Mariana Stefanon Cariello

Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar
Lytechinus variegatus e nos microcrustáceos estuarinos *Nitokra* sp e
Leptocheirus plumulosus

Dissertação apresentada ao Instituto
Oceanográfico da Universidade de
São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Programa de
Oceanografia, área de Oceanografia
Biológica.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Eduinetty

Ceci Pereira Moreira de Sousa

São Paulo / SP

2012

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar
Lytechinus variegatus e nos microcrustáceos estuarinos *Nitokra* sp e
Leptocheirus plumulosus

Mariana Stefanon Cariello

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de Oceanografia Biológica

Julgada em _____ / _____ / _____

Prof(a). Dr(a). Eduinetty Ceci P. M. de Sousa

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Dedico este trabalho a quem me
ensina a enxergar a vida com os
olhos do coração, minha doce mãe
Maria Angela.

"Eu é que sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o SENHOR; pensamentos de paz e não de mal, para vos dar o fim que desejais".

Jeremias 29:11

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo.

À Profa. Dra. Ceci, pela confiança, incentivo, bons conselhos e orientação.

À Márcia e Lelê pela revisão dos infindáveis relatórios, ensinamento transmitido, disponibilidade e amizade.

À equipe Lecotox (Claudinha, Luís, Renato, Cristiano, Léo, Milena, Mariana, Jéssica, Priscila, Aline), com que muito aprendi e diariamente dividi bons momentos regados a cafés, biscoitos e patês. Em especial à Claudinha, que além de muito me ajudar com os ensaios com a microalga, se tornou uma amiga inestimável.

À Professora Bia, que muito nos alegrou em diversas manhãs com sua simpatia e carisma e por mostrar como a simplicidade é mágica e que exercitando-a nos tornamos ainda mais felizes.

Ao Prof. Phan, Prof. Vicente, Thaís e Fabio pelo apoio e generosidade ao me auxiliarem com as análises espectrofotométricas. Em especial ao Prof. Vicente, que me acolheu muitíssimo bem como sua monitora e fez-me “encantar” com seu vasto conhecimento.

À Professora Vivian Pelizzari e sua equipe, por atender nossas solicitações com tão boa disposição no esclarecimento de dúvidas, empréstimo da incubadora e autoclave nos ensaios com as microalgas.

À Professora Luz Amélia, pelo carinho e bons ensinamentos.

Aos amigos e colegas do Instituto Oceanográfico que eu tanto admiro pelo empenho e dedicação à pesquisa e também por dividirmos momentos animados e divertidos.

A comissão de estudo especial de análises ecotoxicológicas - ABNT, em especial à querida Má (Márcia Gasparro), coordenadora da ABNT/CEE 106, pelo convite para participar das reuniões, as quais me geraram grandes indagações e me propiciaram perdurável conhecimento.

As baianas, Catarina Marcolin e Andrea Oliva. Esses anos na capital tiveram muito mais cor com vocês por perto. Vocês moram em meu “córção”, neguinhas. Tchuska, sou muito grata pelos gráficos, você manda muito bem no “R” e em tudo que faz. Sou sua fã incondicional!

Ao Flávio Ubatuba pelas incansáveis coletas de ouriço, caronas em dias de chuva e toda atenção que me foi dedicada. Obrigada!

Aos amigos de longa data (Paul, Tetê, Ponise, Maiana e Gaboni). Aqueles com quem muito sorri, chorei e aprendi. Sempre seremos: “Um por todos e todos por um!”.

À família Boni, em especial ao doce Gabriel, que foram os verdadeiros incentivadores do meu ingresso à vida acadêmica e estiveram presentes em quase todas fases de minha vida. Vocês moram em meu coração.

À eloqüente italianada Stefanon, Cariello, sempre festiva, cheia de afeto, reunidos em mesas fartas e com muitos sorrisos. Tenho muita sorte. Amo vocês!

À minha linda irmã Beatriz e meu querido cunhado Mile, que me deram as duas coisinhas mais preciosas da minha vida, Bruna e Victor.

Ao meu amigo Eduardo Masami (*in memoriam*), que sempre será exemplo de dedicação e generosidade. Essa caminhada esta sendo árdua sem seus ensinamentos, correções, bom humor e companhia. Também sou muito grata pelas fotos que juntos tiramos para este trabalho e as centenas de outras ajudas ao longo de nossa amizade. Cumpriste a boa missão, meu amigo!

À minha mãe Maria Angela que todos estes anos tem sido mãe, pai, amiga, suporte, sinônimo de doçura, humildade e garra. Meu espelho e maior coração que eu já vi para com tudo e todos e, sobretudo pelo exemplo de fibra de uma guerreira que não esmorece.

A agência financiadora CNPQ, pelo investimento e auxílio ao longo deste prazeroso trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O naftaleno é um dos principais constituintes do petróleo solúvel em água e esta classe de poluentes está enquadrada na lista prioritária de contaminantes orgânicos persistentes. O presente trabalho traz informações sobre o efeito do naftaleno em ensaios ecotoxicológicos com quatro diferentes grupos de organismos aquáticos. Ensaios crônicos com a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, ensaios crônicos e agudos com o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp e ensaios agudos com o anfípodo estuarino *Leptocheirus plumulosus*. Na avaliação do efeito crônico, o valor médio da $CI(I)_{50-96h}$ encontrada para microalga marinha foi de 29,01 $mg.L^{-1}$ e o valor médio da $CE(I)_{50-24h}$ para ouriço-do-mar foi de 0,30 $mg.L^{-1}$. Para o copépodo, os ensaios crônicos tiveram os valores de 0,19 $mg.L^{-1}$ para $CENO(I)$ e 0,40 $mg.L^{-1}$ para $CEO(I)$. Nos ensaios agudos, este mesmo organismo apresentou uma média de $CL(I)_{50-96h}$ em 13,4 $mg.L^{-1}$ e a média da $CL(I)_{50-96h}$ para o anfípodo estuarino foi de 2,38 $mg.L^{-1}$. Estes resultados evidenciam potenciais de efeito para diferentes classes de organismos aquáticos e poderão auxiliar nas avaliações ambientais, quando houver limites disponíveis e diretrizes que estabeleçam condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos de água no Brasil.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Naftaleno, *Dunaliella tertiolecta*, *Lytechinus variegatus*, *Nitokra* sp, *Leptocheirus plumulosus*

ABSTRACT

Naphthalene is a major constituent of the oil soluble in water and this class of pollutants is framed in the priority list of persistent organic pollutants. The present study provides information on the effect of naphthalene in ecotoxicological tests with four different groups of aquatic organisms. Chronic tests with the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and sea-urchin *Lytechinus variegatus*, acute and chronic tests with the estuarine benthic copepod *Nitokra* sp and acute tests with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. In the assessment of chronic effect, the average value of $IC(I)_{50-96h}$ to marine microalgae was 29.01 mg.L^{-1} and the mean $EC(I)_{50-24h}$ for sea urchin 0.30 mg.L^{-1} . In chronic tests for estuarine copepod the obtained values to NOEC and OEC was ranged from 0.19 mg L^{-1} to 0.40 mg L^{-1} . In acute tests the same organism have showed an average of $LC(I)_{50-96h}$ in 13.4 mg.L^{-1} and for the estuarine amphipod the mean $LC(I)_{50-96h}$ was 2.38 mg.L^{-1} . These results demonstrate the potential effect on different classes of aquatic organisms. This may assist in environmental assessments in Brazil, when limits and guidelines are available and allow establishing conditions and standards of effluent discharge into water bodies in Brazil.

Keywords: Ecotoxicology, Naphthalene, *Dunaliella tertiolecta*, *Lytechinus variegatus*, *Nitokra* sp, *Leptocheirus plumulosus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> em microscopia de contraste de fase	24
Figura 2. Cultivo de microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> no Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP	25
Figura 3. Indivíduo adulto de <i>Lytechinus variegatus</i>	26
Figura 4. Indivíduo adulto do copépodo <i>Nitokra</i> sp em microscopia de contraste de fase	26
Figura 5. Fases so ciclo de vida do copépodo bentônico <i>Nitokra</i> sp em microscopia de contraste de fase	27
Figura 6. Cultivo de <i>Nitokra</i> sp no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos IOUSP	28
Figura 7. Exemplar adulto de <i>Leptocheirus plumulosus</i> em microscopia de contraste de fase	29
Figura 8. Cultivo de <i>Leptocheirus plumulosus</i> no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos – IOUSP	30
Figura 9. Estrutura molecular do HPA naftaleno	31
Figura 10. Células de <i>Dunaliella tertiolecta</i> observadas em uma fração da câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal	34
Figura 11. Ovos de <i>Lytechinus variegatus</i>	37
Figura 12. Larva <i>pluteus</i> em desenvolvimento normal	38

Figura 13. Curva de crescimento de <i>Dunaliella tertiolecta</i> obtida em 10 dias de cultivo	51
Figura 14. Taxa média de crescimento de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 horas de exposição ao naftaleno obtida por densidade celular	53
Figura 15. Carta-controle para <i>Dunaliella tertiolecta</i> exposta ao DSS durante 96 horas	56
Figura 16. Valores da CENO(I) e CEO(I) para ensaios crônicos com <i>L. variegatus</i>	59
Figura 17. Carta-controle para <i>Lytechinus variegatus</i> exposto ao DSS durante 24 horas	60
Figura 18. Taxa média de eclosão de ovos de <i>Nitokra</i> sp expostos a diferentes concentrações de naftaleno durante 96 horas	62
Figura 19. Carta-controle para <i>Nitokra</i> sp exposto ao DSS durante 96 horas, junto aos ensaios agudos e crônicos	64
Figura 20. Letalidade de <i>Nitokra</i> sp ao naftaleno em 96 horas de exposição	66
Figura 21. Letalidade de <i>Leptocheirus plumulosus</i> ao naftaleno em 96 horas de exposição	69
Figura 22. Carta-controle para <i>Leptocheirus plumulosus</i> exposto ao DSS durante 96 horas	70
Figura 23. Intervalo de valores dos ensaios crônicos e agudos entre os diferentes níveis tróficos	71

