com água do mar acrescida de água destilada, para testes às salinidades 15 ou 21×10^{-3} .

2.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos em todos os testes com substância de referência, e nos testes de toxicidade aguda com crustáceos, foram analisados através do método "Trimmed Spearman-Kärber" (HAMILTON *et al.*, 1977). Foi obtida a CL50 (concentração letal a 50% dos organismos) para os testes com crustáceos e a CE50 (concentração efetiva a 50% dos organismos), para avaliação da sensibilidade à substância de referência nos testes com gametas e embriões de *L. variegatus*.

Os resultados dos testes de toxicidade crônica de curta duração com o equinodermo foram analisados através do teste de Bartlett, seguido de ANOVA e teste de Dunnett, com exceção dos dados da terceira campanha da COSIPA. Neste caso foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, pois os resultados não apresentaram homocedasticidade. Através destas análises verificou-se a concentração do efluente que causou efeito significativo em relação ao controle, estabelecendo-se a CENO (maior concentração de efeito não observado).

2.8 - LAVAGEM DE VIDRARIA

O procedimento de lavagem de vidraria e recipientes de plástico está vinculado ao tipo de amostra utilizada. Desta forma, foi determinado o seguinte procedimento:

. MATERIAL USADO COM ÁGUA DO MAR: esfregar com uma gaze ou escova, enxaguar com água de torneira. Para finalizar, enxaguar três vezes com água destilada.

. MATERIAL USADO COM METAIS: enxaguar três vezes com água de torneira, deixar de molho no ácido nítrico 10% durante 12 horas, enxaguar novamente três vezes com água de torneira. Finalizar enxaguando três vezes com água destilada.

. MATERIAL USADO COM DSS: esfregar com uma gaze ou escova e álcool e enxaguar três vezes com água de torneira. Repetir o processo e finalizar enxaguando três vezes com água destilada.

. MATERIAL USADO COM EFLUENTE INDUSTRIAL: enxaguar três vezes com água de torneira, esfregar com uma gaze (ou escova) e detergente. Passar álcool e enxaguar três vezes com água de torneira. Passar acetona e enxaguar três vezes com água de torneira. Deixar de molho no ácido nítrico 10% durante 12 horas, enxaguar novamente três vezes com água de torneira. Finalizar enxaguando três vezes com água destilada.

Somente os frascos-teste de plástico, utilizados nos experimentos com *A. lilljeborgi* e *T. stylifera*, secaram sobre papel de filtro, enquanto que toda a vidraria foi seca em estufa a 35°C.

3 - RESULTADOS

3.1 - TESTES DE TOXICIDADE

3.1.1 - Ensaio com o efluente da COSIPA

3.1.1.1 - *Mysidopsis juniae*

Enquanto nas primeiras quatro campanhas de amostragem foram realizados testes apenas à salinidade de 34×10^{-3} , na quinta campanha foi incluído um experimento a 21×10^{-3} .

Devido à alta toxicidade apresentada por esse efluente na primeira campanha, foram estipuladas faixas inferiores de concentração-teste para a segunda amostragem. Isso se mostrou inadequado porque nesta ocasião o efluente apresentou menor toxicidade, causando efeito a menos de 50% dos organismos na maior concentração testada, que foi de 40% (tab. 3).

A primeira campanha apresentou a amostra mais tóxica para esse organismo (CL50 de 8,6%), sendo que a terceira e quinta amostragens com este efluente revelaram toxicidade cerca de 8 vezes menor, com CL50 de 60,6 e 65,7%, respectivamente (tab. 3). O teste à salinidade 21×10^{-3} apresentou CL50 de 56,4%, ligeiramente menor à observada na salinidade 34×10^{-3} (tab. 3), porém não existe evidência significativa de que as médias são diferentes, uma vez que áreas dos intervalos de confiança são concordantes.

Para a realização dos experimentos da quarta campanha, cinco praias do litoral de São Sebastião - Praia do Segredo, Praia do Cabelo Gordo, Praia

Preta, Praia de Barequeçaba e Praia Grande foram amostradas em diversos horários e apenas a espécie *Mysidium gracile* foi encontrada. Devido à impossibilidade de se obter fêmeas de *M. juniae*, o teste não foi realizado.

3.1.1.2 - *Artemia* sp

Os resultados dos testes realizados com o efluente à salinidade 15×10^{-3} , na primeira e terceira campanhas, não foram considerados para análises posteriores porque os controles (água destilada + salmoura) apresentaram taxa de mortalidade de 48,3 e 24,1%, respectivamente (tab. 4). Esses valores são superiores ao recomendado pela norma L5.021 (CETESB, 1991), que determina no máximo 10% de mortalidade dos organismos no controle.

Da mesma forma que nos experimentos realizados à salinidade 15×10^{-3} , na primeira e segunda campanhas os dados dos experimentos a 34×10^{-3} não foram considerados, porque o controle (água destilada + salmoura) apresentou taxa de mortalidade de 24,7 e 19,2%. Os controles de água do mar acrescida de água destilada também apresentaram alta taxa de mortalidade, de 48,2 e 37,2% (tab. 4).

Embora na segunda campanha os controles de teste à salinidade 15×10^{-3} tenham apresentado taxas de mortalidade aceitáveis de 8,3 e 1,6% (tab. 4) para as amostras preparadas com água destilada acrescida de salmoura, e de água do mar, respectivamente, na maior e na menor concentração do teste com a substância de referência foram observados números semelhantes de organismos mortos ao final do teste, indicando algum problema com o lote de

náuplios utilizado nos experimentos. Também na terceira campanha, à salinidade 34×10^{-3} , tal fato ocorreu, apesar dos controles de água destilada com salmoura terem se apresentado dentro da faixa aceitável (9,8%) (tab. 4). Isso reforça a suposição de possíveis problemas com o lote de organismos utilizados nas campanhas anteriores.

Desta forma, apenas os resultados da quarta campanha de amostragem à salinidade 15×10^{-3} foram aproveitados, com o intuito de se comparar os resultados obtidos em experimentos a diferentes salinidades. Os dados desta campanha apresentaram controles com mortalidade pouco superior ao recomendado pela Norma L5.021 (CETESB, 1991) (tab. 4), tendo sido aplicada a correção de Abbott (APHA; AWWA; WPCF, 1989) aos dados, para obtenção da CL50, que foi de 10,9% de efluente (tab. 3).

Nas duas últimas campanhas de amostragem o efluente salinizado a 34×10^{-3} não apresentou efeito tóxico para esses organismos, o mesmo tendo ocorrido à salinidade 21×10^{-3} , na quinta campanha (tab. 3). Mesmo o controle (água destilada + salmoura) da quarta amostragem estando dentro da faixa recomendada, foi aplicada a correção de Abbott no cálculo da CL50 pois o controle com água do mar apresentou taxa de mortalidade levemente superior (tab. 4) à recomendada pela Norma L5.021 (CETESB, 1991).

3.1.1.3 - *Temora stylifera* e *Acartia lilljeborgi*

Na primeira, segunda e quarta campanhas de amostragem com o efluente da COSIPA foram efetuados testes com *T. stylifera*.

Problemas com o controle inviabilizaram a utilização dos resultados da primeira campanha. BERTOLETTI (1992a) indica que o controle deve apresentar sobrevivência de 85% dos organismos, enquanto que nesse experimento foi observado 69%. Isso não ocorreu na quarta amostragem, cuja CL50 do efluente, para esse organismo, foi de 32%. A CL50 da terceira amostra, para *A. lilljeborgi*, foi de 64,5% (tab. 3).

Com base nos experimentos com o misidáceo, devido à elevada toxicidade apresentada por esse efluente na primeira campanha, foram estipuladas faixas inferiores de concentração-teste para a segunda amostragem. No entanto, a menor toxicidade desta amostra também foi evidenciada no ensaio com *T. stylifera*, por ter causado efeito a menos de 50% dos organismos na maior concentração testada, que foi de 40% (tab. 3). A resposta do copépodo foi semelhante à do misidáceo, com porcentagens de mortalidade de 24 e 18%, respectivamente.

Na quinta campanha com o efluente da COSIPA e nos experimentos realizados com o efluente da ULTRAFÉRTIL, optou-se pela exclusão dos testes com copéodos, por razões que serão discutidas oportunamente.

3.1.1.4 - *Lytechinus variegatus* - Testes para avaliação da taxa de fecundação

Devido à reduzida porcentagem de óvulos fecundados no controle dos ensaios de três das quatro primeiras campanhas de amostragem realizadas (tab. 5), o cálculo da CENO para o efluente da COSIPA e CE50 para o zinco só foi efetuado no experimento da segunda campanha, tendo sido de 10% de efluente

e 0,047mg Zn/l (tabs. 3 e 7), respectivamente. Nos demais experimentos, a taxa de fecundação variou no controle de 5,0 a 44,2 (tab. 5), sendo muito inferior ao recomendado em NIPPER *et al.* (1993), que estabelece a validade do teste quando o controle apresenta no mínimo 70% de fecundação.

Foi efetuada a contagem do número de espermatozóides por óvulo a partir da solução-padrão utilizada em cada experimento. Essa relação variou de 21×10^3 a 54×10^3 espermatozóides por óvulo.

Da mesma forma que para os copépodos optou-se, na quinta campanha da COSIPA e nos experimentos realizados com o efluente da ULTRAFÉRTIL, pela exclusão dos testes para avaliação da taxa de fecundação, por razões que serão discutidas oportunamente.

3.1.1.5 - *Lytechinus variegatus* - Teste para avaliação do desenvolvimento embriolarval

A amostra da terceira campanha foi a mais tóxica para esse organismo. Justamente por esse motivo, não foi possível apontar com precisão a maior concentração que não causou efeito aos organismos (CENO), uma vez que a menor concentração do efluente (1%) causou efeito tóxico significativo (tab. 3).

Nas demais amostragens verificou-se efeitos tóxicos relativamente menores, porém ainda muito elevados, para os embriões dessa espécie (tab. 3).

A Norma L5.250 (CETESB, 1992b) estabelece que esse teste é válido quando o controle apresenta no mínimo 80% de embriões normais. Devido a

isso não foi calculado a CENO na quarta campanha, onde o controle apresentou 100% de embriões com desenvolvimento retardado.

3.1.2 - Ensaio realizados com o efluente da ULTRAFÉRTIL

3.1.2.1 - *Mysidopsis juniae*

A CL50;96h de cada amostra de efluente, nas duas salinidades experimentais, foi muito semelhante.

A amostra salinizada a 21×10^{-3} , da primeira campanha, apresentou a maior toxicidade para essa espécie, com CL50 de 1,69%. A segunda campanha apontou toxicidade mais elevada em uma ordem de magnitude, isto é, CL50 de 16,8%, enquanto que a 3a. amostragem apresentou CL50 de 7,05% (tab. 6).

À salinidade de 34×10^{-3} , a primeira campanha também foi a mais tóxica com CL50 de 1,87%, seguida também em termos de efeito tóxico pela terceira e segunda amostragens, respectivamente com CL50 de 8,38 e 22,4%, (tab. 6).

3.1.2.2 - *Artemia* sp

À salinidade 21×10^{-3} , o efluente apresentou CL50 de 38,8% na primeira campanha, não causando efeito tóxico na segunda e apenas indícios de toxicidade na terceira (tab.6).

Deve ser lembrado que devido à necessidade de salinização do efluente com acréscimo de salmoura, nos experimentos à salinidade de 21×10^{-3} , a maior concentração em teste é, usualmente, por volta de 80%. A detecção de indícios de toxicidade na última amostragem mostra que o 100% de efluente poderia vir a causar maior efeito sobre os organismos.

À salinidade 34×10^{-3} , o efluente não apresentou efeito tóxico para *Artemia* sp na segunda e terceira amostragens (tab. 6). O controle da primeira campanha apresentou mortalidade de 25,8% (água destilada + salmoura), sendo superior ao recomendado pela norma L5.021 (CETESB, 1991) e inviabilizando, portanto, a utilização dos resultados.

3.1.2.3 - *Lytechinus variegatus* - Teste para avaliação do desenvolvimento embriolarval

A amostra da primeira campanha foi a mais tóxica para essa espécie, com CENO de 0,1%. As demais amostras também apresentaram toxicidade bastante elevadas, com CENO de 0,58 e 0,50%, respectivamente na segunda e terceira campanhas (tab.6).

3.1.3 - Análises físico-químicas das soluções-teste

3.1.3.1 - Temperatura da água

Na metodologia de cada teste é definida a faixa de temperatura para a realização do mesmo. Segundo a APHA, AWWA, WPCF (1985) e USEPA

(1985) a temperatura das soluções-teste deve ser mantida dentro da faixa de variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. O controle dessa variável no decorrer dos experimentos foi eficiente, uma vez que as oscilações não ultrapassaram esse limite.

3.1.3.2 - pH

Os valores médios de pH para todas as amostras de efluente bruto, tanto da COSIPA quanto da ULTRAFÉRTIL, variaram de 7,5 a 8,9. Após o processo de salinização, através da adição de salmoura, no efluente preparado para 21×10^{-3} a oscilação ocorreu entre 7,5 e 8,2 e no efluente a 34×10^{-3} entre 7,9 e 8,4.

O preparo das diversas concentrações-teste, através da diluição com água do mar, nas respectivas salinidades-teste, manteve o pH dentro do padrão acima mencionado, com oscilações do início para o término de cada experimento inferiores a 0,2 unidades.

3.1.3.3 - Oxigênio dissolvido (OD)

A aeração pode alterar os resultados dos testes de toxicidade. Por exemplo, se o efluente possuir substâncias voláteis em sua constituição, a aeração auxiliará na liberação dessas substâncias mais rapidamente e poderá reduzir a toxicidade aparente desse efluente. O processo de aeração somente deve ser usado como último recurso para manutenção da concentração de OD necessária para a realização do experimento, que não deve ser inferior a 40%

de saturação para organismos de águas quentes e 60% para espécies de águas frias (USEPA, 1985).

Em nenhum dos testes efetuados foi necessária a utilização de aeração. A água de diluição utilizada no preparo das soluções-teste era proveniente de um reservatório que captava água do mar continuamente. Esse fato provavelmente garantiu que o teor inicial fosse sempre superior a 70% de saturação. Mesmo no término dos experimentos a verificação deste item indicou como menor resultado, 60% de saturação.

3.1.3.4 - Salinidade

A salinidade inicial foi de 15, 21 ou 34×10^{-3} e a verificação no final dos diversos experimentos não apresentou variação superior a 2×10^{-3} .