Figura 24. Curva de calibração para o naftaleno analisado por espectrofotometria de ultravioleta	74
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do naftaleno	16
Tabela 2. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos com <i>Dunaliella tertiolecta</i>	33
Tabela 3. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos com <i>Lytechinus variegatus</i>	39
Tabela 4. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos crônicos com <i>Nitokra</i> sp	40
Tabela 5. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos agudos com <i>Nitokra</i> sp	42
Tabela 6. Resumo das condições para realização dos ensaios de toxicidade com <i>Leptocherius plumulosus</i>	43
Tabela 7. Crescimento celular de <i>Dunaliella tertiolecta</i> obtida durante os dez dias de cultivo determinada pela densidade celular	50
Tabela 8. Crescimento médio de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h horas de exposição ao naftaleno	52
Tabela 9. Taxa média de inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao naftaleno	53
Tabela 10. Concentração de inibição CI(I)50 de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao naftaleno	54
Tabela 11. Resultado do efeito algicida e algistático do naftaleno em células de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	55

Tabela 12. Sensibilidade $CL(I)_{50-96h}$ de <i>Dunaliella tertiolecta</i> ao DSS	56
Tabela 13. Desenvolvimento embriolarval dos ensaios crônicos com <i>Lytechinus variegatus</i> ao naftaleno	57
Tabela 14. Ensaio crônico com <i>Lytechinus variegatus</i> (CENO (I), CEO (I), $CE(I)_{50-24h}$)	58
Tabela 15. Sensibilidade $CE(I)_{50-24h}$ de <i>Lytechinus variegatus</i> ao DSS	60
Tabela 16. Média de fêmeas adultas, náuplios e eclosão dos ovos obtida após 96h de exposição ao naftaleno	61
Tabela 17. Resultado do ensaio ecotoxicológico de efeito crônico com <i>Nitokra</i> sp exposto ao naftaleno (CENO (I), CEO (I))	63
Tabela 18. Sensibilidade $CL(I)_{50-96h}$ de <i>Nitokra</i> sp ao DSS	63
Tabela 19. Número de organismos mortos nos ensaios agudos com <i>Nitokra</i> sp expostos ao naftaleno	65
Tabela 20. Efeito agudo $CL(I)_{50-96h}$ para o copépodo <i>Nitokra</i> sp exposto ao naftaleno	66
Tabela 21. Sensibilidade $CL(I)_{50-96h}$ de <i>Nitokra</i> sp ao DSS	67
Tabela 22. Número de organismos mortos nos ensaios agudos com <i>Leptocheirus plumulosus</i> expostos ao naftaleno	68
Tabela 23. Resultado dos ensaios ecotoxicológicos de efeito agudo $CL(I)_{50-96h}$ de <i>Leptocheirus plumulosus</i> exposto ao naftaleno	69
Tabela 24. Sensibilidade $CL(I)_{50-96h}$ de <i>Leptocheirus plumulosus</i> ao DSS	70
Tabela 25. Absorbância do naftaleno em nm após 24h, 48h, 72h e 96h	72

Tabela 26. Porcentagem de perda do naftaleno em diferentes períodos de exposição	73
---	----

Tabela 27. Respostas de organismos-teste a metabolização de HPAs de baixo peso molecular	91
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Condições físicas e químicas dos ensaios crônicos com a microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	126
Anexo 2. Condições físicas e químicas dos ensaios crônicos com o ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	126
Anexo 3. Condições físicas e químicas dos ensaios crônicos com o copépodo bentônico <i>Nitokra</i> sp	126
Anexo 4. Condições físicas e químicas dos ensaios agudos com o copépodo bentônico <i>Nitokra</i> sp	127
Anexo 5. Condições físicas e químicas dos ensaios agudos com o anfípodo bentônico <i>Leptocheirus plumulosus</i>	127

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS QUÍMICAS E SÍMBOLOS

µg/L	Microgramas por litro
ABNT	Associação Brasileira de Normas e Técnicas
ASTM	American Society for Testing and Materials
CE₅₀	Concentração de efeito - concentração do agente tóxico que causa efeito a 50% dos organismos-teste, em relação ao controle, em determinado período de exposição nas condições do ensaio.
CENO	Concentração do efeito não observado - maior concentração do agente tóxico que não causa efeito significativo ao organismo-teste significativo ao organismo-teste, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio.
CEO	Concentração do efeito observado - menor concentração do agente tóxico que causa efeito significativo ao organismo - teste, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio.
CI₅₀	Concentração de Inibição - concentração do agente tóxico que causa inibição a 50% dos organismos-teste, em relação ao controle, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio.
CL₅₀	Concentração letal - concentração letal a 50% dos organismos-teste em relação ao controle
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficiente de variação
Desv. pad	Desvio padrão
DSS	Dodecil Sulfato de Sódio
ISO	International Organization for Standardization
K	Coeficiente de correção
k	Taxa de crescimento
mg.L⁻¹	Miligramas por litro
(I)	Valor da concentração nominal

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ANEXOS	7
LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS QUÍMICAS E SÍMBOLOS	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Organismos-teste	24
3.1.1. Microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	24
3.1.2. Embriões de ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	25
3.1.3. Copépodo <i>Nitokra</i> sp	26
3.1.4. Anfípodo <i>Leptocheirus plumulosus</i>	28
3.2. Agente tóxico: Naftaleno	31
3.3. Solvente	32
3.4. Ensaios de Efeito Crônico	32
3.4.1. Ensaio crônico com a microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	32
3.4.1.1. Curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	35
3.4.1.2. Efeito algicida / algistático	35
3.4.2. Ensaio crônico com embriões do ouriço-do-mar <i>L. variegatus</i>	36
3.4.3. Ensaio crônico com o copépodo estuarino bentônico <i>Nitokra</i> sp.	39
3.5. Ensaios de Efeito Agudo	41
3.5.1. Ensaio agudo com o copépodo estuarino bentônico <i>Nitokra</i> sp	42
3.5.2. Ensaio agudo com o anfípodo estuarino bentônico <i>Leptocheirus plumulosus</i>	42
3.6. Substância de Referência	44
3.7. Análise de Espectrofotometria de Ultravioleta	45
3.8. Expressão de Resultados e Cálculos Estatísticos	46

3.9. Descarte do naftaleno	48
4. RESULTADOS	48
4.1. Ensaio com a microalga marinha <i>Dunaliella tertiolecta</i>	49
4.1.1. Curva de crescimento	49
4.1.2. Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito crônico em <i>Dunaliella tertiolecta</i>	51
4.1.3. Efeito algicida e algistático	54
4.1.4. Ensaio de sensibilidade de <i>Dunaliella tertiolecta</i> ao DSS	55
4.2. Ensaio com embriões de ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	56
4.2.1. Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito crônico com <i>Lytechinus variegatus</i> e o naftaleno	56
4.2.2. Ensaio de sensibilidade de <i>Lytechinus variegatus</i> ao DSS	59
4.3. Ensaio com copépodo estuarino <i>Nitokra</i> sp	61
4.3.1. Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito crônico com <i>Nitokra</i> sp	61
4.3.1.1. Ensaio de sensibilidade de <i>Nitokra</i> sp ao DSS (paralelo aos ensaios crônicos)	63
4.3.2. Ensaio ecotoxicológico de efeito agudo com <i>Nitokra</i> sp e naftaleno	64
4.3.2.1. Ensaio de sensibilidade de <i>Nitokra</i> sp ao DSS (paralelo aos ensaios agudos)	67
4.4. Ensaio com anfípodo bentônico <i>Leptocheirus plumulosus</i>	67
4.4.1. Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito agudo com <i>Leptocheirus plumulosus</i> ao naftaleno	67
4.4.2. Ensaio de sensibilidade de <i>Leptocheirus plumulosus</i> ao DSS	70
4.5. Intervalo de valores dos níveis tróficos	71
4.6. Análise espectrofotométrica de ultravioleta	72
5. DISCUSSÃO	75
5.1. Microalga marinha <i>Dunaliella tertiolecta</i>	76
5.1.1. Curva de crescimento	76
5.1.2. Efeito algicida e algistático	77
5.1.3. Ensaio ecotoxicológico crônico com <i>Dunaliella tertiolecta</i>	78
5.1.4. Ensaio de sensibilidade de <i>Dunaliella tertiolecta</i> ao DSS	79
5.2. Ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	80
5.2.1. Ensaio de efeito crônico com embriões do ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	81

5.2.2. Ensaio de sensibilidade de <i>Lytechinus variegatus</i> ao DSS	82
5.3. Copépodo estuarino bentônico <i>Nitokra</i> sp	83
5.3.1. Ensaio crônico e agudo com o copépodo estuarino bentônico <i>Nitokra</i> sp	83
5.3.2. Ensaio de sensibilidade de <i>Nitokra</i> sp ao DSS	85
5.4. Anfípodo estuarino bentônico <i>Leptocheirus plumulosus</i>	86
5.4.1. Ensaio agudo com o anfípodo estuarino <i>Leptocheirus plumulosus</i>	86
5.4.2. Ensaio de sensibilidade de <i>Leptocheirus plumulosus</i> ao DSS	87
5.5. Análise espectrofotométrica de decaimento do naftaleno	87
5.6. Sensibilidade ao naftaleno entre os diferentes níveis tróficos	89
5.7. Limites de concentração de naftaleno em leis nacionais	92
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8. ANEXOS	126

1. INTRODUÇÃO

Enquanto no século XX o *boom* industrial contribuiu inquestionavelmente com incontáveis benefícios para espécie humana criou, em muitos casos, problemas extremos de poluição em níveis locais, regionais e globais (Sousa, 2002). A preocupação com a contaminação ambiental por substâncias tóxicas têm aumentado em virtude da grande quantidade de produtos poluentes lançados no ambiente nos últimos anos. Entre as causas desse fenômeno está o aumento da densidade populacional e da atividade industrial, que tem levado a maior liberação destes compostos para o meio, incluindo atividades associadas ao uso de recursos naturais, a intensificação da agricultura e a necessidade de produção de energia (Fay *et al.*, 2004).

Neste contexto, o petróleo, fonte de energia da humanidade, tem sido o principal responsável pelos modelos econômicos, sociais e culturais estabelecidos ao longo dos últimos séculos. Estima-se hoje que a indústria do petróleo proveja cerca de 60% da necessidade de energia mundial, sendo que para alguns países, este valor chegue a 90% (Patin, 1999). Contudo, a utilização do petróleo não se resume em fornecer energia. Os derivados de petróleo tem sido de extensa e fundamental importância para a manufatura de inúmeros bens de consumo, indispensáveis à sociedade moderna.

Segundo a Agência Nacional do Petróleo- ANP (ANP, 2012), a produção de petróleo em novembro de 2011 foi a maior registrada até hoje no Brasil. Foram produzidos aproximadamente 2,188 milhões de barris por dia, que superaram o recorde anterior de 2,180 milhões barris por dia, registrado em dezembro de 2010. Nestas circunstâncias, o aumento em operações de exploração, transporte, refino e distribuição representam fontes potenciais de poluição ambiental dos oceanos (Geraldes-Kataoka, 2011).

Em termos quantitativos, o petróleo pode ser considerado como o poluente orgânico mais comumente encontrado nos ecossistemas marinhos (Head *et al.*, 1999). O *input* nos oceanos é estimado como sendo na ordem de 1.300.000 toneladas métricas de hidrocarboneto ao ano (NRC, 2003). Há poucos anos, acreditava-se que os oceanos possuíam uma capacidade quase infinita de absorver os resíduos nele lançados e que a diluição das substâncias

potencialmente tóxicas solucionava o problema (Jobling, 1995). Atualmente, percebe-se que estes ambientes nada mais são do que compartimentos frágeis, dos quais depende o equilíbrio marinho, terrestre e a existência humana.

O petróleo é formado a partir da matéria orgânica proveniente de plantas e animais, que quando sedimentados em lamas argilosas são submetidos a processos químicos geológicos e geoquímicos sobre ação de baixa temperatura e alta pressão. É um líquido oleoso, pouco denso ($d = 0,65$ a $0,9 \text{ g.cm}^{-3}$) e imiscível em água. Dependendo da região de formação pode apresentar coloração negra ou avermelhada, sendo constituído por milhares de compostos orgânicos, com grande predominância de hidrocarbonetos diversos (Zakaria *et al.*, 2002).

Depois de extraído e presente no ambiente, o petróleo pode passar por diversos processos que envolvem desde a volatilização, hidrólise, fotólise, biodegradação, biotransformação, degradação física e dissolução (Pedrozo *et al.*, 2002). No caso de acidentes, os componentes polares e de baixo peso molecular tendem a volatilizar ou se solubilizar com a água e serem lixiviados para fora da mancha de óleo constituindo a chamada Fração Solúvel do Petróleo (FSA). A dimensão do impacto gerado e a velocidade de cada um desses processos variam de acordo com as condições intrínsecas de cada ambiente e das características de cada tipo de petróleo, tornando-se muito difícil prever a toxicidade.

Aproximadamente 97% da composição do petróleo constituem-se de hidrocarbonetos, compostos formados por carbono e hidrogênio. Em média, o petróleo contém cerca de 80% de hidrocarbonetos alifáticos e 15% de compostos aromáticos (Neff, 1979). Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos lipofílicos que possuem em sua composição anéis aromáticos fundidos formando diversos arranjos (Boonyatumanond *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

Os HPAs (Hidrocarboneto Policíclico Aromático) são uma classe de contaminantes bastante conhecidos, originados principalmente pela combustão incompleta de compostos orgânicos e processos geoquímicos. Podem ser

encontrados em todos os compartimentos ambientais, incluindo água, solo e ar (Valdman, 2004). Estes compostos podem apresentar dois ou mais anéis aromáticos fundidos, com caráter hidrofóbico de baixa biodegradabilidade e com potencial acumulativo (Vasconcellos *et al.*, 2007).

São considerados HPAs de origem natural os hidrocarbonetos de fonte biogênica, que são aqueles sintetizados por microorganismos, plantas e animais (Krauss *et al.*, 2005), em regiões tropicais (Wilcke *et al.*, 2003). Os HPAs resultantes de processos antropogênicos dividem-se em fontes petrogênica e pirogênica (Pietzsch *et al.*, 2010) e para Hylland (2006), somente esses possuem importância quantitativa nos ecossistemas marinhos.

Os HPAs de origem petrogênica são gerados através do descarte de produtos derivados diretamente do petróleo como gasolina, diesel, óleos lubrificantes e asfalto (Mantis *et al.*, 2005). Eles são emitidos diretamente para o ambiente marinho através de efluentes domésticos e industriais, por meio de vazamentos de petróleo, derrames acidentais, descarga de água de lastro de navios (Boonyatumanond *et al.*, 2006) e são, segundo Silliman *et al.* (1998) constituídos predominantemente por 2 a 3 anéis aromáticos e baixo peso molecular (e.g. naftaleno, fluoreno e fenantreno).

As fontes pirolíticas por sua vez, são geradas a partir da queima incompleta de combustíveis fósseis e de biomassa (Billiard *et al.*, 2006) assim como a combustão de motores e atividades industriais (Broman *et al.*, 1991; Heemken *et al.*, 2000). Sua introdução no ambiente aquático ocorre pela deposição atmosférica, precipitação de partículas em suspensão, carregamento de gases e partículas e pela precipitação chuvosa (Zitko, 2000). De acordo com Silliman *et al.* (1998) são constituídos de 4 a 6 anéis aromáticos e alto peso molecular (e.g. fluoranteno, pireno, benzo[a]pireno).

Quanto maior a massa molecular do HPA, maior será sua toxicidade (Bícego, 1996). Porém em água, os compostos com menor massa molecular, resultam em maiores efeitos na biota marinha e estuarina, devido à maior solubilidade e, portanto maior disponibilidade. Neste contexto, quanto mais hidrofílicos os HPAs (2 a 3 anéis), mais biodisponíveis estão na coluna de água, enquanto que aqueles mais hidrofóbicos (4 a 6 anéis) tendem a se

associar ao material particulado (Bícego, *op. cit.*). Os efeitos toxicológicos agudos nos organismos são mais severos com HPAs de menor massa molecular, enquanto que nos HPAs que apresentam de 4 a 6 anéis aromáticos o que prevalece é o alto potencial de mutagenicidade (Nascimento *et al.*, 2007).

Os compostos de HPAs têm uma importante relevância a serem determinados em ambientes marinhos e estuarinos, pois apresentam potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico tanto para organismos aquáticos como para o homem (CETESB, 2001). O lançamento de contaminantes nos oceanos e estuários, além de provocar danos à biota aquática e riscos à saúde humana, podem causar um entrave às atividades marinhas tais como a pesca e outras utilizações legítimas do mar, principalmente no que se refere a sua utilização direta ou em atividades recreativas associadas, conforme caracterizado pela Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (CDUM, 1985).

O naftaleno é um hidrocarboneto policíclico aromático ($C_{10}H_8$), cujas moléculas são constituídas de dois anéis benzênicos fundidos. Tanto o naftaleno como seus derivados alquilados, são os principais HPAs presentes no petróleo bruto (UNEP, 1991). É um composto de baixa massa molecular, que caracteriza fontes de origem petrogênica derivadas diretamente do petróleo. Por apresentar maior solubilidade possui maior potencial para causar toxicidade aguda em organismos aquáticos (Manoli e Samara, 1999; Yunker *et al.*, 2002; De Luca *et al.*, 2005; Boonyatumanond *et al.*, 2006; Celino e Queiroz, 2006). Nesse contexto Vijayavel *et al.* (2004) ressaltaram que dentre os HPAs, o naftaleno é um dos compostos mais destacados, devido à sua alta toxicidade, baixa sensibilidade à foto-oxidação, elevada persistência na água e baixo peso molecular. Segundo Corner (1978) o naftaleno está entre os mais tóxicos e abundantes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos dissolvidos em águas.

Holdway (2002), acredita que os naftalenos e fenantrenos (HPAs com respectivamente 2 e 3 anéis aromáticos), sejam os principais responsáveis pela toxicidade aguda do óleo cru. Assim, o naftaleno junto a outros HPAs, é considerado como a classe de poluentes de maior contribuição à toxicidade, passando a ser enquadrado na lista prioritária de contaminantes orgânicos

persistentes (Elijarrat *et al.*, 2003). A tabela 1 representa algumas propriedades físicas e químicas do naftaleno.

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do naftaleno.

Propriedades	Naftaleno	Referências
Peso molecular	128,19	Weast <i>et al.</i> , 1985
Log K _{ow}	3,29	Mabey <i>et al.</i> , 1982
Log K _{oc}	2,97	Mabey <i>et al.</i> , 1982
Coloração	Branco	Verschueren, 1983
Densidade	1,145 g.mL ⁻¹	Weast <i>et al.</i> , 1985
Pressão vapor	0,087 mmHg	Mabey <i>et al.</i> , 1982
Estado físico	Sólido	Verschueren, 1984
Ponto de fusão	80,5°C	Weast <i>et al.</i> , 1985
Ponto de ebulição	218°C	Sax <i>et al.</i> , 1989
Fator de conversão	1 ppm = 5,24 mg.m ⁻³	Verschueren, 1983
Solvente orgânico	Benzeno, metanol, éter	Sax <i>et al.</i> , 1989
Solubilidade em água 20°C	31,7 mg.L ⁻¹	Mabey <i>et al.</i> , 1982

Segundo Falandysz (1997), o naftaleno é considerado uma substância tóxica obíqua. Neste caso, a entrada do naftaleno no meio ambiente se dá por diversas formas. Clark *et al.* (1982) afirmaram que o principal *input* deste hidrocarboneto ocorre pelo descarte de produtos derivados do petróleo, através de efluentes industriais e domésticos, sendo encontrado em resíduos de refinaria de petróleo (Wallen *et al.*, 1957), óleo bruto (Struhsaker *et al.*, 1974), em purificadores de água a partir da destilação do carvão (Shelford, 1917), em subprodutos da produção de carvão (SkeistLaboratories, 1969), em águas residuais a partir da autoclavagem de óleo de xisto (Pellizzari, 1978), no alcatrão de carvão (McKee & Wolf 1963; Pellizzari 1978) e resíduos da indústria têxtil (McKee & Wolf, 1963).

O ambiente aquático é o compartimento final para os mais diversos tipos de contaminantes. Estas substâncias, denominadas de xenobióticos podem ser produzidas por origem antrópica ou ser de origem natural, e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento no meio ambiente (Livingstone, 1993; 1998). Elevados níveis de poluentes e emissões de inúmeros resíduos, sem o devido tratamento, atingem direta ou indiretamente o ambiente marinho e podem ser acumulados e transferidos através da cadeia alimentar, trazendo riscos inclusive ao homem (Sousa, 2002). Para isso, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas, com bases científicas, voltadas para o controle

de poluentes na água do mar e o estabelecimento de níveis aceitáveis para o descarte de compostos, individualmente ou em misturas complexas (Chapman & Long, 1983), buscando integrar assim, os efeitos na biota.