3.1.4 - Variabilidade dos efluentes

O efluente da COSIPA apresentou grande variabilidade na toxicidade ao longo do período de estudo. Foi calculado o coeficiente de variação dos resultados apresentados na tab. 3 para testes com *M. juniae*, obtendo-se o valor de 70,3%. Experimentos realizados com as mesmas amostras, com organismos de água doce (PRÓSPERI *et al.*, 1993), cujos dados são apresentados no Anexo I, levaram ao cálculo do coeficiente de variação de 61,5%, para os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. Da mesma forma, o efluente da ULTRAFÉRTIL também variou, tendo sido obtidos coeficientes de variação de 90% e 96,4% para testes com *M. juniae* às salinidades de 21 e 34×10^{-3} ,

respectivamente, e 92,8% para *D. similis* e 80,7% para *Cheirodon notomelas*. Os últimos coeficientes foram calculados a partir dos dados apresentados no Anexo II.

3.1.5 - Testes com substâncias de referências

A tabela 7 apresenta os resultados dos testes de toxicidade com o DSS, utilizando-se *Artemia* sp e zinco com *L. variegatus*, *T. stylifera* e *M. juniae*, nas diferentes salinidades utilizadas nos vários experimentos realizados.

Com o intuito de se verificar a faixa de sensibilidade dos organismos para essas duas substâncias, foi aplicada a Correção de Abbott (APHA; AWWA; WPCF, 1989) nos experimentos com DSS para *Artemia* sp a 21×10^{-3} (em paralelo à primeira e segunda campanhas da ULTRAFÉRTIL) e a 34×10^{-3} (em paralelo à terceira e quarta campanhas da COSIPA e primeira e segunda da ULTRAFÉRTIL) e *T. stylifera* (em paralelo à primeira campanha da COSIPA), uma vez que os controles apresentaram taxa de mortalidade levemente superior ao estabelecido como aceitável nas metodologias específicas (tab. 8).

Experimentos com *T. stylifera* revelaram elevado coeficiente de variação, de 156,9%, enquanto que testes com *M. juniae* às salinidades 21 e 34×10^{-3} apresentaram valores baixos e similares entre si, de 14,2 e 16,5%, respectivamente.

Testes com *Artemia* sp à salinidade 21×10^{-3} apresentaram coeficiente de variação de 28,9%, próximo de *L. variegatus*, 31%. À salinidade de 34×10^{-3} o

coeficiente para o primeiro organismo foi relativamente inferior do que à 21×10^{-3} (17,7%) e, também, similar aos de *M. juniae* nas duas salinidades.

3.1.6 - Análise do efeito do uso de salmoura sobre os organismos-teste, nas diferentes salinidades

De modo geral não foi observado efeito inaceitável da salmoura sobre os organismos-teste em relação ao outro controle preparado com água do mar (salinidade 34×10^{-3}) ou água do mar acrescida de água destilada (salinidade 15 ou 21×10^{-3}) (tab. 8). Exceções a esse fato são os testes com *Artemia* sp às salinidades 15×10^{-3} nos experimentos relativos às amostras da primeira campanha da COSIPA, e 34×10^{-3} nas primeiras campanhas da COSIPA e da ULTRAFÉRTIL e *T. stylifera*, também na primeira campanha da COSIPA. Estas foram as únicas amostras de salmoura preparadas por congelamento que vieram a causar efeito deletério sobre os organismos-teste. Das amostras com salmoura preparada por evaporação, houve efeito deletério sobre *Artemia* sp à salinidade 34×10^{-3} , nos experimentos relativos à segunda campanha da COSIPA, *Artemia* sp a 15×10^{-3} , na terceira e quarta campanhas dessa siderúrgica, e também sobre embriões de *L. variegatus* na quarta campanha da mesma.

De modo geral verifica-se que os náuplios de *Artemia* sp às salinidades 15 e 34×10^{-3} sofreram maior efeito deletério nos controles de água destilada com salmoura em relação aos outros organismos, tanto no processo de obtenção de salmoura por congelamento, como por evaporação. A espécie *L. variegatus* sofreu efeito apenas em um experimento onde foi utilizada a evaporação, e *T. stylifera*, no processo de congelamento.

Usualmente, nos testes em que foi observado número inaceitável de organismos afetados no controle contendo salmoura, o mesmo se deu para os controles com água do mar filtrada, seja pura ($S \times 10^3 = 34$) ou acrescida de água destilada ($S \times 10^3 = 15$ ou 21) (tab. 8).

3.1.7 - Influência da salinidade sobre a toxicidade da substância de referência

A avaliação da influência da salinidade sobre o efeito tóxico das substâncias de referência foi efetuada através dos testes com *Artemia* sp e *M. juniae*. Os dados estão apresentados na tabela 9.

Os valores de coeficiente de variação são bastante próximos entre si para os experimentos com *M. juniae* nas duas salinidades, enquanto que para *Artemia* sp, houve uma diferença um pouco maior.

Embora só exista um valor de CL50 para *Artemia* sp à salinidade 15×10^{-3} , é possível verificar que nessa salinidade ocorreu a maior toxicidade do DSS para esse organismo, tendo sido significativamente maior do que no teste paralelo, a 34×10^{-3} . A toxicidade do DSS para *Artemia* sp foi mais elevada à salinidade 34×10^{-3} do que a 21×10^{-3} , em todos os experimentos. Já para *M. juniae* a toxicidade do zinco nas duas salinidades praticamente não diferiu.



3.2 - ANÁLISES QUÍMICAS

3.2.1 - Efluente da COSIPA

A tabela 10 apresenta os resultados das análises químicas efetuadas com o efluente nas cinco campanhas de coleta. Verifica-se que na primeira amostragem os teores de cianeto, ferro solúvel, amônia, fenóis, cromo hexavalente, resíduo sedimentável e manganês solúvel, foram superiores às demais campanhas. Nesta campanha o efluente mostrou-se mais tóxico para a maioria dos organismos (tab. 3 e Anexo I).

Dos 22 parâmetros químicos analisados (tab. 10), apenas 11 constam da Resolução CONAMA Art. 21. Destes, pode-se verificar que os teores de boro, cromo hexavalente, cobre total, cianeto (exceto primeira campanha), fluoreto, manganês solúvel, níquel total, fenóis (exceto primeira, segunda e quarta campanhas), zinco total, óleos e graxas (exceto quinta campanha) e estanho total, nas amostras de efluentes da COSIPA, apresentaram-se dentro dos padrões determinados por essa Resolução.

3.2.2 - Efluente da ULTRAFÉRTIL

Nas primeira e terceira campanhas, respectivamente, operavam quatro e cinco unidades (tab.2) e os maiores teores de nitrogênio amoniacal (700mg/l) foram detectados na primeira amostragem (tab.11). De maneira análoga, o efluente foi mais tóxico nessa campanha de coleta, para a maioria dos organismos (tab. 6 e Anexo II). Também o teor de óleos e graxas foi consideravelmente maior nesta amostra, do que nas demais.

Foi possível verificar a variabilidade da vazão deste efluente, durante as campanhas de amostragem, sendo, respectivamente, por ordem de campanha de amostragem, de 4640, 2400 e 7600 l/min. O volume de efluente a ser descartado pela indústria parece depender do número de unidades em operação (tab. 2). Na segunda campanha, duas unidades operavam tendo sido observada a menor vazão. Também foram detectados os menores teores de nitrogênio amoniacal (118,5mg/l) e óleos e graxas (4,0mg/l) (tab.11) nesta amostragem.

4 - DISCUSSÃO

Não existem ainda, no Estado de São Paulo, critérios para o controle da qualidade de efluentes industriais lançados em ambientes estuarinos. O local de coleta do efluente para este tipo de análise, i.e., se deve ser coletado o efluente bruto no seu ponto de despejo, ou a água do corpo receptor, na zona de mistura, conseqüentemente também não está definido. Este fato, aliado à inexistência de testes de toxicidade com organismos autóctones, deu margem à procura de alternativas no que se refere à escolha de organismos e, conseqüentemente, dos testes ecotoxicológicos que possam vir a ser utilizados para esse fim. Segundo a USEPA (1990) há dois aspectos importantes a serem considerados para a determinação do tipo de teste que irá caracterizar o efluente e conseqüentemente controlar sua toxicidade: 1) a salinidade do corpo receptor; 2) o organismo-teste a ser recomendado para testes de toxicidade sob diferentes condições de salinidade.

Assim, baseando-se nas recomendações desta instituição, se os critérios a serem estabelecidos por um órgão de controle ambiental levarem em conta o impacto no recurso hídrico, a salinidade do teste de toxicidade deverá igualar a da água do corpo receptor, e deverão ser usadas espécies que possam ser testadas nessa salinidade ou dentro de uma determinada faixa de salinidade. Caso sejam estabelecidos critérios de toxicidade no ponto de saída do efluente, espécies marinhas/estuarinas ou de água doce poderão ser utilizadas. Nesse caso, a realização de testes com organismos de água doce é considerada mais fácil, por não ser necessário efetuar o processo de salinização do efluente, uma vez que somente a toxicidade do efluente estará sendo medida, independente de qualquer interação resultante da mistura na água receptora ou das condições desfavoráveis do corpo receptor no ponto de descarte.

Através da comparação dos resultados por faixa de salinidade, será possível indicar os métodos mais sensíveis, que poderiam ser recomendados para a avaliação da toxicidade dos efluentes analisados no presente estudo, ou seja, aqueles descartados em áreas estuarinas.

Os dados de toxicidade aguda com o efluente da COSIPA, com organismos marinhos (tab. 3), indicaram o método aplicado para *M. juniae* como sendo o de maior sensibilidade para este tipo de amostra, em relação aos demais testes de toxicidade aguda à salinidade de 34×10^{-3} . Isto, no entanto não pode ser dito com relação à quarta campanha de amostragem, onde o teste com essa espécie não foi realizado. A impossibilidade de coleta da espécie *M. juniae* para realização de testes de toxicidade com a amostra coletada na quarta campanha desta siderúrgica mostra a necessidade de cultivo dessa espécie em laboratório.

A manutenção ou cultivo de organismos-teste em laboratórios é um procedimento recomendado desde que exista a proposta de realização periódica de testes de toxicidade. Este procedimento também é importante para que procedência, idade e estado nutricional dos organismos em teste sejam conhecidos (USEPA, 1988, 1991a).

Segundo DeLISLE & ROBERTS (1988), a aclimatação é um fator importante na determinação da tolerância à salinidade sendo que variações na salinidade podem influenciar a toxicidade de substâncias puras. Estudos realizados por GENTILE *et al.* (1982) indicam um possível efeito da salinidade na toxicidade aguda do cádmio para *M. bahia*. Tem sido demonstrado que a toxicidade aguda do cádmio diminui com o aumento da salinidade para uma

variedade de crustáceos (O'HARA, 1973; VERRIOPOULOS & MORIATOU-APOSTOLOPOULOU, 1981; VOYER *et al.*, 1982).

No entanto, a realização dos testes de toxicidade com *M. juniae* a 21×10^{-3} , após aclimação dos organismos através da redução gradual da salinidade da água de manutenção, permitiu a comparação da sensibilidade da espécie a agentes tóxicos nesta salinidade e a 34×10^{-3} , observando-se que este fator não interferiu consideravelmente na toxicidade do efluente da COSIPA (tab. 3).

Comparando-se os resultados dos testes realizados na quinta campanha de coleta da COSIPA, entre *M. juniae* e *Artemia* sp nestas salinidades, verificamos que *M. juniae* sempre foi mais sensível. Nesta campanha também não foi verificada diferença significativa nos resultados dos testes entre as duas salinidades testadas, tanto para *M. juniae* como para *Artemia* sp (tab. 3)

Devido aos resultados semelhantes, a exclusão das etapas de aclimação gradual dos organismos faz com que os ensaios a 34×10^{-3} , que facilitam a execução do teste, venham a ser recomendados para avaliação da toxicidade de efluentes líquidos lançados em estuários. Testes com a espécie estuarina *M. bahia* são, atualmente, prática rotineiras para avaliação de efeitos tóxicos de efluentes industriais lançados em ambientes costeiros nos EUA, sendo recomendados pela agência de proteção ambiental (USEPA, 1988, 1991a, 1992, SCHIMMEL *et al.*, 1989).

A exclusão dos testes com copépodos na quinta campanha da COSIPA e nas amostragens da ULTRAFÉRTIL, ocorreu devido à sensibilidade semelhante deste grupo e dos misidáceos, e à maior precisão analítica dos

ensaios com os últimos, como foi evidenciado em relação à substância de referência (NIPPER *et al.* 1993).

A impossibilidade de aproveitar os resultados obtidos com *Artemia* sp, nas três primeiras campanhas de amostragem da siderúrgica ocorreu devido à verificação de que o lote de cistos utilizado devia estar com a qualidade alterada, provavelmente em função do tempo ou forma de estocagem, sendo que após substituição do referido lote, os resultados passaram a ser mais consistentes. Ainda assim, as demais amostras de efluente não se mostraram tóxicas para essa espécie, nas condições de teste, à salinidade de 34×10^{-3} .

É necessário salientar que não foram conduzidos experimentos com *L. variegatus* em diferentes salinidades, pois em estudos anteriores realizados por NIPPER *et al.* (1991) foi verificado que abaixo de 28×10^{-3} a fertilização é reduzida. Resultado semelhante foi demonstrado em OSHIDA *et al.* (1981), tanto sobre a fertilização quanto sobre o desenvolvimento larval de *Strongylocentrotus purpuratus*. Tal fato seria esperado, uma vez que os equinóides são um grupo essencialmente marinho.

Os resultados dos testes de toxicidade crônica de curta duração para avaliação da taxa de fecundação com *L. variegatus*, excetuando-se a segunda campanha de amostragem da COSIPA, não foram considerados em função da baixa taxa de fecundação no controle. Em estudo anterior foi verificado que a partir de cerca de 80 minutos em contato com água do mar a capacidade dos espermatozóides de *L. variegatus* em promover a fecundação é diminuída (PRÓSPERI & NIPPER, dados não publicados).

Sabe-se que os gametas masculinos ao entrar em contato com água do mar, vão perdendo a capacidade de promover a fecundação (STEARNS, 1973). Quando uma suspensão de sêmem de ouriço é diluída em água do mar, o consumo total e a taxa de tomada de oxigênio pelos espermatozóides aumenta. Esse fato é denominado "efeito de diluição" e tem sido atribuído à ação de elementos traços de íons metálicos, presentes na água do mar, sobre as enzimas respiratórias dos espermatozóides. ROTHSCILD & TUFT (1950).