A ecotoxicologia é a ciência que integra a ecologia e a toxicologia (Chapman, 1995), tendo como objetivo compreender e prever potenciais efeitos de substâncias químicas em comunidades biológicas. Uma vez que análises químicas identificam e quantificam as substâncias presentes na água ou sedimento, mas não detectam os efeitos sobre a biota, os ensaios ecotoxicológicos devem ser considerados como uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois se fundamentam na utilização de organismos vivos diretamente afetados pelos desequilíbrios ocorridos eventualmente nos ecossistemas aquáticos onde vivem (Zagatto & Bertoletti, 2006). Estes ensaios são uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos das substâncias químicas em diferentes organismos e populações, fornecendo subsídios para avaliar e proteger adequadamente a qualidade ambiental (Chapman, 2002).

Os ensaios ecotoxicológicos são utilizados para identificar os efeitos “agudos” ou “crônicos”, em função do tempo de exposição dos organismos à substância tóxica e do efeito a ser observado (Rand, 1985). Normalmente, concentrações elevadas produzem respostas agudas, e concentrações baixas respostas crônicas, que demandam um longo intervalo de tempo para causar efeitos (Herricks, 2002).

Os ensaios ecotoxicológicos de efeito agudo são utilizados para avaliar os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies aquáticas, durante um curto período de tempo em relação ao ciclo de vida do organismo-teste. Eles têm como objetivo estimar a concentração de um agente tóxico capaz de produzir uma resposta específica mensurável, como a letalidade em um organismo ou população, após um período de tempo relativamente curto, geralmente de 24 a 96 horas (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990). As avaliações de efeito agudo são importantes para evidenciar os efeitos letais, fornecendo dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios para melhoria da qualidade ambiental (Fonseca, 1991). Os resultados são calculados para obtenção da CL (concentração letal) ou CE (concentração efetiva) a uma dada porcentagem

dos organismos (Nipper, 2002; Rand, 1985). Geralmente, o valor de porcentagem mais utilizado é 50%, com o propósito de calcular a concentração média que causa efeito adverso em 50% dos organismos expostos durante o período de ensaio (Nipper, 2002).

Segundo Romanelli (2004) os ensaios de toxicidade crônica avaliam os efeitos subletais por um prolongado período de exposição e abrangem, em geral, uma parte significativa do ciclo de vida do organismo, resultando em mudanças na taxa de crescimento, desenvolvimento e reprodução. Estas observações ocorrem durante um período de exposição considerado longo em relação ao ciclo de vida dos organismos, geralmente de 48 horas a 10 dias, dependendo do ciclo de vida do organismo-teste (Rand, 1985). De modo geral, os efeitos subletais são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico, permitem a sobrevivência dos organismos-teste, mas podem afetar uma ou mais funções biológicas (Magalhães & Filho, 2008). Os resultados são comparados estatisticamente entre o controle e as concentrações para obtenção da concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). CENO é considerada a menor concentração que for significativamente diferente da amostra controle. CEO é considerada a maior concentração que difere significativamente da amostra controle por apresentar efeito adverso (ABNT, 2011). Também é utilizada a CI (concentração de inibição) que por um valor pontual de toxicidade determina a porcentagem de redução no desenvolvimento do organismo exposto (ABNT, 2006).

A toxicidade de agentes químicos no meio aquático pode ser avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos do ambiente em questão, que apresentem confiabilidade e garantam a reprodutibilidade e robustez de resultados (Aragão & Araújo, 2006). Em razão da multiplicidade de espécies existentes e das inúmeras relações de dependência entre elas, preconiza-se que os ensaios sejam realizados com no mínimo, três organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos, de modo a obter o resultado com o organismo mais susceptível, estimando com maior segurança o impacto (Rand, 1995).

Um dos objetivos da ecotoxicologia é o desenvolvimento de protocolos de ensaios que permitam definir limiares de toxicidade permissíveis com níveis de incerteza aceitáveis e que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões.

A agência de proteção ambiental norte americana (*Environmental Protection Agency* - EPA), publicou nos anos de 1998, 2000 e 2008, guias de toxicologia humana para riscos de contaminação com naftaleno, apresentando medidas de mitigação e gestão de risco que justificam os perigos e dose-resposta do naftaleno para saúde humana. Porém um guia mais antigo, datado de 1980, foi criado para fins ambientais, com especificidade na qualidade de água. Este guia, confeccionado especificamente para toxicidade com naftaleno (EPA, 1980) indica valores de toxicidade para vida aquática englobando águas doces e marinhas. Os limites encontrados para vida aquática em água doce, indicaram toxicidade a partir da concentração $620 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $2300 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para organismos de águas marinhas, mais resistentes, a partir de $2350 \mu\text{g.L}^{-1}$.

A agência australiana de estratégia de gestão de qualidade da água (*National Water Quality Management Strategy* - WQG) publicou em 2000, um guia que especifica diretrizes para proteção da diversidade dos ecossistemas aquáticos no território Australiano e Neozelandês. Os valores limite de concentração de naftaleno em amostras líquidas, foram obtidos a partir de $85 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água doce e $120 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água salgada, e este guia indica planos de ação no caso destes limites serem ultrapassados.

O ministério do meio ambiente da Columbia Britânica nos Estados Unidos (*Ambient Water Quality Guideline for Naphthalene to Protect Freshwater life*) criou um guia para prevenção e remediação de naftaleno no ano de 1993, revisado em 2006, com objetivo de garantir a qualidade ambiental da água doce e marinha. Este guia consiste em orientações, planos de prevenção da poluição, licença de gestão de resíduos e planos de manejo para locais contaminados com naftaleno. Segundo este plano, o limite permitido de concentração de naftaleno para proteção da vida aquática inicia-se em $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. O rigoroso critério foi baseado em ensaios de efeito crônico.

O ministério do meio ambiente canadense (*Environmental Canada*) em 2008, propôs uma gestão para riscos de contaminação humana com naftaleno, e com a responsabilidade de coordenar as políticas de preservação e conservação do meio ambiente a Environmental Canada, (1999) publicou em seu guia os valores permitidos para naftaleno em água doce $1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para água marinha $1,4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Em decorrência de tais fatos, é possível verificar que alguns países contam com valores de referência, com ou sem forças de lei, para controle e intervenções quando há contaminação por naftaleno. Alguns guias indicam modelos de avaliação de risco, modelos matemáticos e os passos a serem seguidos. Porém, a principal finalidade destes protocolos é estabelecer limites para a concentração de naftaleno nos corpos hídricos, afinal, o comportamento desta substância no meio ambiente pode variar devido às propriedades físicas, químicas e hidrodinâmicas de cada região, além de outros fatores que possam acentuar a toxicidade da substância no meio ambiente.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o órgão brasileiro, responsável pela elaboração de diretrizes e políticas governamentais que tem por finalidade deliberar, no âmbito de sua competência, normas, padrões e critérios de controle ambiental. Para qualquer atividade que apresente possível impacto ao ambiente marinho são utilizadas como padrão de comparação duas resoluções de estudos de monitoramento e diagnóstico do meio ambiente: Resolução CONAMA 357/2005 que classifica os corpos d'água para seu enquadramento quanto a sua utilização e a Resolução CONAMA 344/2004 com enfoque na avaliação do sedimento a ser dragado.

Os valores indicados para o naftaleno na Resolução CONAMA 344/2004, estabelecem concentrações limite deste contaminante em sedimentos a serem dragados em águas brasileiras, com base nos valores de referência canadense de qualidade de sedimentos para proteção e manutenção da vida aquática, elaborado pelo ministério do meio ambiente do Canadá em 1999 e atualizado em 2002. Segundo o critério canadense, TEL (threshold effect level) é o limiar abaixo do qual não se observa efeito adverso aos organismos marinhos e estuarinos, e PEL (probable effect level), o valor

acima do qual provavelmente se observa efeito adverso aos organismos marinhos e estuarinos. Especificamente para naftaleno, estes valores estão entre TEL = 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e PEL = 2100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ calculado em unidade de material seco a ser dragado.

Como relatado anteriormente, para Valdman *et al.* (2004) o naftaleno é classificado em destaque entre os HPAs, por possuir maior solubilidade em água. Quando introduzido no ambiente de forma dissolvida, coloidal, é fracamente associado ao material particulado, enquanto os compostos de alto peso molecular são associados por processos de adsorção ou incorporação (Benlahcen, 1997).

Os valores de referência para qualidade das águas segundo a Resolução CONAMA 357/2005, que classifica os corpos de água e dá diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como condições e padrões de lançamento de efluentes, estabelece limites individuais para algumas substâncias em cada classe. Porém, nem todas as substâncias consideradas tóxicas estão listadas dentro dos limites máximos admissíveis, como acontece com o naftaleno.

Os limites de concentrações são definidos a partir do efeito biológico em um determinado organismo ou sistema, usado como índice de efeito de um agente tóxico (EPA, 1989). A partir deles pode-se prever qual a concentração máxima de um contaminante no ambiente que pode ser considerada segura, buscando gerenciar o risco e permitir o uso seguro destas substâncias. A utilização de ensaios ecotoxicológicos, que venham contribuir com informações sobre o efeito tóxico causado aos ecossistemas por substâncias químicas, torna-se cada dia mais importante nas avaliações de impacto ambiental. Deste modo, a aplicação de ensaios ecotoxicológicos tem sido incluída em programas de monitoramento, constituindo uma das análises indispensáveis no controle de fontes de poluição (CETESB, 1990).

Para avaliar os potenciais efeitos causados pela presença de poluentes no ecossistema marinho utilizam-se ensaios ecotoxicológicos com espécies e métodos padronizados (Rodrigues *et al.*, 2006). Os organismos mais utilizados em ensaios ecotoxicológicos em países onde as avaliações de toxicidade e

monitoramento são rotineiramente realizadas incluem: embriões de equinoderma, embriões de bivalves, microalgas, bactérias luminescentes, rotíferos, copépodos, anfípodos e outros.