Dessa forma, para garantir sua viabilidade, os espermatozóides foram coletados com pipeta Pasteur e colocados num béquer sobre gelo, sem contato com a água do mar. Seria ideal que o número de espermatozóides por óvulo, neste tipo de teste, fosse constante ao longo de todos os experimentos. Para isto, no entanto, seria necessária uma contagem prévia, após ativação do esperma com água do mar. O processo de contagem, em câmara de Neubauer, é bastante demorado, sendo inviabilizado pelo próprio tempo gasto para sua execução. Além disso, sabe-se que o número mínimo de espermatozóides por óvulo, necessário para promover a proporção de fecundação aceitável para os controles, pode variar sazonalmente, para diferentes espécies de equinóides (EPS, 1991). Devido a isto, decidiu-se padronizar a exposição dos espermatozóides contidos em 100 μ l da solução padrão, constituída de 0,5ml de sêmem + 24,5ml de água do mar. A escolha desse volume baseou-se nos testes efetuados anteriormente, embora seja fato conhecido que a introdução de um elevado número de espermatozóides e/ou qualquer outro material particulado no frasco-teste, pode diminuir a biodisponibilidade da substância-teste e conseqüentemente reduzir seus efeitos ao organismos. Além disso existe possibilidade de introdução de um maior número de gametas resistentes ao agente tóxico e, portanto, capazes de fecundar os óvulos no decorrer do ensaio (NIPPER *et al.*, 1991).

Essa padronização a princípio pareceu viável, no entanto, apesar da contagem do número de espermatozóides por óvulo, efetuada posteriormente ao encerramento do teste, ter revelado grande número de espermatozóides expostos em cada experimento, não foi observada fecundação aceitável nos controles da maioria dos ensaios.

Como foi possível verificar, quando 54×10^3 espermatozóides por óvulo foram adicionados ao frasco teste a fecundação ocorreu, e foi possível calcular CE50 para a substância de referência e CENO para o efluente. Essa foi a maior quantidade de espermatozóides adicionada aos frasco-teste em todos os experimentos. Esse número, porém, é bastante elevado, considerando-se que em ensaios anteriores NIPPER *et al.* (1990) observaram que $1,5 \times 10^3$ espermatozóides/óvulo eram suficientes para promover a fecundação de 97,3% dos óvulos. Novamente deve ser lembrado que pode haver variação sazonal nesta taxa, além de a mesma ser normalmente distinta para diferentes espécies (EPS, 1991).

Portanto, em função dos resultados obtidos nos experimentos para avaliação da taxa de fecundação, nas primeiras quatro campanhas com o efluente da COSIPA, resolveu-se excluí-lo, a partir de então.

Ensaio com gametas e embriões de ouriços tem sido bastante utilizados. Comparando os resultados obtidos para os dois tipos de teste com *L. variegatus*, apenas na segunda campanha da COSIPA, é possível verificar que o teste para avaliação do desenvolvimento embriolarval foi mais sensível do que aquele para avaliação da taxa de fecundação, com CENO de 5 e 10%, respectivamente. NIPPER *et al.* (1993) verificaram sensibilidade semelhante dos dois métodos para o zinco, em uma série de testes realizados com esta

espécie, o que também ocorreu no presente experimento, obtendo-se CE50 para essa substância de 0,047 e 0,055mg/l, nos testes de fecundação e embriolarval, respectivamente.

Experimentos realizados por KOBAYASHI (1977) utilizando *Anthocardis crassispina* revelaram que os efeitos de alguns metais (HgCl_2 , Zn_2Cl_2 , $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) foram mais acentuados sobre a formação de pluteus do que para os demais estágios testados, dentre eles a formação da membrana de fertilização. Isto reforçou a decisão de não se aplicar mais o ensaio de fecundação, uma vez que além de nem sempre apresentar resultados aproveitáveis, apresenta sensibilidade relativamente semelhante à do teste embriolarval com a mesma espécie.

OSHIDA *et al.* (1981) realizaram experimentos para comparação da sensibilidade de peixes dulcícolas, utilizados até então para testes de toxicidade com efluentes municipais descartados em áreas costeiras, e gametas e embriões de equinodermos. Os resultados mostraram que os ensaios com peixes foram menos sensíveis e frequentemente demonstraram 100% de sobrevivência em 50 a 100% de efluente, enquanto que a fertilização dos ouriços foi reduzida em concentrações entre 1 a 7% do efluente.

Segundo os referidos autores, testes com ouriços apresentam vantagens nos estudos da toxicidade de despejos em ambientes marinhos, uma vez que se utiliza um organismo representativo do ambiente e que apresenta sensibilidade para detectar alterações na toxicidade do efluente quando ocorrem mudanças nas operações da indústria.

A aplicação da fórmula CL ou CE50/10 fornece uma estimativa da toxicidade crônica, expressa em CENO (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990), a partir de dados de toxicidade aguda. Este método pode ser recomendado, quando da impossibilidade de se aplicar testes de toxicidade crônica devido à inexistência de métodos apropriados.

A aplicação desta fórmula para os resultados obtidos com *M. juniae* fornece valores estimados de 0,8; 6,0 e 6,5%, respectivamente na primeira, terceira e quinta campanhas com o efluente da COSIPA. Embora sejam espécies e métodos totalmente diferentes, e a comparação possa ser efetuada com ressalvas, os dados estimados para *M. juniae* apenas na terceira amostragem não apresentam similaridade com os resultados obtidos nos testes crônicos de curta duração para avaliação do desenvolvimento embrionário com *L. variegatus* (tab. 3).

Já a aplicação da mesma fórmula, para cálculo do valor estimado da CENO, com os resultados do teste de toxicidade aguda com *D. similis* na primeira campanha (Anexo I), resultaria num valor da CENO de 8,6%, sendo sete vezes maior do que o resultado obtido no teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. Além disso, na segunda, terceira e quinta amostragens o efluente não foi tóxico para *D. similis*, enquanto que para *C. dubia* a CENO foi de 30%. Essa constatação reforça a necessidade de realização de testes crônicos para proteção da biota aquática.

Com relação aos experimentos realizados com o efluente da ULTRAFÉRTIL, os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda à salinidade de 34×10^{-3} apontaram *M. juniae* como a espécie mais sensível, uma vez que para *Artemia* sp o efluente não causou efeito tóxico agudo (tab. 6).

O efluente salinizado para 21×10^{-3} também apresentou maior toxicidade para *M. juniae*, nas três campanhas de amostragem. Para *Artemia* sp e *P. phosphoreum* (tab. 6 e Anexo II), o efluente foi tóxico apenas na primeira campanha, sendo que este último organismo apresentou menor sensibilidade quando comparado com as outras espécies testadas.

Avaliando os resultados dos testes com *M. juniae* e *Artemia* sp a 21 e 34×10^{-3} (tab. 6) é possível dizer que a salinidade também não interferiu na toxicidade desse efluente, uma vez que os resultados nas três campanhas foram semelhantes.

Deve-se ressaltar novamente que dependendo da salinidade a ser atingida, uma maior quantidade de salmoura e, conseqüentemente, menor porcentagem de efluente, poderá ser obtida. Esse fato pode dificultar o cálculo da CL50, como pode ser verificado na terceira amostragem para *Artemia* sp, onde apenas foi detectada mortalidade de 20% dos organismos em 79% do efluente analisado (tab.9). Essa foi a maior concentração final de efluente na amostra após o processo de salinização. Este, no entanto, é um procedimento usual, padronizado para utilização em testes com organismos marinhos, sempre que necessário (USEPA, 1988). Embora seja recomendado o uso de salmoura preparada pelo processo de evaporação e com salinidade inferior ou igual a 100×10^{-3} , foram observados, no presente trabalho, efeitos adversos sobre *Artemia* às salinidades 15 e 34×10^{-3} e a embriões de *L. variegatus*, independentemente da salinidade da salmoura utilizada. Nas amostras preparadas por congelamento observou-se efeito sobre *Artemia* sp nas diferentes salinidades e *T. stylifera*. Devido à facilidade de obtenção de salmoura por congelamento, optou-se a partir da quinta campanha da COSIPA,

pela utilização deste processo, uma vez que é importante efetuar este tipo de controle em ensaios que utilizem amostras salinizadas.

Aplicando-se novamente a fórmula para estimativa da toxicidade crônica, a partir da CL50 (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990), verifica-se que os valores estimados para CENO com a espécie *M. juniae* a 34×10^{-3} seriam de 0,19; 2,24 e 0,84%. A comparação com os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica de curta duração com *L. variegatus* (tab. 6) aponta a segunda amostragem com valor estimado para *M. juniae* cerca de quatro vezes maior ao obtido nos testes com o equinóide, reforçando novamente a necessidade de realização de testes de toxicidade crônica.

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com este efluente utilizando organismos de água doce na primeira e terceira campanhas de coleta foram similares para *D. similis* e *C. notomelas*, sendo que apenas os ensaios realizados na segunda campanha indicaram que o efluente foi consideravelmente mais tóxico para *C. notomelas* (Anexo II).

A aplicação da fórmula apresentada em GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.* (1990) para os testes de toxicidade aguda com *D. similis* fornece valores estimados para CENO de 5,5 e 2,8%, respectivamente na segunda e terceira amostragens (Anexo II). Comparando-se os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica com *C. dubia* é possível verificar que essas estimativas estão dentro da mesma ordem de magnitude, porém esse fato não determina a exclusão dos testes de toxicidade crônica para avaliação de efluentes, uma vez que as espécies comparadas são diferentes e existe possibilidade de executá-los.

Nas comparações entre os resultados dos ensaios marinhos e dulcícolas do presente projeto, foi possível verificar que:

1 - Nos testes de toxicidade aguda com os dois efluentes os resultados demonstram que *M. juniae* apresenta maior sensibilidade do que *D. similis* e *C. notomelas*, à exceção da primeira amostra do efluente da ULTRAFÉRTIL, para a qual os métodos apresentaram sensibilidade similar (tabs. 3 e 6; Anexos 1 e 2).

2 - Nos testes de toxicidade crônica *L. variegatus* apresentou maior sensibilidade do que *C. dubia*, com diferença dos valores da CENO variando de 5 a 30 vezes, excetuando-se a primeira amostra do efluente da COSIPA e terceira da ULTRAFÉRTIL, nas quais os valores de CENO estão dentro da mesma faixa (tabs. 3 e 6; Anexos 1 e 2)

Existe uma grande discussão sobre a intensidade do efeito tóxico em ambientes marinhos e dulcícolas. As diferentes propriedades dos dois ambientes, a forma e eficácia do contaminante no tipo de água utilizada e as diferenças fisiológicas intrínsecas das espécies indicadoras de água doce e marinhas são citadas em SAMOILLOFF & WELLS (1984).

BUIKEMA *et al.*(1981) estudando o efeito de um efluente de uma refinaria sobre *M. bahia* cita que em comparação realizada com resultados obtidos anteriormente por ele com 18 organismos de água doce, *D. pulex* foi a única espécie tão sensível quanto o misidáceo.

Por estas razões, salientando também as possíveis diferenças na sensibilidade entre organismos marinhos e de água doce e a inabilidade desses

últimos em avaliar a qualidade das águas receptoras marinhas, e para responder às mudanças do National Pollutant Discharge Elimination System (NPDES), no que se refere às permissões para regulamentação de emissão de efluentes, foram desenvolvidos, nos EUA, testes rápidos (7 dias) para detectar concentrações de efeito crônico de efluentes municipais e industriais com organismos dulcícolas e estuarinos/marinhos (HUGHES *et al.*, 1989).

Paralelamente a isso, SCHIMMEL *et al.*(1989) também publicaram resultados de testes com quatro organismos (alga, ouriço, misidáceo e peixe) marinhos, que foram desenvolvidos pela USEPA para avaliação de efluentes municipais, industriais e águas receptoras. Enfim, foram desenvolvidas metodologias específicas, tanto para organismos de água doce quanto para organismos marinhos/estuarinos com o objetivo de avaliar o efeito tóxico de efluentes líquidos sobre os organismos pertencentes aos distintos corpos hídricos.

Conforme já foi mencionado, não existem, até o momento, critérios para lançamento de efluentes tóxicos em ambientes marinhos e estuarinos no Estado de São Paulo. Porém, através desse estudo, onde foi possível também comparar os métodos para organismos de água doce disponíveis na CETESB, pode-se afirmar que os critérios , no que se refere à toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas estuarinas, devem ser efetuados através de metodologias com organismos marinhos, os quais, de maneira geral, apresentam maior sensibilidade em relação aos métodos com organismos dulcícolas. Além disso, os testes com organismos marinhos podem expressar uma situação mais próxima da real, uma vez que nas águas estuarinas haverá uma interação entre o efluente e um maior gradiente de sais dissolvidos, ao contrário do que ocorre em águas continentais.

A conveniência do uso desses organismos é reforçada pois a salinidade medida nas proximidades do ponto de lançamento dos efluentes estudados oscila entre 6,6 e $32,3 \times 10^{-3}$ (dados de um relatório interno da COSIPA) e, segundo USEPA (1991b) organismos marinhos/estuarinos devem ser utilizados em corpos receptores que tenham salinidade igual ou superior a 1×10^{-3} . Além disso, a aplicação de dados de testes com organismos dulcícolas para ambientes marinhos é considerada como uma prática questionável e não é cientificamente justificável (DAVIS *et al.*, 1978).

Na impossibilidade de uso de testes de toxicidade aguda com organismos marinhos, para controle desses efluentes, poder-se-ia utilizar organismos de água doce, desde que aos resultados de CL50 fosse aplicado um fator de 0,1, para se extrapolar o resultado para organismos marinhos, relativo à diferença máxima entre os valores de CL50 obtidos com *M. juniae* e *D. similis*, observados na primeira campanha da COSIPA)

O estudo da variabilidade da toxicidade de efluentes é um instrumento utilizado para auxiliar o estabelecimento de limites de emissão de efluentes em corpos receptores, e com esta finalidade, qualquer um dos métodos mencionados a seguir, poderá vir a ser aplicado.

Tanto o efluente da COSIPA quanto da ULTRAFÉRTIL apresentaram grande variabilidade na toxicidade ao longo do período de estudo, de acordo com a toxicidade e coeficiente de variação apresentado para as diferentes espécies. A utilização dos diferentes métodos com organismos marinhos e dulcícolas (*M. juniae*, *D. similis* e *C. notomelas*) revelaram resultados de variabilidade dentro da mesma ordem de magnitude, portanto pode-se verificar que a variabilidade foi devida exclusivamente à constituição do efluente e não

aos métodos utilizados para determinação da toxicidade. Resultados semelhantes com o efluente de uma refinaria foram obtidos para *M. bahia*, *P. promelas* e *C. dubia* (USEPA, 1991a).

Substâncias de referência são aquelas usadas em testes de toxicidade para avaliar a sensibilidade de organismos a uma determinada substância tóxica ao longo do tempo. Quando as condições-teste são as mesmas os resultados fornecem uma estimativa das condições de diferentes grupos de organismos-teste, determinando a condição dos organismos no período do experimento.

Se o resultado com a substância de referência diferir de uma faixa de resultados de testes previamente obtidos, ou seja, da média dos valores de toxicidade acrescida ou diminuída duas vezes o seu desvio padrão ($X \pm 2S$) (CETESB, 1992a,b), as condições a que foram submetidos os organismos deverão ser revisadas para serem corrigidas num teste posterior. Se os parâmetros físico-químicos e metodológicos do teste estiverem dentro dos padrões, deve-se utilizar os resultados com restrição, devido à sensibilidade alterada do lote de organismos-teste em questão.

NIPPER & PRÓSPERI (1993), com os resultados de testes realizados ao longo de quatro anos definiram, como aceitável, uma variabilidade dos valores de CL e CE50, para o zinco, de 0,25 a 0,45mg/l para *M. juniae* e 0,014 a 0,106mg/l para embriões de *L. variegatus*. Os resultados de CL e CE50 obtidos com essa mesma substância, para esses organismos, no presente estudo, estão dentro deste intervalo (tab. 7).

Outro fator a ser considerado refere-se à precisão analítica dos resultados, pois independentemente de quais sejam as análises escolhidas é importante

avaliar a precisão dos resultados obtidos, possibilitando assim a comparação dos mesmos, bem como a confiabilidade do método utilizado (BERTOLETTI *et al.*, 1989).

No presente estudo, ensaios com as substâncias de referência zinco e DSS em testes com *M. juniae* e *Artemia* sp, respectivamente, apresentaram coeficiente de variação de 19,8% e 17,7 %, à salinidade de 34×10^{-3} e 14,2% e 28,9% à salinidade de 21×10^{-3} . SCHAEFFER *et al.* (1987) classificam as três primeiras faixas de variabilidade de dados de CL50 como média, e a última como alta variabilidade.

Com relação aos testes de toxicidade crônica de curta duração para avaliação do desenvolvimento embriolarval com *L. variegatus* utilizando o zinco, o coeficiente de variação foi de 31%, bem próximo do teste de toxicidade aguda com *Artemia* sp, que apresentou 28,9%.

JOP (1989), considera que o coeficiente de variação de testes com substâncias de referência não devem ser superiores a 40%. Portanto, como os testes realizados com essas espécies apresentaram variabilidade abaixo desse limite, pode-se considerar que apresentam uma boa precisão analítica.

A baixa variabilidade dos testes com *M. juniae* pode ser atribuída à utilização de jovens nascidos em laboratório, oriundos de fêmeas coletadas em campo. A mesma suposição é cabível para testes com *Artemia* sp, pois os náuplios de *Artemia* são obtidos em laboratório a partir de cistos de boa qualidade.

O coeficiente de variação para os testes, com zinco, no caso do copépodo *T. stylifera* foi de 156,9%. Essa grande variabilidade observada nos testes com *T. stylifera* provavelmente está relacionada ao fato de que os ensaios foram realizados com organismos adultos triados após a coleta e cujas informações de condições nutricionais e idade são completamente desconhecidas. O mesmo pode ter ocorrido com *A. lilljeborgi*, utilizada apenas no teste da terceira campanha de amostragem da COSIPA que apresentou, em estudo realizado por NIPPER *et al.* (1991), um coeficiente de variação de 56,4% para essa mesma substância de referência.

Estudos da variabilidade dos testes de toxicidade com as espécies *D. similis* e *C. notomelas*, também mencionadas neste trabalho, foram realizados com diversas substâncias e a precisão dos resultados, expressa como coeficiente de variação com zinco para *D. similis* foi de 15,4% (BERTOLETTI *et al.*, 1992) e para *C. notomelas*, 19,9% (BERTOLETTI *et al.*, 1989). MORRISON *et al.* (1989) cita que um alto grau de precisão em testes ecotoxicológicos foi demonstrado em estudos com *D. magna*, cujo coeficiente de variação variou de 8,6 a 29,3% para testes realizados durante 24 horas, e de 5,6 a 21,4% em testes de 48 horas. Esses valores são bem próximos aos obtidos nos testes de toxicidade com organismos marinhos, no presente estudo.

Enfim, os coeficientes de variação obtidos indicam uma boa precisão dos testes de toxicidade e os torna adequados para uso rotineiro no controle de agentes químicos que serão dispostos em recursos hídricos (BERTOLETTI *et al.*, 1989; 1992).

Com base na sensibilidade e/ou nos coeficientes de variação obtidos nos testes de toxicidade aguda é reforçada a conveniência da utilização de

organismos marinhos, para estabelecimento de critérios de emissão de efluentes industriais descartados em áreas estuarinas. Podem ser recomendados os testes de toxicidade crônica com *L. variegatus* e testes de toxicidade aguda com *M. juniae*.

Os resultados das análises químicas efetuadas com o efluente da COSIPA apresentaram teores elevados de cianeto, ferro, amônia e fenóis, especialmente na primeira campanha. Esses componentes são citados por BRAILE (1979) como os maiores responsáveis pela toxicidade dos despejos das indústrias de ferro e aço. Além destes, também os teores do cromo hexavalente, resíduo sedimentável e manganês solúvel foram elevados nesta amostra. De maneira análoga, nesta campanha o efluente mostrou-se mais tóxico para a maioria dos organismos.

Através da comparação das tabelas 10, 12 e 13, pode-se verificar que algumas substâncias contidas no efluente estavam presente em concentrações elevadas o suficiente para causar efeitos tóxicos às espécies experimentais, bem como a outras espécies, também citadas nas tabelas 12 e 13. Na presente discussão será dada ênfase às espécies por nós estudadas. Por exemplo, na primeira campanha na COSIPA, o teor de zinco (0,20mg/l) poderia ter causado efeito tóxico agudo e crônico a *T. stylifera* e *L. variegatus*, respectivamente, causando também efeito tóxico para uma série de outras espécies mencionadas nas tabelas 12 e 13. Também os teores de cromo hexavalente (0,05mg/l) poderiam causar o efeito tóxico observado para *D. similis*. A concentração de cobre (0,03mg/l) poderia afetar essa mesma espécie e *T. stylifera* e cianeto (28,0mg/l) poderia ter afetado *P. phosphoreum* e *D. similis*, além das demais espécies estudadas por outros autores.

A fração de NH_3 foi calculada a partir do teor de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$), através de tabela apresentada por BOWER & BIDWELL (1978), que leva em conta o pH, salinidade e temperatura da amostra. A concentração de NH_3 , na maior concentração do efluente obtido após salinização à 34×10^{-3} , seria, por ordem de campanha, de 0,33, 0,11, 0,23, 0,29 e 0,10mg/l. Verifica-se que *L. variegatus* seria afetado por esses teores em todas as campanhas.

Na segunda, quarta e quinta campanhas de amostragem os teores de cobre total (0,02, 0,02 e 0,19mg/l, respectivamente) e os teores de zinco total nas duas últimas amostragens (0,26 e 0,25mg/l) afetariam *D. similis* e *T. stylifera*.

Na terceira campanha *A. lilljeborgi*, *M. juniae*, *P. phosphoreum* e *L. variegatus* poderiam ter sido afetados, também, pela concentração de zinco (13,4mg/l) no efluente, sendo que essa última espécie também poderia ter sido afetada pelo zinco detectado no efluente na quarta (0,26mg/l) e quinta (0,25mg/l) campanhas de amostragem.

Convém destacar, também, que apesar da concentração de cobre (0,02mg/l) na segunda campanha e do cobre (0,05mg/l) e zinco (13,4mg/l) na terceira campanha, o efluente não foi tóxico a *D. similis* (Anexo II). Da mesma maneira o teor de zinco na terceira campanha não foi suficiente para causar efeito tóxico para *P. phosphoreum*, assim como o teor de nitrogênio amoniacal não foi suficiente para causar efeito tóxico sobre *Artemia* sp à 34×10^{-3} na quarta campanha, e em ambas as salinidades, na quinta. Deve ser lembrado, no entanto, que os efeitos do N-amoniacal dependem da concentração existente, na forma de amônia não ionizada (NH_3), que é considerada a fração tóxica da amônia total (BOWER & BIDWELL, 1978).

A interpretação dos resultados, no entanto, não é tão simples, pois interações entre os contaminantes presentes nas amostras podem diminuir ou aumentar o efeito tóxico aos organismos.

Com relação à Ultrafértil, deve-se ressaltar que as concentrações de nitrogênio amoniacal presentes em todas as amostragens (tab. 11), isoladamente, poderiam ser suficientes para causar efeito tóxico a *D. similis* e *Artemia* sp (tab. 12).

Verificando a adequação das substâncias aos padrões de emissão para lançamento de efluentes na Resolução CONAMA Art. 21 (tab. 11), pode-se observar que apenas dois parâmetros dos nove analisados constam da referida Resolução. Os teores de fluoreto nas três amostragens apresentaram-se dentro do padrão de emissão, enquanto que óleos e graxas ultrapassaram o limite nas primeira e terceira amostragens.

Aplicando-se novamente a fórmula sugerida por BOWER & BIDWELL (1978) para obtenção da fração de NH_3 a partir do teor de amônia total, teremos, por ordem de campanha a 34×10^{-3} , 15,43, 3,27 e 4,77mg/l. Essas concentrações seriam suficientes para causar o efeito tóxico observado para *P. phosphoreum* e *L. variegatus* em todas as campanhas (tabs. 12 e 13), embora o efluente não tenha sido tóxico para o primeiro organismo nas duas últimas amostragens. Esse mesmo fato poderia ser apontado para *Artemia* sp com relação ao teor de nitrogênio amoniacal.

Os valores isolados obtidos através das análises químicas dos efluentes, mesmo apresentando-se dentro dos limites estabelecidos, podem não garantir a qualidade das águas e a manutenção da vida aquática. Isso pode ser verificado

pela comparação de algumas substâncias presentes no efluente da COSIPA, contempladas por esta Resolução (tab. 10) e os resultados de testes de toxicidade apresentados nas tabelas 12 e 13. Por exemplo, o parâmetro estabelecido como aceitável para Cu (1,0mg/l) não seria suficiente para proteger *D. similis*, *A. lilljeborgi*, *T. stylifera* e *L. variegatus*, enquanto que o teor de Zn (5,0mg/l) não protegeria *P. phosphoreum*, da mesma forma que 0,5mg/l de Cr^{6+} não seria protetivo para *D. similis*.

É necessário, portanto, ressaltar novamente a necessidade de testes de toxicidade, que irão avaliar o efeito do conjunto de substâncias biodisponíveis e suas interações no efluente.

Embora não tenham sido analisados, no presente estudo, as concentrações no corpo receptor e na biota, uma questão importante no que se refere aos ambientes estuarinos é a utilização, pelo homem, dos organismos presentes nesses ambientes. Segundo informações da população que trabalha próximo a essas indústrias foram observados vários procedimentos de pesca ao redor do estuário do Rio Cubatão. Esse fato é preocupante ao ser diretamente correlacionado com a presença dessas inúmeras substâncias químicas observadas nestes despejos, e seu possível acúmulo nos organismos, além do que regiões estuarinas são verdadeiros berçários para inúmeras espécies ou abrigam outras por parte do seu ciclo de vida.

Muitos organismos aquáticos são consumidos como alimento e são conhecidos por concentrar metais traço potencialmente tóxicos diretamente do ambiente, mas os dados sobre os processos biológicos envolvendo esses fenômenos são relativamente limitados (ENGEL *et al.*, 1981).

Esses mesmos autores citam que lisossomos tem sido apontados como importantes na compartimentação intracelular do ferro, mercúrio, chumbo, cobre e zinco em invertebrados marinhos. A fixação do calcio-fósforo intracelular em fígado de bivalves marinhos e hepatopâncreas de crustáceos também tem sido primariamente responsáveis por altos níveis de vários metais traço potencialmente tóxicos encontrados nesses organismos. O principal aspecto a ser derivado desses estudos é que espécies marinhas parecem possuir uma variedade de mecanismos para metabolizar e acumular metais tóxicos do ambiente.

Essas informações são essenciais e geram preocupação, porque é necessário compreender como esses mecanismos são relacionados com a sobrevivência dos organismos e como isso pode influenciar a toxicidade de metais para os seres humanos que consomem organismos marinhos como alimento.

5 - CONCLUSÕES

1 - Critérios que contemplem o impacto de efluentes tóxicos em corpos receptores, particularmente em águas estuarinas, devem se basear na utilização de testes de toxicidade com organismos marinhos, até que sejam desenvolvidos testes de toxicidade com organismos estuarinos.

2 - O misidáceo *M. juniae* é recomendado para testes de toxicidade aguda e o equinodermo *L. variegatus* para testes de toxicidade crônica de curta duração, com efluentes lançados em estuários.

3 - Caso sejam estabelecidos critérios para o controle de efluentes tóxicos descartados em áreas costeiras, especificamente no ponto de saída do efluente, tanto os organismos de água doce (*D. similis*, *C. notomelas* e *C. dubia*), como os organismos marinhos (*M. juniae* e *L. variegatus*) podem ser utilizados.

4 - Os testes de toxicidade recomendados, com organismos marinhos, apresentaram precisão analítica similar aos testes já desenvolvidos com organismos de água doce.

5 - Em geral, o uso de salmoura para salinização dos efluentes não apresentou efeito adverso sobre os organismos-teste, sendo recomendada a utilização do processo de congelamento para obtenção da mesma.

6 - A utilização isolada de parâmetros físico-químicos pode não garantir a ausência de efeitos tóxicos de efluentes industriais, o que pode comprometer a qualidade das águas e a preservação da vida aquática. A utilização de testes de

toxicidade é recomendada, uma vez que são instrumentos disponíveis e de grande utilidade para detecção de efeitos adversos para a biota aquática.

7 - O desenvolvimento de cultivo de *M. juniae* e manutenção de *L. variegatus* em laboratório, são atividades necessárias para que se possa viabilizar a execução de testes sempre que necessário, sem a dependência de coletas em campo.