O presente trabalho teve como objetivo contribuir com informações sobre o efeito crônico e agudo em organismos pertencentes a três diferentes níveis tróficos expostos ao naftaleno. Foram utilizadas normas nacionais que padronizam os ensaios de efeito crônico com a microalga *Dunaliella tertiolecta* (ABNT NBR 12648 adaptada, 2011) e ensaios de efeito crônico com embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (ABNT NBR 15350, 2011). Adicionalmente, neste estudo foram utilizados dois microcrustáceos oriundos de regiões estuarinas. O copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp (Lotufo, 2002) nativo da região entre-marés de Cananéia, SP, que é listado para ser normatizado pela Comissão Especial de Análises Ecotoxicológicas da ABNT(ABNT/CEE-106), e o anfípodo estuarino *Leptocheirus plumulosus*, originário da porção oeste do Norte do Oceano Atlântico, amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológicos por sua sensibilidade com diferentes agentes tóxicos. O *Leptocheirus plumulosus* é um importante representante em ecossistemas estuarinos e pode ser comparado com organismos nativos da costa brasileira. A importância de se considerar estes organismos é que até o momento não existem normas nacionais para ensaios ecotoxicológicos de efeito agudo com organismos estuarinos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda e crônica do naftaleno para organismos marinhos e estuarinos por meio de ensaios ecotoxicológicos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar da toxicidade crônica do naftaleno para a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e para o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp.
- Avaliar a toxicidade aguda do naftaleno para o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp e para o anfípodo estuarino bentônico *Leptocheirus plumulosus*.
- Avaliar a toxicidade do naftaleno para organismos de diferentes níveis tróficos.
- Fornecer dados que auxiliem no estabelecimento de limites na concentração de naftaleno em corpos hídricos receptores e contribuir com dados para avaliação de risco ambiental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Organismos-Teste

3.1.1. Microalga *Dunaliella tertiolecta*

A espécie *Dunaliella tertiolecta* (Butcher 1959) é uma microalga unicelular de ampla distribuição mundial, da classe Chlorophyceae, divisão Chlorophyta, pertencente à família Dunaliellaceae, ordem Dunaliellales (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Suas células são elipsoidais de 5 a 18 µm de comprimento e de 4,5 a 14 µm de largura e possuem dois flagelos de 2 a 2,5 vezes seu comprimento (Borowitzka & Siva, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Microalga *Dunaliella tertiolecta* em microscopia de contraste de fase (Fotografia de Eduardo Masami Kitahara).

O uso de microalgas na avaliação da toxicidade tem sido uma importante ferramenta para o monitoramento da qualidade de águas superficiais e subterrâneas (Rodrigues *et al.*, 2006), pois são organismos planctônicos de grande importância ecológica, contribuindo enormemente com a produção primária, e garantindo a manutenção da cadeia trófica dentro do ecossistema marinho. Além disso, podem participar da autopurificação dos corpos de água sujeitos à ação de despejos, resultantes de diferentes atividades humanas (Aidar *et al.*, 2002).

A linhagem utilizada neste estudo é proveniente de uma cepa isolada da região de Cabo Frio – RJ mantida no Banco de Microorganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo em cultivo clonal na salinidade de 36 ± 1 em uma sala climatizada na temperatura a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, regulada por um climatizador EASY WARE® e fotoperíodo de 12 h de fase clara

e 12 h de fase escura, reguladas por um temporizador automático MINIPA® (Figura 2).

Figura 2. Cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* no Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP (Fotografia de Claudia Camila Minei).

3.1.2. Embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

O ouriço do mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) da família Toxopneustidae, é caracterizado por espinhos finos e curtos inseridos em uma carapaça levemente achatada de cores que variam desde os tons de verde à púrpura arroxeada (Figura 3). Sua dieta consiste em alimentar-se de macroalgas, e são comumente encontrados ao longo de costões rochosos no litoral brasileiro, desde a zona entre marés até cerca de 20 m de profundidade, 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 (ABNT, 2011).

Embriões de ouriço-do-mar são comumente utilizados em ensaios ecotoxicológicos devido à sua sensibilidade, fácil coleta dos organismos adultos e manuseio (Kobayashi, 1980). Na região sudeste do Brasil, a fertilidade desta espécie é constante durante todo ano, além de fornecer resultados de fácil interpretação e bastante reproduzíveis (Nipper *et al.*, 1993). Dentre as espécies de ouriço-do-mar, *Lytechinus variegatus* tem sido uma das mais utilizada em ensaios ecotoxicológicos no Brasil (Mastroti, 2002).

Figura 3. Indivíduo adulto de *Lytechinus variegatus* liberando líquido espermático (Fotografia de Mariana Stefanon Cariello).

3.1.3. Copépodo *Nitokra* sp

O copépodo bentônico estuarino *Nitokra* sp, pertence ao Filo Artropoda, Classe Maxilipoda, Subclasse Copepoda, Ordem Harpacticoida e Família Ameiridae (Boeck 1864), e possui tamanho entre 0,5 a 0,7mm (Figura 4).

Figura 4. Indivíduo adulto do copépodo *Nitokra* sp (Fotografia em contraste de fase de Eduardo Masami Kitahara).

Copépodos harpacticóides possuem características bastante atrativas para serem utilizados como organismos-teste na avaliação da toxicidade de amostras líquidas e de sedimentos (Chandler *et al.*, 2004). Segundo Ruppert & Barnes (1996) os harpacticóides, incluem mais de 50% das espécies de copépodos, são predominantemente bentônicos, sendo que alguns vivem entre os grãos de areia, como é o caso do *Nitokra* sp. São membros proeminentes do meiobentos e representam uma importante parte da cadeia alimentar marinha como consumidores de microalgas, bactérias e detritos, interligando o elo de transferência de energia e contaminantes no ambiente marinho,

disponibilizando os compostos associados ao sedimento para outros níveis tróficos (Hicks & Coull, 1983; Montagna, 1995).

Estes organismos apresentam dimorfismo sexual e a fertilização é feita por cópula, na qual o macho transfere um ou mais espermatóforos para o somito genital da fêmea (Boltovskoy, 1999). Os ovos dos harpaticóides são mantidos dentro de um ovissaco que é produzido por secreções vindas do oviduto. Quando os ovos são liberados, permanecem presos ao segmento genital feminino que funciona como uma câmara incubadora. Os estágios de desenvolvimento do harpacticoidea desde a eclosão do ovo até a fase adulta são: 6 fases naupliares, 5 fases copepoditos e 1 fase adulta (Lotufo & Abessa, 2000). Uma representação simplificada dos estágios de desenvolvimento está apresentada na Figura 5.

Figura 5. Fases do ciclo de vida do copépodo bentônico *Nitokra* sp (Fotografia em contraste de fase de Eduardo Masami Kitahara)

Exemplares do copépodo *Nitokra* sp vem sendo mantidos em cultivo monoespecífico no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo desde 1998. Este cultivo iniciou-se a partir de espécimes coletadas no nível inferior da zona entre-marés de bancos de *Spartina alterniflora*, na região do complexo estuarino-lagunar de

Cananéia, São Paulo. Esta espécie foi isolada e adaptou-se plenamente as condições de cultivo, mantidas em recipientes com água reconstituída em recipientes com capacidade de 1 L na salinidade 20 ± 3 . O cultivo é mantido em sala climatizada na temperatura de aproximadamente $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo natural (Figura 6). A manutenção do cultivo é realizada quinzenalmente com a troca parcial da água e a análise das condições físicas e químicas.

Figura 6. Cultivo de *Nitokra* sp do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos - IOUSP.

As culturas são alimentadas três vezes por semana com “pool” de microalgas marinhas contendo: *Tetracelmis gracilis*, *Chaetoceros gracilis*, *Clorophyceae*, *Dunaniella tertiolecta*, *Hillea* sp, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp, *Odontela* sp, *Pavlova lutheri*, *Synechococcus subsalsus*, *Thalassiosira oceânica*, *Prorocentrum minimum*, e para enriquecimento da dieta é adicionado composto de ração de peixe fermentada.

3.1.4. Anfípodo estuarino bentônico *Leptocheirus plumulosus*

O anfípodo bentônico *Leptocheirus plumulosus*, pertencente à família Aoridae, apresenta o formato do corpo cilíndrico com coloração marrom-acinzentada e listras escuras ao redor da superfície dorsal do corpo, chegando a medir 1,3 cm de comprimento quando adulto (Figura 7). Alimentam-se de pequenos organismos e matéria orgânica na superfície dos sedimentos (DeWitt *et al.*, 1992a).

Figura 7. Exemplar adulto de *Leptocheirus plumulosus* (Fotografia em contraste de fase de Eduardo Masami Kitahara)

Sua ocorrência é dada na porção subtidal estuarina no norte do Atlântico, especialmente no estuário de Cape Cod em Massachusetts, podendo ser encontrado até o norte da Flórida, nos Estados Unidos (Bousfield, 1973). É comum encontrar indivíduos desta espécie em baías protegidas, em canais de rios salinos com profundidade maiores que 10 m (Schlekat *et al.*, 1992). Esta espécie é encontrada tanto em regiões estuarinas oligohalinas quanto mesohalinas. Estudos realizados por Schlekat *et al.* (1992) demonstram que esta espécie tolera um intervalo de salinidade entre 0 e 32. Este organismo tem preferência por grãos de sedimento finos, acompanhados por uma alta concentração de matéria orgânica particulada (Holland *et al.*, 1998).

Segundo Marsh e Tenore (1990), a população de *Leptocheirus plumulosus* pode ser sazonal, com maior crescimento populacional na primavera e declínio no verão, devida a ação de peixes predadores e a ausência de micronutrientes essenciais. Segundo a EPA (2001), este organismo apresenta significativa sensibilidade em ensaios ecotoxicológicos, fácil cultivo em condições laboratoriais, tolerância às condições físicas e químicas como temperatura, salinidade e granulometria do sedimento de cultivo.

Os indivíduos de *Leptocheirus plumulosus* foram obtidos a partir de uma cultura estabelecida de um laboratório nos Estados Unidos e vem sendo cultivado de acordo com o protocolo da EPA (2001) no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos (LEcotox) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo desde abril de 2011 (Figura 8).

Os organismos são mantidos em recipientes de vidro com uma camada fina de sedimento de aproximadamente 2 cm de espessura, preenchido com aproximadamente 2 L de água reconstituída com 20 ± 3 de salinidade. O sedimento, isento de contaminantes, apresenta granulometria de aproximadamente 0,25 mm. As culturas são mantidas em uma incubadora da marca Fanem® a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, em fotoperíodo de 12 h fase clara e 12 h fase escura, reguladas por um temporizador automático MINIPA® e aeração constante.