6 - RESUMO

Com o objetivo de aplicar e avaliar a viabilidade de uso dos métodos disponíveis com organismos marinhos, no controle da toxicidade de efluentes líquidos que são lançados em ambientes estuarinos, foram realizados testes de toxicidade aguda com os crustáceos *Mysidopsis juniae*, *Artemia* sp, *Temora stylifera* e *Acartia lilljeborgi* e testes de toxicidade crônica de curta duração com o equinodermo *Lytechinus variegatus*, utilizando-se os efluentes industriais de uma indústria siderúrgica, COSIPA e uma fábrica de fertilizantes, ULTRAFÉRTIL/ JARDIM SÃO MARCOS, ambos lançados no estuário do Rio Cubatão.

Dentre os organismos-testes utilizados, para avaliação do efeito tóxico agudo, o misidáceo *M. juniae* foi o mais sensível para ambos os efluentes, sendo que *Artemia* sp foi o menos sensível. Testes de toxicidade crônica com *L. variegatus* também se mostraram bastante úteis para avaliação de efeitos subletais.

Os efluentes analisados apresentaram grande variabilidade durante o período de estudo, o que foi evidenciado através do cálculo do coeficiente de variação para testes com *M. juniae*.

Foi avaliado, também, o efeito da salinidade sobre a sensibilidade dos crustáceos *M. juniae* e *Artemia* sp a agentes químicos (zinco e DSS) e aos efluentes industriais. A salinidade não interferiu significativamente nos resultados observados, com exceção de um experimento realizado a 15×10^{-3} com *Artemia* sp, com o efluente da COSIPA.

Verificou-se, ainda, o possível efeito da utilização de salmoura obtida através dos processos de congelamento e evaporação da água do mar, sendo que o primeiro processo foi indicado para salinização de efluentes.

7 - SUMMARY

Acute toxicity tests with the crustaceans *Mysidopsis juniae*, *Artemia* sp, *Temora stylifera* e *Acartia lilljeborgi* and short-term chronic toxicity test with the echinoderm *Lytechinus variegatus* were conducted with the objective of evaluating the appropriateness of their application for the control of liquid effluents disposed off in estuarine environments. Effluents of a siderurgic industry, COSIPA, and of a fertilizer plant, ULTRAFÉRTIL/JARDIM SÃO MARCOS, were used. Both are discharged into the estuary of Cubatão river.

The test with *M. juniae* was the most sensitive of the acute methods, for both kinds of effluents, while that with *Artemia* sp was the least sensitive. Chronic toxicity test with *L. variegatus* showed to be very useful for the evaluation of sublethal effects.

The different effluent samples of both industries had great variability in their toxic effects, along the different sampling periods, as was evidenced by the high coefficient of variation for tests with *M. juniae*.

The effects of salinity on the sensitivity of *M. juniae* and *Artemia* sp to chemicals (zinc and DSS) and to the industrial effluents, was evaluated. Salinity did not significantly affect the test results, except for the experiment conducted at 15×10^{-3} with *Artemia* sp, with the effluent from the siderurgic industry.

The possible effect of the use of brine, obtained by freezing or evaporating sea water, was also analyzed. Freezing was the recommended procedure to salinize effluents.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, L.A. & GARCIA, A.M. Substancias ambientales y substancias xenobioticas. In: **Toxicología Ambiental**. Albert, L.A (ed). 1985, p.17-22.
- ALLEN, H. 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. **Mar. Poll. Bull.**, 2:138-140.
- ANDERSON, J.W.; NEFF, J.M.; COX, B.A.; TATEM, H.E. & HIGHTOWER, G.H. 1974. Characteristics of dispersions and water soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Mar. Biol.**, 27:75-88.
- ANDERSON, P.D.; D'APOLLONIA, S. Aquatic animals. In: **Principles of Ecotoxicology**. Butler, G. (ed.). Jonh Willey & Sonss, Inc, NY. 1978, p.56-72.
- APHA; AWWA; WPCF. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, American Pollution Control Federation. Washington. 1985, 14^a. ed.
- APHA; AWWA; WPCF. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, American Pollution Control Federation. Washington. 1989, 17^a. ed.
- ARNOTT, G.H. & AHSANULLAH, M. 1979. Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to three species of marine copepods. **Aust. J. Mar. Fresh. Res.**, 30:63-71.

Mont

- AUBERT, M. Toxicological studies in the field of oceanology. In: **International Congress on marine municipal and industrial wastewater disposal**. Jenkins, SH (ed). Italy. 1975, p.33-39.
- BADARÓ-PEDROSO, C. **Toxicidade crônica de amostras ambientais do canal de São Sebastião e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (Crustacea: Misidacea)**. 1993. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, no prelo.
- BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**, Livraria Roca Ltda (ed.) 1984 1179p.
- BAUDOUIM, M.F. & SCOPPA, P. 1974. Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, 12:7451-7461.
- BERTOLETTI, E. GHERARDI-GOLDSTEIN, E. & ZAGATTO, P.A..1989.Variabilidade de testes de toxicidade com peixes. **Ambiente**, 3(1):52-58.
- BERTOLETTI, E. 1990a. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Ciência e Cultura**, 42(3/4):271-277.
- BERTOLETTI, E. 1990b.Estimativa da carga tóxica de efluentes industriais. **Ambiente**, 4(1):54-61.
- BERTOLETTI, E. **Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição**. Série Didática- Água nº 11, São Paulo, CETESB, 1992, 80p.

- BERTOLETTI, E.; NIPPER, M.G. & MAGALHÃES, N.P. 1992. A precisão dos testes de toxicidade com *Daphnia similis*. **Ambiente**, 6(1):55-59.
- BOLDRINI, C.V.; EYSINK, G.G.J.; MARTINS, M.C. & LAMPARELLI, M.C. Contaminantes na Bacia do Rio Cubatão e seus reflexos na biota aquática. CETESB, São Paulo. 1990. Relatório Técnico, 81p.
- BOWER, C.E. & BIDWELL, J.P. 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, 35:1012-1016.
- BRAILE, P.M. & CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias**. São Paulo, CETESB. 1979, p.355-458.
- BRANCO, Z.C. & SÁ, P.T. **Poluição Ambiental na Baixada Santista**. Prefeitura Municipal de Cubatão, São Paulo, 1974, 128p.
- BRUNGS, W.A. & MOUNT, D.I. Introduction to a discussion of the use of aquatic toxicity tests for evaluation of the effects of toxic substances. In: **Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life**. ASTM Special Technical Publication 657. 1978, p.15-26.
- BUIKEMA, A.L.; NIEDERLEHNER, B.R. & CAIRNS, J.JR. 1981. The effects of simulated refinery effluent and its components on the estuarine crustacean *Mysidopsis bahia*. **Arch. Contamin. Toxicol**, 10:231-240.
- BURTON, JR., G.A. 1990. Ecotoxicology - the study of the effects of chemicals on natural systems. **Environ. Sci. Technol.**, 24(1):9.
- CETESB. **Poluição das águas no Estuário e Baía de Santos**. São Paulo, CETESB. 1978, 71p.

- CETESB. **Testes de pré-qualificação de dispersantes químicos.** São Paulo, CETESB. 1982, 43p.
- CETESB. **Água do mar - Teste de toxicidade aguda com *Artemia*.** Norma Técnica L5.021, 1991, 15p.
- CETESB. **Água do mar - Teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*,** Silva, 1979. Norma Técnica L5.251, 1992a, 19p.
- CETESB. **Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816.** Norma Técnica L5.250, 1992b, 20p.
- CHIA, FU-S. 1973. Killing of marine larvae by diesel oil. **Mar. Pollut. Bull.**, 4(2):29-30.
- CHEN, J-C.; CHEN, K-J. & LIAO, J-M . 1989. Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia* nauplii. **Aquacult.**, 77:329-336.
- COX, J.L. 1974. The use of the dilution water effect as a water quality criterion. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, 11(3):256-257. 100
- DAVIS, J.C.; GREER, G.L.; BIRTWELL, I. **Proceedings of the 4th Annual Aquatic Toxicity Workshop. Fisheries and Marine Service Technical Report 818.** 1978, 155p.
- DAY, JR., J.W.; HALL, C.A.S.; KEMP, W.M. & YÁÑEZ-ARANCIBIA. **Estuarine Ecology.** Willey-Interscience Publication. John Willey & Sons. Inc. 1989, p. 513-542.

- DeLISLE, P.F. & ROBERTS, M.H. 1988. The effect of salinity on cadmium toxicity to the estuarine mysid *Mysidopsis bahia*: role of chemical speciation. **Aquatic Toxicol.**, 12:357-370.
- DeWITT, T.H.; SWARTZ, R.C. & LAMBERSON, J.O.. 1989. Measuring the acute toxicity of estuarine sediments. **Environ. Toxicol. Chem.**, 8:1035-1048.
- DIEGUES, A.C. **Planejamento e gerenciamento costeiro: alguns aspectos metodológicos - versão preliminar.** 1988, 45p.
- DINNEL, P.A.; STOBBER, Q.J. & JULIO, D.H. 1981. Sea urchin bioassay for sewage and chlorinated seawater and its relation to fish bioassays. **Mar. Environ. Res.**, 5:29-39.
- DINNEL, P.A. & STOBBER, Q.J. 1985. **Methodology and analysis of sea urchin embryo bioassays.** Circular n^o 85-3 Fisheries Research Institute, School of Fisheries, University of Washington. 1985, 19p.
- DINNEL, P.; LINK, J.M. & STOBBER, Q.J. 1987. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. **Arch. Environ. Contamin. Toxicol.**, 16: 23-32.
- DINNEL, P.; PAGANO, G.G. & OSHIDA, P.S. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: **Proceedings of the sixth International Echinoderm Conference.** Burke, R.D.; MLADENOV, P.V.; LAMBERT, P & PARSLEY, R.L. (eds). Balkema, Rotterdam. 1988, p. 611-619.
- DINNEL, P.A.; LINK, J.M.; STOBBER, Q.J.; LETOURNEAU, M.W. & ROBERTS, W.E. 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm

- bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, **18**:748-755.
- ENGEL, D.W.; SUNDA, W.G. & FOWLER, B.A. Factors affecting trace metal uptake and toxicity to estuarine organisms. I Environmental Parameters. In: **Biological monitoring of marine pollutants**. Academic Press, Inc. 1981, p.127-163.
- EPS. **Biological Test Methods - Fertilization assay with echinoids (sea urchin and sand dollars)**. Environmental Protection Conservation and Protection Environment Canada, Ottawa, Ontario. 1991, 85p.
- FERREIRA, M.F.S. Impacto dos poluentes metálicos em ecossistemas aquáticos. In: **I Seminário sobre poluição por metais pesados**. Brasília, SEMA. 1979, p.17-23.
- GENTILE, S.M.; GENTILE, J.H.; WALKER, L. & HELTSHE, S. 1982. Chronic effects of cadmium on two species of mysid shrimp: *Mysidopsis bahia* and *Mysidopsis bigelowi*. *Hydrobiologia*, **93**:193-205.
- GENTILE, J.H.; JONHS, D.M.; CARDIN, J.A. & HELTSHE, J.F. Marine ecotoxicological tests with crustaceans. In: **Marine Ecotoxicological Testing for the Marine Environment**. Persone, G.; Jaspers, E. & Claus, C. (eds.). State Univ. Ghent. and Int. Mar. Scient. Res. Belgium. 1984, vol.1, p.479-502.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAUJO, R.P.A. & RAMOS, M.L.C. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo, CETESB, 1990, 17p.

- GIORDANO, F. **Ouriços do Sublitoral Rochoso da Região de São Sebastião/São Paulo - Uma Abordagem Ecológica.** 1986. 128p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas.
- GIUDICE, G. 1973. **Developmental biology of the sea urchin embryo.** Academic Press, New York, 469p.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. 1977. **Environ. Sci. Technol.**, 11(7):714-719. Correction: 1978. 12(4):417.
- HOADLEY, L. 1923. Certain effects of the salts of the heavy metals on the fertilization reaction in *Arbacia punctulata*. **Biol. Bull.**, 44:255-280.
- HUGHES, M.M.; HEBER, M.A.; MORRISON, G.E.; SCHIMMEL, S.C. & BERRY, W.J. 1989. An evaluation of a short-term chronic effluent toxicity test using sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae. **Environ. Pollut.**, 60:1-14.
- JOP, K.M. Acute and rapid-chronic toxicity of hexavalent chromium to five marine species. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Conference.** U.M.Cowgill & L.R.Willians (eds.), American Society for Testing and Materials, ASTM STP 1027. Philadelphia. 1989, p.251-260.
- KOBAYASHI, N.1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. **Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.**, 18:379-406.

- KOBAYASHI, N. 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. **Publ. Seto. Mar. Biol. Lab., XXIV 1/3: 9-21.**
- KOBAYASHI, N. 1980. Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals. **Mar. Biol., 58: 163-171.**
- KOBAYASHI, N. 1981. Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersants to Canadian and Japanese sea urchin eggs. **Publ. Seto. Mar. Biol. Lab., XXVI 1/3: 123-133.**
- KOBAYASHI, N. Marine ecotoxicological testing with echinoderms. In: **Ecotoxicological testing for the marine environment.** Persone, G.; Jaspers, E. & Claus, C. (eds). State Univ. Ghent. and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium, 1984, vol 1, p. 341-405.
- LÉGER, P.; BENGSTON, D.A.; SORGELOOS, P.; SIMPSON, K.L. & BECK, A.D. The nutritional value of *Artemia*: a review. In: **Artemia Research and its applications.** Sorgeloos, P.; Bengston, D.A. Declerck, W & Jaspers, E. (eds). Universa Press, Belgium, 1987, vol.3, p.357-371.
- LILLIE, F.R. 1921. Studies of fertilization. X. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. **Biol. Bull., 41:125-143.**
- LOONING, S. & HANGSTRÖM, B.E. 1975. The effects of crude oils and the dispersant Corexit 8666 on sea urchin gametes and embryos. **Norw. J. Zool., 23:121-129.**

- LUSSIER, S.M.; GENTILE, J.H. & WALKER, J. 1985 Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (Crustacea:Mysidacea). **Aquat. Toxicol.**, 7:25-35.
- MACEK, K.J. 1980. Aquatic toxicology: fact or fiction. **Environ. Health Persp.**, 34:159-163.
- MACKENTHUN, K.M. Pollution caused environmental changes. In: **Toward a cleaner aquatic environment**. Office of air and water programs. 1973, p.43-56.
- MAKI, A.W. & BISHOP, W.E. Chemical safety evaluation. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Rand, G.M. & PETROCELLI, S.R. (eds). Washington, McGraw Hill, 1985, p.619-635.
- MARTIN, M.; HUNT, J.W.; ANDERSON, B.S.; TURPEN, S.L. & PALMER, F.H. 1989. Experimental evaluation of the mysid *Holmesimysis costata* as a test organism for effluent toxicity testing. **Environ. Toxicol. Chem.**, 8:1003-1012.
- MAUCHILINE, J. The biology of mysids and euphausiids. In: **Advances in Marine Biology**. Blaxter, J.; Russel, F. & Yonge, M.(eds.) Academic Press, London, England. 1980, vol. 18, p. 1-31.
- McKIM, J.M. EATON, J.G & HOLCOMBE, G.W. 1978. Metal toxicity to embryos and larvae of eight species of freshwater fish. II: copper. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, 19:608-616.
- McKIM, J.M. Early life stage toxicity tests. In: **Fundamentals of aquatic toxicology**. RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. (eds). Washington, McGraw Hill. 1985, p.58-95.