A manutenção dos cultivos é realizada em duas etapas: manutenção parcial e manutenção total. A manutenção parcial é realizada duas vezes por semana e consiste na troca parcial da água superficial dos cultivos, alimentação e análise das condições físicas e químicas de cada recipiente.

A manutenção total é realizada a cada quarenta dias onde é feita a troca de sedimento. Para tanto, o sedimento de cada recipiente é peneirado e então separado os indivíduos adultos, jovens e neonatos, com auxílio de peneiras com abertura de malha de 1,0; 0,5 e 0,25 mm, respectivamente. Os organismos separados em diferentes estágios de desenvolvimento são recolocados em recipientes contendo novo sedimento, água reconstituída e aeração constante.

É recomendada uma dieta simples, duas vezes por semana com ração de peixe triturada ou em flocos de pó fino.

Figura 8. Cultivo de *Leptocheirus plumulosus* no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos – IOUSP (LEcotox).

3.2. Agente tóxico: Naftaleno

O naftaleno é um hidrocarboneto policíclico aromático cuja molécula é constituída por dois anéis benzênicos condensados. Apresenta a fórmula molecular $C_{10}H_8$ e baixo peso molecular de 128,16 (Figura 9).

Figura 9. Estrutura molecular do HPA naftaleno.

O naftaleno é produzido através da destilação e fracionamento do petróleo e do alcatrão. Considera-se o naftaleno como um híbrido de ressonância de três estruturas canônicas, a qual sofre facilmente reações de substituição eletrofílica, principalmente na posição alfa que é a mais reativa, nomeadamente reações de nitrificação, bromação, sulfonação e acidificação. O composto isolado é uma substância cristalina branca, volátil, em forma de lâminas (EPA, 1987).

O naftaleno e os resíduos contendo naftaleno foram classificados como perigosos pela EPA (1988). O seu impacto em seres humanos e outros mamíferos foi extensivamente estudado desde a década de 80 (LINICK, 1983). Entretanto, há um limitado número de estudos para determinar a toxicidade em espécies aquáticas no Brasil. Em países nórdicos em ambientes hídricos naturais, foram encontradas concentrações de naftaleno variando entre 0,00005 até mais de 66 $mg.L^{-1}$ (Environment Canadá, 1993; ATSDR, 1995).

Neste estudo foi utilizado naftaleno proveniente da Merck[®], com 99% de pureza.

3.3. Solvente

O naftaleno é constituído unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, e estes compostos apresentam baixa solubilidade em água (Johnsen *et al.*, 2005). Portanto, se fez necessário a utilização de um solvente para facilitar sua diluição.

De acordo com informações contidas no catálogo da Merck® (1968), são necessários treze mililitros de metanol absoluto para diluir um grama de naftaleno. Para isso, a quantidade necessária de naftaleno-metanol foi calculada para a obtenção de cada concentração experimental desejada, de acordo com o volume de água necessário em cada experimento.

3.4. Ensaios de Efeito Crônico

3.4.1. Ensaio crônico com a microalga *Dunaliella tertiolecta*

Os ensaios com *Dunaliella tertiolecta* seguiram a norma ABNT NBR 12648 (2011), com adaptações para microalga marinha, substituindo uma espécie de água doce como indicada na norma e, conseqüentemente, o meio de cultura. Este método consiste na exposição da microalga em diferentes concentrações de uma substância tóxica, durante um período de 72 h ou 96 h e na determinação da inibição do crescimento da biomassa algácea em relação ao controle, sob as mesmas condições de ensaio.

Antes da realização dos ensaios, toda a vidraria utilizada foi esterilizada em autoclave ELETROLAB® a 121 °C durante 40 minutos e o material não autoclavável, foi exposto à luz ultravioleta germicida, com potência de 30 W, LIGHT EXPRESS®, durante 6 horas.

A água do mar foi coletada em mar aberto, proveniente de locais isentos de influência direta de poluição, filtrada em filtro Millipore com poros de HA 0,22 µm e esterilizada nas mesmas condições das vidrarias. A salinidade inicial foi ajustada em 36 ± 1 com adição de água destilada e medida com um refratômetro manual da marca ATAGO® S/Mill-E.

O preparo do meio de cultura, denominado meio de cultura semidefinido *Guillard "f/2"*, foi preparado acrescentado à água do mar esterilizada, vitaminas

(tiamina, biotina, vitamina B12), fosfato de sódio monobásico, nitrato de sódio, meta silicato de sódio, metais traço (zinco, cobre, cobalto, manganês, molibdato, ferro). O pH foi medido com fitas indicadoras da Merck® e os valores iniciais foram mantidos entre 7,0 e 8,0 de pH. A salinidade inicial foi ajustada com água destilada ou cloreto de sódio (NaCl) para 36 ± 1 com auxílio de um refratômetro manual ATAGO®.

Uma cultura-estoque foi iniciada três dias antes do início dos ensaios para a obtenção de células de *D. tertiolecta* em fase exponencial. Em um erlenmeyer foi adicionado 50 mL de meio de cultura e acrescentado um volume que continha 10^4 cél/mL de *D. tertiolecta*. A cultura-estoque foi incubada durante três dias em temperatura controlada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com iluminação contínua, mantido em uma incubadora refrigerada com agitação a 150 rpm da marca TECNAL®. O resumo das condições para a realização do ensaio crônico com *D. tertiolecta* está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos com a microalga *Dunaliella tertiolecta*.

Requisitos	Condições
Tipo de ensaio	Estático
Diluyente	Meio de cultura <i>Guillard</i> "f/2
Inóculo	Fase exponencial de 3 dias
Número de diluições	Cinco, mais o controle
Número de réplicas	Quatro replicas
Temperatura	$24 \pm 1^\circ\text{C}$
Iluminação	Contínua, maior que 4500 lux
Velocidade de agitação	150 rpm
Método de expressão dos resultados	CI e porcentagem de inibição
Efeito observado	Inibição da dendencia celular

Fonte: ABNT NBR 12648. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica- Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*) (2011).

No dia do início dos ensaios, uma alíquota de 1 mL foi retirada da cultura-estoque e fixada com solução Lugol para o cálculo da densidade celular. Este cálculo foi realizado com o auxílio de uma câmara de contagem do tipo Fuchs-Rosenthal (Figura 10) e a contagem realizada em um microscópio

óptico Leica®DMLS em aumento de 100 x. A densidade celular (cél/mL) foi calculada pela seguinte fórmula (ASTM 1218, 1992):

$$d = x / V$$

sendo

d a densidade celular (cél/mL);

x o número de células contadas (cél);

V o volume de da área contada (mL).

Figura 10. Células de *D. tertiolecta* observadas em uma fração da câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal (magnificação 100 x) (Fotografia de Cláudia Camila Minei).

O volume de inóculo da cultura-estoque a ser adicionado em cada frasco-teste, foi calculado e adicionado aproximadamente 3×10^5 cel/mL (ABNT, 2011). Os recipientes-teste utilizados foram tubos de ensaio com rosca com capacidade de 15 mL. Foi acrescentado nestes frascos 10 mL de meio de cultura, o inóculo com aproximadamente 3×10^5 cel/mL e as diferentes concentrações de naftaleno e metanol. Assim, o ensaio estático teve o período de exposição de 96 horas.

As concentrações nominais de naftaleno utilizadas nos cinco ensaios com quatro réplicas em cada concentração foram: 6,25 mg.L⁻¹; 12,5 mg.L⁻¹; 25 mg.L⁻¹; 50 mg.L⁻¹; 75 mg.L⁻¹, com seis ensaios e quatro réplicas. Foi realizado um controle com adição do solvente metanol e outro controle somente com meio de cultura Guillard “f/2” preparado com água do mar filtrada e esterilizada e as microalgas. Em cada ensaio foram analisadas as condições

físicas e químicas como pH e salinidade, no início e no final do período de exposição.

Para validação do ensaio, a norma ABNT NBR 12648 (2011) sugere que ao término das 96 horas de ensaio, o crescimento da biomassa algácea média do controle deva ser 100 vezes maior que o número inicial de células.

3.4.1.1. Curva de crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*

No período de 10 dias, foi determinada a taxa de crescimento diário da microalga marinha. Este ensaio foi realizado para assegurar o período de crescimento exponencial de *D. tertiolecta* e definir o início dos ensaios ecotoxicológicos.

Em um erlenmeyer foram adicionados 150 mL de meio de cultura e acrescentado aproximadamente 3×10^5 cel/mL de *D. tertiolecta*, nas mesmas condições dos ensaios ecotoxicológicos, em temperatura controlada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com iluminação contínua, agitação em 150 rpm, monitorado por uma incubadora refrigerada com agitação da marca TECNAL®.

O crescimento celular diário foi obtido pelo método de determinação da densidade celular a cada 24 horas, durante 10 dias, em um total de três ensaios.

3.4.1.2. Efeito algicida / algistático

Para verificar a ocorrência de efeito algicida ou algistático foi utilizado o método de coloração das células ABNT NBR 12648 (2011).

Imediatamente após o encerramento do ensaio ecotoxicológico, ainda dentro das 96 h, foi retirada uma alíquota de 1 mL da suspensão algácea de cada réplica, dos controles e da menor concentração nominal onde ocorreu inibição do crescimento significativamente diferente do controle. As quatro alíquotas do controle foram misturadas e então subdivididas em duas porções. Em uma das porções foram adicionados 0,5 mL de formol, e nas duas porções 0,5 mL de uma solução 0,1% (m/v) de corante azul de Evans.

As três alíquotas da menor concentração nominal onde ocorreu inibição foram homogeneizadas e também adicionados 0,5 mL de uma solução 0,1% (m/v) de corante azul de Evans.

O material foi examinado após 10 minutos e o efeito foi classificado como algicida, quando a totalidade das células se apresentou coradas em azul, e algistático quando a maioria das células não se corou.

3.4.2. Ensaio crônico com embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

O método de ensaio com embriões de ouriço-do-mar seguiu a norma da ABNT NBR 15350 (2011) que consiste na exposição de ovos recém fertilizados de *Lytechinus variegatus* em diferentes concentrações de uma substância tóxica, durante o período de desenvolvimento embrionário, que ocorre em aproximadamente 24 h à 28 h. Ao final deste período as amostras foram fixadas e o número de larvas normais ou afetadas foram contadas sob microscópio óptico Leica®DMLS com aumento de 100 x.

Exemplares adultos de ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus*, foram coletados em costões rochosos, na região do infralitoral de uma das praias de Ubatuba-SP, caracterizada por uma região de baixo impacto antrópico. A boa qualidade da água nas proximidades do local da coleta foram motivos para a escolha deste ponto, pois, segundo a Environment Canadá (1992), os organismos devem ser oriundos de regiões isentas de poluição.

Segundo a ABNT NBR 15350 (2011), para minimizar a quantidade de organismos imaturos sexualmente, a insuficiência de gametas necessários para o ensaio ou haver algum problema morfológico nos gametas, utilizamos no mínimo três indivíduos de cada sexo. A liberação dos gametas foi induzida através da injeção de 3 mL a 5 mL de solução de KCL a 0,5 M distribuindo metade em cada lado oposto da membrana perioral. A liberação dos gametas ocorreu através dos cinco gonóporos localizados na superfície aboral, a desova apresentando coloração alaranjada e aspecto granuloso e o esperma coloração esbranquiçada e aspecto leitoso. Os óvulos foram coletados colocando os organismos com a face aboral voltada para um recipiente com água do mar

filtrada em filtro Millipore® HA 0,45 µm. A salinidade da água do mar foi medida com auxílio de um refratômetro manual ATAGO® S/Mill-E e o pH com fita marcadora universal de pH da Merck®.

Antes da fecundação, os óvulos foram observados em microscópio óptico e foram considerados saudáveis quando apresentaram formas lisas e arredondadas. Os óvulos coletados foram peneirados em uma malha de 350 µm e colocados em um recipiente com capacidade de 1000 mL, contendo 600 mL de água do mar filtrada, sendo lavados por três vezes pela troca parcial de água após a decantação dos mesmos. Os espermatozoides após serem coletados com auxílio de uma pipeta Pasteur foram colocados em um pequeno recipiente com capacidade de 50 mL e mantidos em gelo em um isopor até o momento da fecundação.

Ainda seguindo o método ABNT NBR 15350 (2011) foram diluídos 0,5 mL do líquido espermático em 24,5 mL de água do mar filtrada e 1 mL desta solução foi adicionada ao recipiente contendo os óvulos para fecundação.

Após a adição da solução de esperma, os óvulos fecundados (ovos), foram reconhecidos facilmente pela presença de uma membrana de fecundação, visível ao microscópio com aumento de 100 x (Figura 11). Com o auxílio de uma lâmina de Sedgewick Rafter foi verificada a taxa de fecundação, que deveria estar acima de 80%. Em seguida, foi feito o cálculo da concentração de ovos na solução e o volume que deveria ser adicionado em cada tubo de ensaio. Foram realizadas três contagens com as amostras diluídas na razão de 1/100 para estimar a concentração dos ovos (ovos/mL).

Figura 11. Ovos de *Lytechinus variegatus* (magnificação 400 x) (Fotografia em HDR de Eduardo Masami Kitahara).

Foram realizados cinco ensaios com quatro réplicas nas concentrações nominais: 0,04 mg.L⁻¹; 0,09 mg.L⁻¹; 0,18 mg.L⁻¹; 0,37 mg.L⁻¹; 0,75 mg.L⁻¹; 1,5 mg.L⁻¹ de naftaleno, um grupo controle com água do mar filtrada e outro grupo controle com a mesma proporção de solvente metanol.

Em cada recipiente-teste com rosca, contendo 10 mL de solução de água do mar filtrada e as diferentes concentrações de naftaleno e metanol, foram acrescentados aproximadamente 400 ovos. Estes foram incubados durante 24 horas a 24 ± 1°C, com fotoperíodo natural. Após este período de 24 horas observou-se as larvas *pluteus* do controle no microscópio óptico para verificar o bom desenvolvimento dos embriões, ou seja, o comprimento do braço igual ou superior ao do corpo em 80% dos embriões. Atingindo este resultado, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para outro recipiente devidamente identificado contendo 0,5 mL de formol a 40% tamponado com bórax.

Foram examinados 100 indivíduos de cada réplica e o estágio larval *pluteus* desenvolvido foi caracterizado como padrão de normalidade (Figura 12).

Figura 12. Larva pluteus de *L. variegatus* com desenvolvimento normal (magnificação 400 x). (Fotografia em HDR de Eduardo Masami Kitahara).

Qualquer alteração da larva pluteus foi interpretada como organismo afetado, tais como, desenvolvimento retardado, má formação do esqueleto e

exogástrula. O resumo dos requisitos para a realização do ensaio crônico com *Lytechinus variegatus* está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos com *Lytechinus variegatus*.

Requisitos	Condições
Tipo de ensaio	Estático
Temperatura	24 ± 1°C
Duração do ensaio	24 h
Salinidade	36 unidades
Luz	Usual em laboratório
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz
Recipiente-teste	Frasco com capacidade para 15 mL
Número de diluições	Cinco, mais o controle
Número de organismos por réplicas	40 organismos por mL
Efeito observado	Anormalidade no desenvolvimento embriolarval
Validação do ensaio	Mínimo 80 % de larvas <i>pluteus</i> normais no controle

Fonte: ABNT NBR 15350. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração. Método de ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata: Echinoidea*) (2011).

3.4.3. Ensaio crônico com o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp

Os ensaios de efeito crônico com exemplares de *Nitokra* sp foram realizados segundo o método proposto por Lotufo e Abessa (2002), utilizando fêmeas adultas ovadas para avaliação da taxa de eclosão dos ovos (reprodução) dos organismos expostos.

Inicialmente a água reconstituída foi preparada para a realização das soluções-teste. O preparo consistiu na dissolução de sal marinho em água deionizada obtendo 20 ± 2 de salinidade com auxílio de um refratômetro manual ATAGO® e com a fita marcadora universal de pH da Merck® foi possível verificar o pH no início e final do ensaios.

Para a realização dos ensaios crônicos com *Nitokra* sp foram separadas somente fêmeas ovadas cultivadas em laboratório. As fêmeas ovadas foram selecionadas sob estereomicroscópio Nikon®SMZ com aumento de 20 x e auxílio de uma pipeta Pasteur.

Os ensaios foram conduzidos em placas de Petri de vidro com capacidade para 20 mL com tampa, acrescentado 10 mL da solução-teste, contendo água reconstituída e as diferentes concentrações de naftaleno, metanol e 10 fêmeas ovadas em cada placa. O ensaio, mantido em sala climatizada com temperatura de aproximadamente $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, teve duração de 96 h e fotoperíodo natural.

Foram realizados cinco ensaios com quatro réplicas nas concentrações nominais: $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$; 1 mg.L^{-1} e 2 mg.L^{-1} , dois grupos controles, um com água reconstituída e outro com a mesma proporção de solvente metanol, para diluição do naftaleno. Ao final dos ensaios, o conteúdo dos recipientes-teste foi corado uma solução de rosa de bengala e formol a 4% e transferidos para frascos com tampa devidamente identificados e observado o número de náuplios e adultos, em estereomicroscópico para o cálculo da taxa de eclosão de ovos em cada concentração testada. Durante o ensaio os organismos não foram alimentados.

O efeito tóxico utilizado neste ensaio foi a sobrevivência das fêmeas ovadas e o sucesso da eclosão dos ovos. A taxa média de eclosão dos ovos foi calculada pela soma do número total de náuplios dividido pelo número de fêmeas em cada recipiente- teste. O resumo dos requisitos para a realização do ensaio crônico com *Nitokra* sp está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos crônicos com *Nitokra* sp.

Requisitos	Condições
Tipo de ensaio	Estático
Organismo-teste	Exemplares de fêmeas ovadas
Temperatura	$23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Duração do ensaio	96 horas
Água de diluição	Água reconstituída
Salinidade	20 ± 2
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz natural
Número de diluição	Cinco, mais o controle
Número de réplicas	Quatro réplicas
Número de organismos por réplica	Dez organismos
Efeito observado	Eclosão dos ovos

Fonte: Lotufo & Abessa. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos (2002).

Para a validação dos resultados os autores Lotufo & Abessa (2002) sugerem que se ao final dos ensaios, a porcentagem de mortalidade das fêmeas adultas no controle não deva ser superior a 70%, também se não houver a eclosão de ovos no controle, o ensaio deverá ser desprezado.

3.5. Ensaios de Efeito Agudo

3.5.1. Ensaio agudo com o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp

O ensaio de efeito agudo com copépodos seguiu a norma técnica ISO 14669 (1999), que consiste na exposição de indivíduos adultos do gênero *Nitokra* sp a uma substância tóxica por 96 horas, para determinação da CL₅₀.

Inicialmente a água reconstituída foi preparada para ser utilizada nas soluções-teste. O preparo consistiu em dissolver sal em água destilada obtendo 20 ± 2 de salinidade com auxílio de um refratômetro manual ATAGO® e com a fita marcadora universal de pH da Merck® foi possível verificar o pH no início e final do ensaios.

Para a realização dos ensaios agudos com *Nitokra* sp foram utilizados indivíduos adultos cultivados em laboratório, excluindo fêmeas ovadas, copepoditos e náuplios. Os indivíduos adultos foram selecionadas sob estereoscópio Nikon®SMZ com aumento de 20 x e auxílio de uma pipeta Pasteur.

Os ensaios foram conduzidos em placas de Petri de vidro com capacidade de 20 mL com tampa, acrescentado 10 mL da solução-teste, contendo água reconstituída e as diferentes concentrações de naftaleno e metanol e 10 indivíduos adultos em cada placa. O ensaio mantido em sala climatizada com temperatura de aproximadamente $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, teve duração de 96 h e fotoperíodo natural. Ao final dos ensaios, o número de copépodos vivos foi contado em estereoscópio óptico. Durante o ensaio estático os organismos-teste não foram alimentados.

Foram realizados cinco ensaios de efeito agudo com quatro réplicas nas concentrações nominais: 2,5 mg.L⁻¹; 5,0 mg.L⁻¹; 10 mg.L⁻¹; 20 mg.L⁻¹; 40 mg.L⁻¹, um grupo controle com água reconstituída e outro grupo controle com a mesma

proporção de solvente metanol. O resumo dos requisitos para a realização do ensaio agudo com *Nitokra* sp está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Resumo das condições para realização dos ensaios ecotoxicológicos agudos com *Nitokra* sp.