- MONROY, A. 1986. A Centennial debt of developmental biology to the sea urchin. **Biol. Bull.**, 171:509-519.
- MORRISON, G.; TORELLO, E.; CORNELEO, R.; WALSH, R.; KUHN, A.; BURGESS, R.; TAGLIABUE, M. & GREENE, W. 1989. Intralaboratory precision of saltwater short-term chronic toxicity tests. **Res. Journal WPCF**, 61(11/12):1707-1710.
- MUCHMORE, D. & EPEL, D. 1973. The effects of chlorination of wastewater on fertilization in some marine invertebrates. **Mar. Bull.**, 19:93-95
- NAVAS-PEREIRA, D. GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P.A. & SASSI, R. 1987. Bioensaios: Um Programa a Serviço do Controle da Poluição - Resultados Iniciais. **Ambiente**, 1:32-36.
- NEUHOLD, J.M. Toward a meaningful interaction between ecology and aquatic toxicology. In: **Aquatic Toxicology and Environmental fate: Ninth Volume**. ASTM Special Technical Publication 921, Philadelphia., 1985, p.11-21.
- NIMMO, D.R.; HAMAKER, T.L. 1982. Mysids in toxicity testing - a review. **Hydrobiologia**, 93:171-178.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.A.; PEDROSO, C.B.; ZAMBONI, A.J. & JOSE, V.F. **Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos marinhos**. São Paulo, CETESB, 1990, Relatório Técnico, 40p.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.A.; PEDROSO, C.B.; ZAMBONI, A.J. & MELO, S.L.R. **Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos - Vol III - Testes com organismos marinhos**. São Paulo, CETESB, 1991. Relatório Técnico, 28p.

- NIPPER, PEDROSO, C.B.; JOSÉ, V.F.; MELO, S.L.R. PRÓSPERI, V.A. & ZAMBONI, A.J. 1992. Toxicity testing with southeastern Brazil marine crustaceans and echinoderms. In: **Proceedings SETAC, 13th Annual Meeting**. Abstracts, p.271.
- NIPPER, M.G. & PRÓSPERI, V.A. **Desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos marinhos**. São Paulo, CETESB, 1992. Relatório Técnico, 23p.
- NIPPER, M.G. & PRÓSPERI, V.A. **Desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos marinhos**. São Paulo, CETESB, 1993. Relatório Técnico, 30p.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.A. & ZAMBONI, A.J. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, 50(5):646-652.
- O'HARA, J. 1973. The influence of temperature and salinity on the toxicity of cadmium to the fiddler crab, *Uca pugilator*. **Fish. Bull.**, 71:149-153.
- OKUBO, K. & OKUBO, T. 1962. Study on the bio-assay method for the evaluation of water pollution - Use of the fertilized eggs of sea urchins and bivalves. **Bull. Tokai. Reg. Fish. Lab.**, 32:131-140.
- OSHIDA, P.S.; GOOCHEY, T.K. & MEARNNS, A.J. Effects of municipal wastewater on fertilization, survival, and development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. In: **Biological monitoring of marine pollutants**. Academic Press., Inc. 1981, p.389-402.

- PICKERING, Q.H. & THATCHER, T.O. 1970. The chronic toxicity of linear alkylate sulfonate (LAS) to *Pimephales promelas* Rafinesk. **J. Wat. Pollut. Control. Fed.**, 40:243-254.
- PONÇANO, W.L. **Sedimentação atual aplicada a portos no Brasil**. 1985. 158p. Tese de doutoramento apresentada ao Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo.
- PRICE, K.S.; WAGGY, G.T. & CONWAY, R.A. 1974. Brine shrimp bioassay and seawater BOD of petrochemicals. **J. Wat. Pollut. Control. Fed.**, 46(1):63-77.
- PRÓSPERI, V.A. & NIPPER, M.G. Avaliação do efeito de agentes tóxicos sobre a fecundação e o desenvolvimento embriolarval de equinodermos. In: **VII Mini-Simpósio de Biologia Marinha**, Resumos, 1989a, p.28.
- PRÓSPERI, V.A. & NIPPER, M.G. 1989b. Desenvolvimento de metodologia para avaliação de efeitos de agentes tóxicos sobre a fertilização de *Lytechinus variegatus* e *Arbacia lixula* (Echinodermata:Echinoidea). **Rev. Soc. Bras. Toxicol.** vol. II, suplemento especial, publ. nº 4.11.
- PRÓSPERI, V.A.; NIPPER, M.G. & BERTOLETTI, E. **Escolha de métodos apropriados para avaliação da toxicidade de efluentes lançados em ambientes estuarinos**. São Paulo, CETESB. 1993. Relatório Técnico, 34p.
- QUERESHI, A.A.; FLOOD, K.W.; THOMPSON, S.R.; JANHURST, S.M.; INNIS, C.S. & ROKOSH, D.A. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth**

Conference. ASTM STP 766. Person, J.G.; Foster, R.B. & Bishop, W.E.(eds). American Society for testing and Materials. 1982, p. 179-195.

QUERESHI, A.A.; COLEMAN, R.N. & PARAN, J.N. Evaluation and refinement of the Microtox test for use in toxicity screening. In: **Toxicity screening procedures using bacterial systems.** LIU, D. & DUTKA, B.J. (eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, 1984, p.1-21.

REISH, D.J. . The use of toxicity testing in marine environmental research. In: **Marine organisms as indicators.** Soule, D.F. & Kleppel, G.S.(eds). Springer-Verlag, NY. 1987, p.231-241.

ROTHSCHILD, L. & TUFT, P.H. 1950. The physiology of sea-urchin spermatozoa - The dilution effect in relation to copper and zinc. **J. Exp. Biol., 27:59-72.**

SALIBA, L.J. & KRZYZ, N. 1976. Acclimation and tolerance of *Artemia salina* and *Ophryotrocha labronica* to copper sulphate. **Mar. Biol., 23:297-302.**

SALOMÃO, L.C. **Estudo de algumas respostas osmóticas de *Perna perna*, Linné, 1758 (Mollusca: Bivalvia).** 1978. 175p. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

SAMOILOFF, M.R. & WELLS, P.G. Future trends in marine ecotoxicology. In: **Ecotoxicological testing for the marine environment.** PERSOONE, G. & JASPERS,C. (eds.) State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Brendene, Belgium. 1984. vol 1, p.733-750.

- SCHAEFFER, D.J.; COX, D.K. & DEEM, R.A. 1987. Variability of teste systems used to assess ecological effects of chemicals. *Wat. Sci. Technol.*, **19**(1):39-45.
- SCHIMMEL, S.C.; MORRISON, G.E.; HEBER, M.A. 1989. Marine complex effluent toxicity program: test sensitivity, repeatability and relevance to receiving water toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**:739-746.
- SILVA, C.E.L. *Ecologia e Sociedade - Uma Introdução às Implicações Sociais da Crise Ambiental*. Loyola (ed). São Paulo, SP. 1978, 278p.
- SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C. & PERSOONE G. 1978. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests - a critical analysis. *Ecot. Environm. Safety*, **2**:249-255.
- SOSNOWSKI, S.L. & GENTILE, J.H. 1978. Toxicological comparison of natural and cultured populations of *Acartia tonsa* to cadmium, copper, and mercury. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **35**:1366-1369.
- SPRAGUE, J.B. The ABC's of pollutant bioassay using fish. In: **Biological Methods for the Assessment of water quality**. Cairns, J.R. & Dickson, K.L.(eds). American Society for Testing and Materials. 1973, p.6-30
- STEARNS, L.W. **Sea urchin development: celular and molecular aspects**. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. 1973, p.11-72.
- STEBBING, A.R.D.; AKESSON, B.; CALABRESE, A.; GENTILE, J.H.; JENSEN, A. & LLOYD, R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.*, **179**:322-332.

- STRAUGHAN, P. 1976. Sublethal effects of natural chronic exposure to petroleum in the marine environment. **API. Publ.**, 4280:73-77.
- TARPLEY, W.A. 1958. Studies on the use of the brine shrimp *Artemia salina* (Leach) as a test organism for bioassay. **J. Econ. Ent.**, 51(6):780-783.
- TOMMASI, L.R. **Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos (SP)**. 1979, vol. I, 247p. Tese de livre docência apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.
- TOMMASI, L.R. Efeitos sobre o ecossistema marinho das regiões sudeste-sul do Brasil. In: **II Simpósio Ecosist. Costa Sul e Sudeste Bras.:Estrutura, Função e Manejo**. Águas de Lindóia, SP, 1990, vol.1, p.53-54.
- UNEP - **Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates**. United Nation Environment Programme. Methods for marine pollution studies nº 43, 1989, 27p.
- USEPA. **Water Quality Criteria 1972**. Environmental Protection Agency. EPA-R3-73-033. 1973, 594p.
- USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**. Environmental Protection Agency. EPA/600/4-85/013. 1985, 3ª. ed., 216p.
- USEPA. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. Environmental Protection Agency EPA/600/4-87/028. 1988, 417p.

- USEPA. **Permits writer's guide to water quality-based toxics control for marine and estuarine discharges.** Draft. Environmental Protection Agency. EPA, Washington, DC. 1990., p.i.
- USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.** Environmental Protection Agency. EPA/600/4-90/027. 1991a, 4^a. ed., 293p.
- USEPA. **Technical Support Document for water quality-based toxics control.** Environmental Protection Agency. EPA/505/2-90-001. 1991b, p.i.
- USEPA. **Short terms methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.** Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/021. 1992, 513p.
- VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C. & SORGELOOS, P. Research on the development of a short term standard toxicity test with *Artemia nauplii*. In: **The brine shrimp *Artemia* - Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology.** G. Persoone, P. Sorgeloos, O.Roels and E. Jaspers (eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 1980, vol. I, p.264-285.
- VANHAECKE, P. & PERSOONE, G. 1981. Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia nauplii* (arc-test). **INSERM**, 106:359-376.
- VERRIOPOULOS, G.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. 1981. Effects of some environmental factor on the toxicity of cadmium to the copepod *Tisbe holothuriae*. **Arch. Hydrobiol.**, 91:287-293.
- VERRIOPOULOS, G.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. & XATZISPIROU, A. 1986. Evaluation of metabolic responses of *Artemia*

- salina* to oil and oil dispersant as a potential indicator of toxicant stress. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, **36**:444-451.
- VITAL, N. A. A. & VEIGA, L. F. 1990. Testes de toxicidade na indústria de petróleo. **Bol. Tec. Petrobrás.**, **33**(3):219-221.
- VOYER, R.A.; CARDIN, J.A.; HELTSCHKE, J.F. & HOFFMAN, G.L. 1982. Viability of embryos of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* exposed to mixtures of cadmium and silver in combination with selected fixed salinities. **Aquatic Toxicol.**, **2**:223-233.
- WAGENER, A.L.R.. Estado atual do conhecimento de algumas características químicas de águas costeiras e estuarinas da região Sudeste-Sul do Brasil. In: **II Simpósio Ecossist. Costa Sul e Sudeste Bras.: Estrutura, Função e Manejo**. Águas de Lindóia, SP, 1990, vol.1, p.53-54.
- WARD, S.H. The requirements for a balanced medium in toxicological experiments using *Mysidopsis bahia* with special reference to calcium carbonate. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Conference**. Cwggill, U.M. & Willias, L.R. (eds). American Society for Testing and Materials. ASTM STM1027. 1989, p.402-412.
- WELLS, P.G. Marine ecotoxicological tests with zooplankton. In: **Ecotoxicological testing for the marine environment**. Persoone, G.; Jaspers, E. & Claus, C. (eds). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Belgium. 1984, vol 1. p.215-256
- ZAGATTO, P.A.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E. BERTOLETTI, E.; LOMBARDI, C.C.; & MARTINS, M.H.R.B.. Ensaio biológicos com organismos aquáticos : toxicidade das águas e sedimentos dos rios da

região de Cubatão. In: **13º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 1985, p.1-11.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.; ARAUJO, R.P.A.; RAMOS, L.L.C.R.; LOMBARDI, C.C.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E. & MARTINS, M.H.R.B.. **Avaliação da toxicidade das águas, sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão**. São Paulo, CETESB. 1986. Relatório Técnico, 226p.

ZAMBONI, A.J. **Avaliação da qualidade de água e sedimentos do canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata:Echinoidea)**. 1993. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, no prelo.

ZILLIOUX, E.J. FOULK, H.R.; PRAGER, J.C & CARDIN, J.A. 1973. Using *Artemia* to assay oil dispersant toxicities. **J. Wat. Pollut. Control. Fed.**, 45(11):2389-2396.

Tabela 1: Matéria prima e produtos elaborados pela COSIPA e ULTRAFÉRTIL.

EMPRESA	UNIDADES	MATÉRIA PRIMA	PRODUTO ELABORADO
ULTRAFÉRTIL	Ácido sulfúrico	Enxofre	Ácido sulfúrico
	Amônia	Nafta e gas refinado	Amônia
	Ácido nítrico	Amônia	Ácido nítrico
	Nitrato de amônia	Ácido nítrico e amônia	Nitrato de amônia
	Ácido fosfórico	Rocha fosfática e Ácido sulfúrico	Ácido fosfórico
	Fosfato diamônio	Ácido fosfórico Amônia	Fosfato diamônio e fertilizantes líquidos
COSIPA	Altos fornos I e II	Minério de ferro bitolado, pelotizado, sinter e coque	Ferro gusa
	Calcinações I, II e III	Calcáreo e dolomita	Cal e dolomita calcinada
	Coqueria	Carvão	Coque
	Laminação	Placas e lingote de aço	Bobinas e chapas de aço
	Aciaria	Ferro gusa/liga, sucatas, fluorita, cal e calcáreo	Aço líquido

Tabela 2: Dados sobre as campanhas de amostragem.

IND.	DATA DAS CAMPANHAS DE COLETA	HORÁRIO DA COLETA	TÁBUA DE MARÉ P/ SANTOS	UNIDADES EM OPERAÇÃO
C	04/07/91	09:00 às 14:00h	1.0-06:53h 0.4-13:56h	COQUERIA, LAMINAÇÃO, ALTO FORNO II, OFICINA MECÂNICA DE MANUTENÇÃO
O	01/08/91	07:30 às 12:30h	1.1-05:26h 0.3-12:36h	COQUERIA, LAMINAÇÃO ALTOS FORNOS I E II, CALCINAÇÕES I, II E III
I	03/09/91	13:30 às 18:30h	1.2-12:49h 0.5-18:34h	COQUERIA, ACIARIA II, CALCINAÇÃO III
A	19/02/92	06:00 às 11:00h	1.3-03:45h 0.0-10:19h	COQUERIA, LAMINAÇÃO. ALTOS FORNOS I E II, ACIARIA II, CALCINAÇÕES I E II
	14/09/92	07:00 às 12:00h	1.3-03:45h 0.0-10:19h	COQUERIA, LAMINAÇÃO. ALTOS FORNOS I E II, CALCINAÇÕES I, II, III
U	31/03/92	10:00 às 15:00h	-	AMÔNIA, ÁCIDO NÍTRICO, ÁCIDO SULFÚRICO, NITRATO DE AMÔNIO
L	25/05/92	09:00 às 14:00h	-	FOSFATO DIAMÔNIO, AMÔNIA
T	28/09/92	10:00 às 15:00h	-	AMÔNIA, ÁCIDO NÍTRICO, ÁCIDO FOSFÓRICO, NITRATO DE AMÔNIO, ÁCIDO SULFÚRICO

Tabela 3: Resultados dos testes de toxicidade com o efluente da COSIPA (%) salinizado para 34×10^{-3} , com alguns ensaios a 15 ou 21×10^{-3} . Intervalo de confiança entre parênteses.

ESPÉCIES	CAMPANHAS				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
<i>M. juniae</i> (CL50; 96h)	8,6 (7,5-9,3)	18% mortalidade em 40% do efluente	60,6 (51,3-71,6)	NE	65,7 (54,3-79,4) 56,4 ^b (49,3-64,5)
<i>Artemia</i> sp (CL50;48h)	NC NC ^a	NC NC ^a	NC NC ^a	NT 10,9 ^a	NT NT ^b
<i>T. stylifera</i> (CL50;48h)	NC	24% mortalidade em 40% efluente	NE	32,0 (54,9-75,8)	NE
<i>A. lilljeborgi</i> (CL50;48h)	NE	NE	64,5	NE	NE
<i>L. variegatus</i> -embriões (CENO;24h)	1,0	5,0	<1,0	NC	6,0
<i>L. variegatus</i> -gametas (CENO;80m)	NC	10,0	NC	NC	NE

NE: teste não efetuado

NT: não apresentou toxicidade

NC: não calculável

a : $S \times 10^3 = 15$

b : $S \times 10^3 = 21$

Tabela 4: Porcentagem de organismos mortos nos controles dos testes de toxicidade com *Artemia* sp, às salinidades 15 e 34x10⁻³.

CAMPANHA	CONTROLE	% ORG MORTOS	
		15	34
1	1	48,2	48,2
	2	48,3	24,7
2	1	1,6	37,2
	2	8,3	19,2
3	1	3,4	17,2
	2	24,1	9,8
4	1	13,5	11,6
	2	12,1	10,0
5	1	NE	0,0
	2	NE	3,3

1 - controle com água do mar acrescida de água destilada (Sx10³=15) ou água do mar (Sx10³=34)

2 - controle com salmoura acrescida de água destilada

NE - não efetuado

Tabela 5: Porcentagem média de fecundação nos controles de testes com *Lytechinus variegatus*.

CAMPANHA	CONTROLE	% FEC.	TOTAL ESPERM. POR ÓVULO
1	1	5	39x10 ³
	2	23,8	
2	1	90,7	54x10 ³
	2	88,8	
3	1	35,3	23x10 ³
	2	12,3	
4	1	44,2	21x10 ³
	2	9,7	

1 - controle com água do mar ($S \times 10^3 = 34$)

2 - controle com água destilada acrescida de salmoura ($S \times 10^3 = 34$)



Tabela 6: Resultados dos testes de toxicidade com o efluente da ULTRAFÉRTIL (%) às salinidades 21 e 34x10⁻³.

Intervalo de confiança entre parênteses.

ESPÉCIES	S x 10 ³	CAMPANHAS		
		1	2	3
<i>M. juniae</i> (CL50;96h)	34	1,87 (NC)	22,4 (NC)	8,38 (NC)
	21	1,69 (NC)	16,8 (14,1 - 19,9)	7,1 (6,3 - 7,9)
<i>Artemia</i> sp (CL50;48h)	34	NC	NT	NT
	21	38,8 (35,4 - 42,1)	NT	20% de mortalidade em 79% do efluente
<i>L. variegatus</i> (CENO;24h)	34	0,1	0,58	0,5

NT = não apresentou toxicidade

NC = não calculável

Tabela 7: Resultados de testes de toxicidade, expressos em CL ou CE50, com substâncias de referência realizados em paralelo aos testes com efluentes. X = média, S = desvio padrão, CV = coeficiente de variação.

INDÚSTRIA	CAM- PA- NHA	ZnSO ₄ · 7H ₂ O (em mg Zn/l)				DSS (em mg DSS/l)	
		<i>M. juniae</i> 21x10 ⁻³	<i>M. juniae</i> 34x10 ⁻³	<i>T. stylifera</i> 34x10 ⁻³	<i>L. variegatus</i> 34x10 ⁻³	<i>Artemia</i> sp 21x10 ⁻³	<i>Artemia</i> sp 34x10 ⁻³
COSIPA	1	-	0,32	0,022 ^a	0,034	-	-
	2	-	0,38	0,0017	0,055 0,047 ^b	-	-
	3	-	0,29	-	0,029	-	25,9 ^a
	4	-	-	0,35	-	-	25,1 ^a
	5	0,35	0,39	-	0,055	34,4	22,9
ULTRAFÉRTIL	1	0,29	0,32	-	0,046	39,6 ^a	24,0 ^a
	2	0,41	0,26	-	0,072	52,5 ^a	17,5 ^a
	3	0,34	0,41	-	0,066	26,2	16,9
X		0,3475	0,3388	0,1246	0,0510	38,1750	22,0500
S		0,0492	0,0558	0,1955	0,0158	11,0286	3,8955
CV (%)		14,2	16,5	156,9	31,0	28,9	17,7

a - Correção de Abbott

b - Teste de fecundação; não incluído no cálculo de CV

Tabela 8: Análise do efeito do uso da salmoura sobre os organismos-teste nas diferentes salinidades. S = Porcentagem média dos organismos não afetados nos controles com água destilada + salmoura; M = porcentagem média de organismos afetados nos controles com água do mar filtrada, pura ou acrescida de água destilada.

MODO DE PREPARO DA SALMOURA	CAMPANHA	SALINIDADE DA SALMOURA	M.j.		L.v.		Art.		Art.		Art.		A.l.		T.s.			
			21		34		34		15		21		34		34			
			M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Congelamento	1 ^c	68	-	-	3	0	19	19	48	48 ^a	-	-	25	48 ^a	-	-	18	69 ^a
	5 ^c	98	0	0	0	0	9	6	-	-	3	0	3	0	-	-	-	-
	1 ^b	78	6	5	6	5	19	8	-	-	8	15	26	12 ^a	-	-	-	-
	2 ^b	115	0	0	0	0	9	8	-	-	0	12	1,6	12	-	-	-	-
	3 ^b	102	0	0	0	0	17	3	-	-	3	5	10	3	-	-	-	-
Evaporação	2 ^c	92	-	-	0	3	0	8	8	2	-	-	19	37 ^a	-	-	10	3
	3 ^c	104	-	-	0	0	20	13	24	13 ^a	-	-	10	17	15	15	-	-
	4 ^c	102	-	-	-	-	100	30 ^a	12	13 ^a	-	-	10	14	-	-	13	15

^a - Porcentagem de efeito superior ao aceitável para controle do teste

^b - Campanhas da ULTRAFÉRTIL

^c - Campanhas da COSIPA

M.j. = *Mysidopsis juniae*; L.v. = *Lytechinus variegatus*; Art. = *Artemia* sp; A.l. = *Acartia lilljeborgi*; T.s. = *Temora stylifera*

Tabela 9: Toxicidade do DSS a náuplios de *Artemia* sp e do zinco a *Mysidopsis juniae*, em diferentes salinidades. Intervalo de confiança entre parênteses. X = média das CL50; S = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

CAMPANHA	CL50;48h para <i>Artemia</i> sp (em mg DSS/l)			CL50;96h para <i>M. juniae</i> (em mg Zn/l)	
	15x10 ⁻³	21x10 ⁻³	34x10 ⁻³	21x10 ⁻³	34x10 ⁻³
4 ^c	10,9 (9,1 - 13,2) ^a	NE	25,1 (23,8 - 26,5) ^a	NE	NE
5 ^c	NE	34,4 (31,3 - 37,8)	22,9 (20,9 - 25,1)	0,34 (0,30 - 0,38)	0,41 (0,39 - 0,42)
1 ^b	NE	39,6 (36,8 - 42,5) ^a	24,0 (NC)	0,29 (0,26 - 0,33)	0,32 (0,29 - 0,35)
2 ^b	NE	52,5 (NC)	17,5 (16,0 - 19,2) ^a	0,41 (0,37 - 0,45)	0,26 (0,22 - 0,30)
3 ^b	NE	26,2 (23,4 - 29,3)	17,0 (15,1 - 19,1)	0,35 (0,32 - 0,39)	0,39 (0,34 - 0,45)
X		38,1750	22,0500	0,3475	0,3450
S		11,0286	3,8955	0,0492	0,0686
CV (%)		28,9	17,7	14,2	19,8

^a - Correção de Abbott

^b - Campanhas da ULTRAFÉRTIL

^c - Campanhas da COSIPA

NC = Não calculável

NE = Não efetuado

Tabela 10: Análises químicas do efluente da COSIPA, nas cinco campanhas efetuadas.

SUBSTÂNCIA (mg/l)	CAMPANHAS					Resol. CONAMA 1986/Art. 21
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	
B	0,16	ND	0,26	0,17	0,1	5,0
Cl ⁻	288,0	69,0	334,0	358,0	91,0	-
Cr ⁶⁺	0,05	< 0,003	<0,003	0,003	NE	0,5
CN	28,0	0,20	0,10	0,084	0,21	0,2
Cu sol.	0,03	0,02	0,05	0,02	> 0,01	-
Cu total	NE	NE	NE	0,02	0,19	1,0
DBO	66,0	12,0	20,0	19,0	17,0	-
DQO	125,0	123,0	42,0	113,0	88,0	-
Fenóis	3,99	1,598	0,201	1,621	0,213	0,5
Fe sol.	NE	ND	NE	<0,12	0,12	-
Fe total	12,68	21,02	5,64	31,2	6,5	-
Fl ⁻	3,38	1,19	5,40	2,34	5,60	10,0
Mn sol.	0,57	0,28	0,01	0,26	0,21	1,0
Mn total	NE	NE	NE	0,65	1,9	-
N Amoniacal	16,84	7,18	8,90	11,34	3,75	-
Nitrato	6,75	4,98	7,98	NE	NE	-
Ni sol.	< 0,01	ND	0,02	0,02	0,03	-
Ni total	NE	NE	NE	0,02	0,08	2,0
Óleos e graxas	3,0	4,0	7,0	4,0	28,0	20,0
Res. sedimentável	2,5	< 0,1	0,2	0,9	0,8	-
Sn sol.	ND	ND	ND	<4,00	<0,04	-
Sn total	NE	NE	NE	<4,00	<0,04	4,0
Zn sol.	0,20	ND	13,4	0,26	0,02	-
Zn total	NE	NE	NE	0,26	0,25	5,0

NE - análise não efetuada; ND - não detectado; - não existe definição na legislação.

Tabela 11: Análises químicas do efluente da ULTRAFÉRTIL, nas três campanhas efetuadas.

SUBSTÂNCIA	CAMPANHAS			Limites Resol. CONAMA 1986/Art.21
	1ª	2ª	3ª	
Fluoreto	4,68	8,46	8,72	10,0
Ortofosfato	13,50	333,76	39,0	-
Fosfato	155,0	NE	142,0	-
N amoniacal	700,0	118,50	179,0	-
N nitrato	< 0,02	2,73	3,13	-
N nitrito	< 0,005	6,40	0,062	-
Óleos e graxas	153,0	4,0	25,0	20,0
Sílica	9,40	NE	28,5	-
Res. sedimentável	NE	< 0,1	0,1	-

NE: Análise não efetuada

-: Não existe definição na legislação

Tabela 12: Toxicidade aguda de diversas substâncias para organismos marinhos e dulcícolas. CE e CL50 em mg/l.

ESPÉCIE	Cl ⁻	Cr ⁶⁺	Fenóis	NH ₃	CN	Cu	B	Mn	Zn	Ni	Sn	Fe	NO ₂	N- Amon	FI ⁻	AUTOR
<i>Daphnia magna</i> (CE50:48h) ^{a1,d}	-	-	32.0	0.8	6.1	0.02	133.0	9.8	5.1	-	55.0	9.6	-	129.0	128.0	BERTOLETTI (1990b) QUERESHI et al. (1982)
<i>Daphnia similis</i> (CE50:24h) ^{a1,d}	-	0.037	62.0	95.1	0.98	0.009	-	-	0.5	2.6	-	-	-	-	-	BERTOLETTI (1990b)
<i>Daphnia pulex</i> (CE50:48h) ^{a1,d}	1470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BERTOLETTI (1990b)
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (CE50:15min.) ^{b,m}	-	26.9	26.3	-	-	0.28	-	-	6.08	251.0	-	-	-	3607	-	QUERESHI et al. (1982) QUERESHI et al. (1984)
<i>Artemia</i> sp (CL50:48h) ^{c2,m}	-	-	-	334.7	-	-	-	-	-	-	-	-	1141	5.65	-	CHEN et al. (1989)
<i>Acartia tonsa</i> (CL50:48h) ^{c3,m}	-	-	-	-	-	0.104 0.311 0.031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SOSNOWSKI & GENTILE (1978)
<i>Acartia lilljeborgi</i> (CL50:48h) ^{c3,m}	-	-	-	-	-	0.24	-	-	0.54	-	-	-	-	-	-	NIPPER et al.(1990)
<i>Acartia simplex</i> (CL50:48h) ^{c3,m}	-	-	-	-	-	0.20	-	-	1.86	-	-	-	-	-	-	ARNOTT & AHSANULLAH (1979)
<i>Temora stylifera</i> (CL50:48h) ^{c3,m}	-	-	-	-	-	0.02	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	NIPPER et al.(1990)
<i>Mysidopsis bahia</i> (CL50:96h) ^{c4,m}	-	2.5	12.5	-	0.113	0.181	-	-	0.499	-	-	-	-	-	-	BUIKEMA et al. (1981) JOP (1989)
<i>Mysidopsis juniae</i> (CL50:96h) ^{c4,m}	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-	-	-	-	-	NIPPER et al.(1990)
<i>Holmesymysis costata</i> (CL50:96h) ^{c4,m}	-	-	-	-	-	0.017	-	-	0.097	-	-	-	-	-	-	MARTIN et al. (1989)

a = crustáceo (1-cladóceros, 2-branquiópodo, 3-copépodo, 4-misidáceo)

b = bactéria

d = dulcícola

m = marinho

Tabela 13: Toxicidade crônica de diversas substâncias para organismos marinhos. CE e CL50 em mg/l.

ESPÉCIE	Fenóis	NH ₃	CN	Cu	Zn	Fe	Mn	AUTOR
<i>Mysidopsis bahia</i> (CL50;21d) ^a	-	-	0,070	0,104	0,166	-	-	BUIKEMA <i>et al.</i> (1981) LUSSIER <i>et al.</i> (1985) JOP (1989)
<i>Holmesimysis costata</i> (CL50;7d) ^a	-	-	-	<0,001	0,018	-	-	MARTIN <i>et al.</i> (1989)
<i>Lytechinus variegatus</i> (CE50;24h) ^b	-	0,15 0,09	- -	-	0,046	-	-	NIPPER <i>et al.</i> (1990) ZAMBONI (1993)
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (CE50;96h) ^b	-	-	-	0,006	0,023	-	-	DINNEL <i>et al.</i> (1989)
<i>Strongylocentrotus doebrachiensis</i> (CE50;96h) ^b	-	-	-	0,021	>0,027 <0,051	-	-	DINNEL <i>et al.</i> (1989)
<i>Anthocidares crassispina</i> (CE50;24h) ^b	3,2	-	-	0,32	0,1	3,2	10,0	OKUBO & OKUBO (1962)

^a Crustáceo misidáceo

^b Equinodermo



Figura 2 - Exemplar adulto de *Mysidopsis juniae* (25x).



Figura 3 - Detalhe do telson (t) da espécie *Mysidopsis juniae* (100x).



Figura 4 - Exemplar com 48 horas de idade de *Artemia* sp (100x).

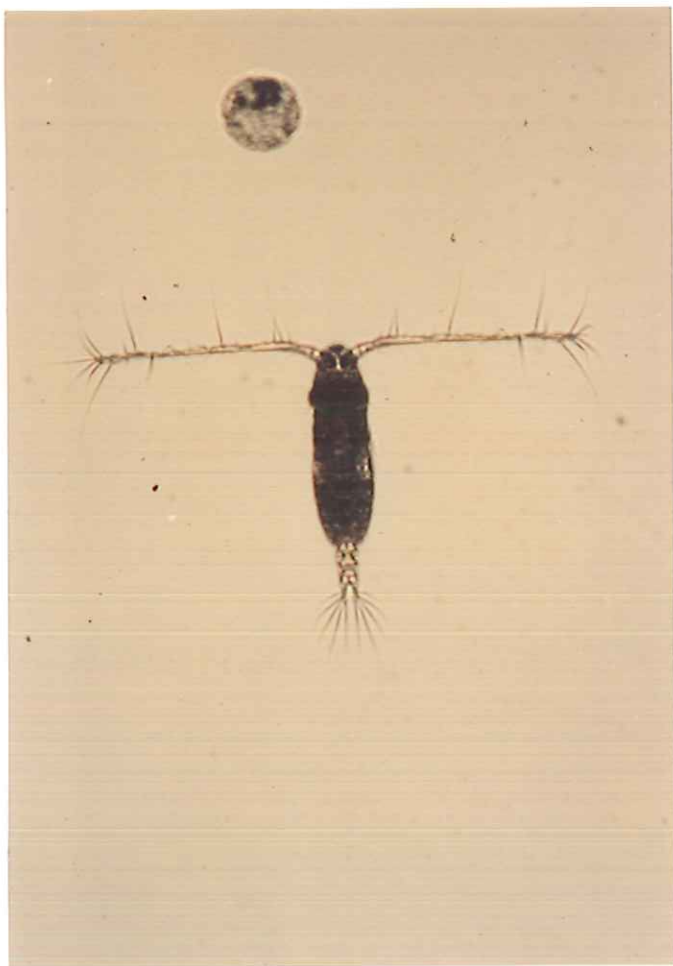


Figura 5 - Exemplar adulto de *Acartia lilljeborgi* (25x).



Figura 6 - Exemplar adulto de *Temora stylifera* (100x).

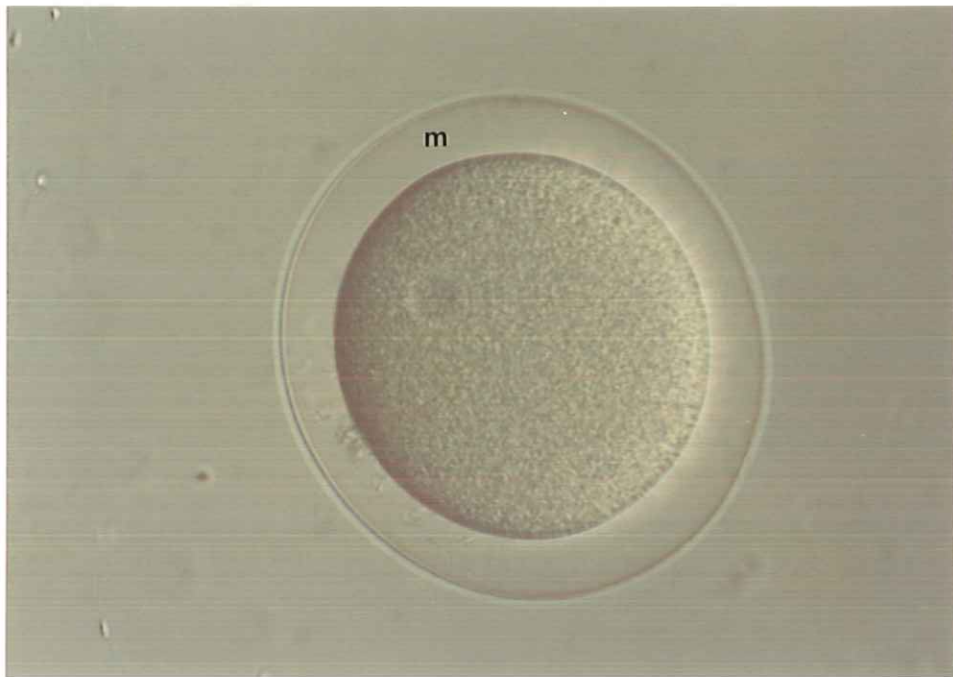


Figura 7 - Ovo de *Lytechinus variegatus* com membrana de fertilização (m) evidente (400x).



Figura 8 - Larva pluteus de *Lytechinus variegatus* (400x).

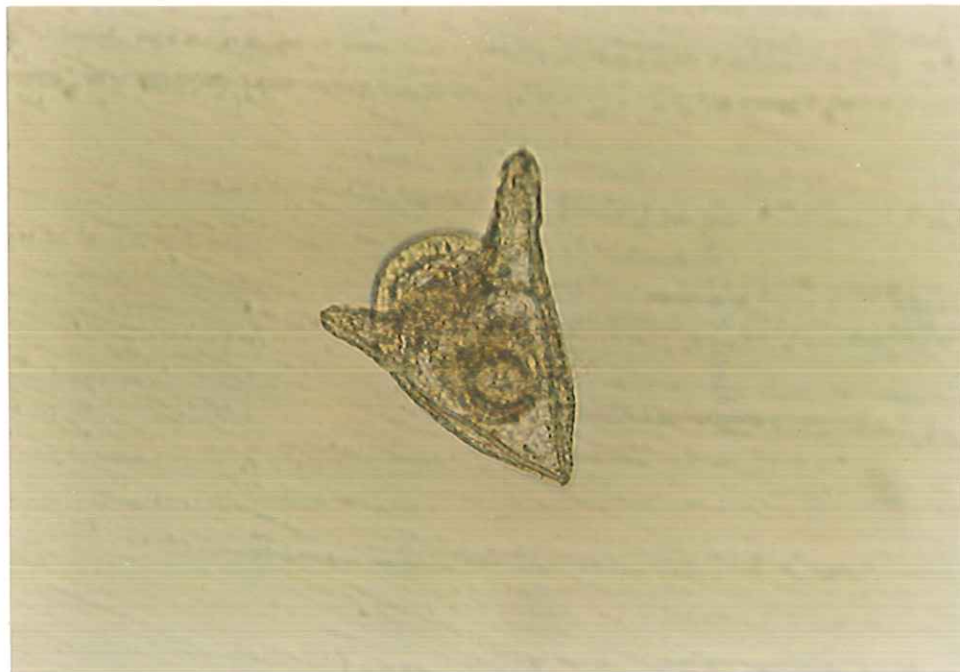


Figura 9 - Exemplo de anomalia em larva pluteus de *Lytechinus variegatus* (100x).
Observar extermidade da larva.

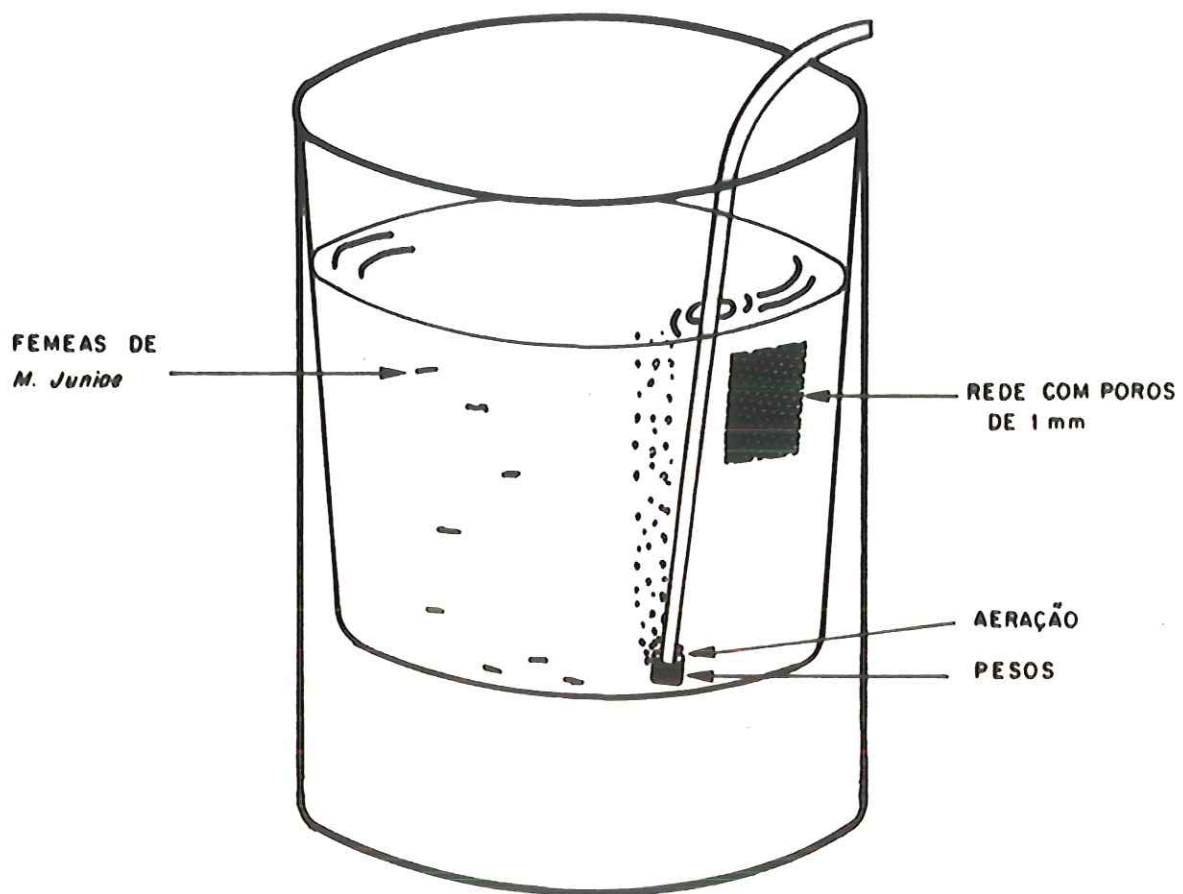


Figura 10 - Cuba com rede de filó para separação de fêmeas grávidas e filhotes.

Anexo I - Resultados de testes de toxicidade com o efluente da COSIPA (%), com organismos de água doce e bactéria marinha.

ESPÉCIES	CAMPANHAS				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
<i>Daphnia similis</i> (CE50;48h)	88,3	NT	NT	34,0	21% de mortalidade em 90% de efluente
<i>Cheirodon notomelas</i> (CL50;96h)	NE	NE	NT	32,7	NT
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (CENO;7d)	1,0	30,0	30,0	NC	30,0
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (CE50;15min)	29,5	56,0	NT	NT	NT

Dados retirados de PRÓSPERI *et al.* (1993)

NE: Teste não efetuado

NC: Não calculável

NT: Não apresentou toxicidade

Anexo II - Resultados de testes de toxicidade com o efluente da ULTRAFÉRTIL (%), com organismos de água doce e bactéria marinha.

ESPÉCIES	CAMPANHAS		
	1ª	2ª	3ª
<i>Daphnia similis</i> (CE50;48h)	2,2	55,1	28,2
<i>Cheirodon notomelas</i> (CL50;96h)	1,8	31,6	36,9
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (CENO;7d)	NC	3,0	entre 0,1 e 1,0
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (CE50;15min)	62,0	NT	NT

Dados retirados de PRÓSPERI *et al.* (1993)

NC: Não calculável

NT: Não apresentou toxicidade