Requisitos	Condições
Tipo de ensaio	Estático
Idade do organismo-teste	Exemplares adultos exceto fêmeas ovadas
Temperatura	23 °C
Duração do ensaio	96 horas
Água de diluição	Água reconstituída
Salinidade	20 ± 2 unidades
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz natural
Número de diluição	Cinco, mais o controle
Número de réplicas	Quatro réplicas
Número de organismos por réplica	Dez organismos
Efeito observado	Letalidade dos organismos

Fonte: ISO 14669. Determinação de toxicidade aguda para copépodos marinhos (*Copepoda*, *Crustacea*) (1999).

Para a validação dos resultados a norma ISO 14669 (1999) sugere que ao final dos ensaios, a porcentagem de letalidade de indivíduos adultos no controle não exceda 10%.

3.5.2. Ensaio agudo com o anfípodo estuarino bentônico *Leptocheirus plumulosus*

O ensaio de efeito agudo com a amostra líquida em anfípodos seguiu a norma técnica ABNT NBR 15638 (2008), que consiste na exposição de exemplares jovens de *Leptocheirus plumulosus*, com tamanho aproximado entre 0,5 mm a 0,7 mm, a uma substância tóxica, durante 96 horas, para determinação da CL50.

Inicialmente a água reconstituída foi preparada para ser utilizada nas soluções-teste. O preparo consistiu em dissolver sal em água destilada obtendo 20 ± 2 de salinidade com auxílio de um refratômetro manual ATAGO® e com a fita marcadora universal de pH da Merck® foi possível verificar o pH no início e final do ensaios.

Para a realização dos ensaios agudos com *Leptocheirus plumulosus* foram separados apenas indivíduos jovens do cultivo, excluindo fêmeas ovadas, indivíduos adultos e neonatos. Os indivíduos jovens foram selecionados em peneira com abertura de malha de 0,5 mm e separados sob estereomicroscópio Nikon®SMZ com aumento de 20 x e auxílio de uma pipeta Pasteur.

Os ensaios foram conduzidos em recipientes com capacidade para 500 mL, acrescentando 450 mL da solução-teste, contendo água reconstituída, as diferentes concentrações de naftaleno e metanol e 20 indivíduos jovens em cada recipiente tampado com plástico filme. O ensaio, mantido em sala climatizada com temperatura de aproximadamente $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, teve duração de 96 h e fotoperíodo natural. Ao final dos ensaios, o número de anfípodos vivos foi contado em estereomicroscópio óptico. Durante o ensaio estático os organismos-teste não foram alimentados. O resumo dos requisitos para a realização do ensaio agudo com anfípodos está representado na Tabela 6.

Tabela 6. Resumo das condições para realização dos ensaios de toxicidade com *Leptocheirus plumulosus*.

Requisitos	Condições
Tipo de ensaio	Estático
Idade do organismo-teste	Organismos juvenis com em média 0,50 mm
Temperatura	24°C
Duração do ensaio	96 horas
Água de diluição	Água reconstituída
Salinidade	20 ± 2 unidades
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz natural
Número de diluição	Cinco, mais o controle
Número de réplicas	Quatro réplicas
Número de organismos por réplica	Vinte organismos
Efeito observado	Letalidade dos organismos

Fonte: ABNT NBR 15638. Ecotoxicologia aquática – Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarino com anfípodos (2008).

Foram realizados cinco ensaios com quatro réplicas nas concentrações nominais: $0,62 \text{ mg.L}^{-1}$; $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$; 5 mg.L^{-1} ; 10 mg.L^{-1} de naftaleno, um grupo controle com água reconstituída e outro grupo controle com a mesma proporção de solvente metanol.

Para a validação dos resultados a norma ABNT NBR 15638 (2008) sugere que ao final dos ensaios, a porcentagem média de sobrevivência dos organismos no controle deva ser superior ou igual a 80%.

3.6. Substância de Referência

A substância utilizada como referência é uma substância química conhecida, denominada de controle positivo, realizada paralelamente aos ensaios ecotoxicológicos com objetivo de avaliar a sensibilidade do lote de organismos-teste, sejam eles oriundos de campo ou cultivados em laboratório, mediante a utilização de uma série de múltiplas concentrações desta substância (Zagatto, 2006). Representam assim, um meio de identificar alterações nos organismos-teste e de avaliar a precisão da reprodutibilidade destes ensaios (Environment Canada, 1990).

Diversas substâncias de origem orgânica e inorgânica são frequentemente utilizadas como substâncias de referência, como por exemplo, dodecil sulfato de sódio (DSS), dicromato de potássio, sulfato de zinco e cloreto de cádmio, tem sido utilizadas como substâncias de referência para as várias espécies de organismos utilizados em ensaios ecotoxicológicos (CETESB, 1990; ASTM, 1992; Environment Canada, 1992; Nipper *et al.*, 1993). Segundo (ABNT, 2011) a escolha da substância de referencia deve ser realizada com critério, levando em conta potenciais riscos à saúde humana e ao ambiente.

O DSS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) é um surfactante aniônico de cadeia linear. Compostos orgânicos com surfactantes como princípio ativo são capazes de reduzir a tensão superficial da água, facilitando seu contato com os objetos a serem limpos (Barbieri *et al.*, 2000). Em grande quantidade, pode enfraquecer estruturas de proteção dos organismos, tornando-os vulneráveis, com a alteração da permeabilidade de sua membrana a nutrientes e substâncias químicas, devido à desnaturação de proteínas da parede celular (Lewis, 1990).

Visando menor impacto ambiental no descarte, foi utilizado como substância de referência o DSS da marca J. BACKER® (p.a.), por ser um surfactante de alta capacidade de degradação. Desse modo, as concentrações nominais de DSS para cada ensaio foram as seguintes:

- Ensaio de efeito crônico com a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*: 0,3; 0,6; 1,2; 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de DSS.
- Ensaio de efeito crônico com embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*: 0,32; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de DSS.
- Ensaio de efeito crônico e agudo com copépodo estuarino *Nitokra* sp: 4; 6,0; 8,0; 10 e 12 mg.L⁻¹ de DSS.
- Ensaio de efeito agudo com anfípodo estuarino *Leptocheirus plumulosus*: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ de DSS.

Após realização dos ensaios com a substância de referência, foram elaboradas cartas–controle com os valores da CL, CE ou CI de cada ensaio. Recomenda-se a realização do ensaio de sensibilidade pelo menos uma vez por mês, para avaliação do cultivo. Neste estudo os ensaios foram realizados em paralelo.

3.7. Análise de Espectrofotometria de Ultravioleta

A volatilidade dos compostos aromáticos diminui com o aumento do peso molecular e, conseqüentemente, compostos aromáticos de pesos moleculares mais baixos são mais voláteis (Netto *et al.*, 2000). Para isso, faz-se necessário quantificar a taxa de evaporação do naftaleno durante o período experimental dos ensaios ecotoxicológicos.

Através do método descrito por Neff & Anderson (1975), foi quantificada a taxa de evaporação do naftaleno durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, determinada por espectrofotometria de ultravioleta.

Foram preparadas soluções de naftaleno em água do mar filtrada em papel filtro Millipore® HA 0,45 µm, nas concentrações nominais 0,05 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 1,5 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹ e 75 mg.L⁻¹ de naftaleno e solvente metanol.

Em um funil de separação com capacidade de 50 mL foram adicionados separadamente 25 mL de cada concentração de naftaleno, 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado e 10 mL de n-hexano. A solução imiscível foi separada e a alíquota da parte superior do funil de separação foi colocada em uma cubeta de quartzo com 1 cm de trajeto óptico, pré-lavada com n-hexano. A taxa de

evaporação do naftaleno foi analisada através de um espectrofotômetro Cintra® UV-Visible Spectrometer, com a absorbância de luz ultravioleta em comprimento de onda 221 nm. A temperatura da câmara foi mantida em 20 ± 0,1°C com auxílio de GBC Thermocell.

As soluções restantes de naftaleno foram acondicionadas em tubos de vidro e mantidas na temperatura de 23 °C, fotoperíodo natural. A taxa de evaporação foi verificada seguindo o mesmo método, após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h.

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o software BioEstat® 5.0 empregando o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para verificar a homogeneidade dos dados e a aplicação da correlação linear de Pearson.

3.8. Expressão de Resultados e Cálculos Estatísticos

Em função dos dados experimentais, as respostas mais severas são geralmente caracterizadas por efeitos agudos e ocorrem em concentrações mais elevadas de substância tóxica, enquanto as menos severas são caracterizadas com efeitos crônicos em menores concentrações.

Para ensaios de efeito crônico com *Dunaliella tertiolecta* foi estabelecida a CI₅₀ (concentração de inibição), concentração que causou inibição de 50% das células algáceas, após um período de exposição de 96 horas com auxílio do programa Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1997), através do programa BANAL®.

O cálculo da porcentagem de inibição no crescimento de *D. tertiolecta* se deu pela seguinte fórmula (ASTM 1218, 1992):

$$I = (k_1 - k_2) 100 / k_1$$

sendo

I a porcentagem de inibição (%);

k₁ a taxa de crescimento (duplicação/dia) do controle;

k₂ a taxa de crescimento (duplicação/dia) da amostra.

Nos ensaios de efeito crônico com embriões de *Lytechinus variegatus*, foram estabelecidas as concentrações de CENO (concentração de efeito não observado), representada pela maior concentração do agente tóxico que não causa efeito significativo ao organismo-teste em relação ao controle, e a CEO (concentração de efeito observado), menor concentração do agente tóxico que causa efeito significativo ao organismo-teste e a CE₅₀ que indica a concentração capaz de causar efeitos deletérios em 50% dos organismos.

A identificação de diferenças significativas entre o controle e as concentrações testadas foi realizada de acordo com o método proposto pela EPA (2002) e a ABNT, com o auxílio do programa TOXSTAT[®] versão 3.5. Os resultados de toxicidade foram submetidos ao teste de normalidade dos dados através do método Chi-quadrado e a avaliação de homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Para os dados identificados como homogêneos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e posteriormente através do teste Dunett, foram identificadas as concentrações que apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

A partir do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (com correção de Abott), foi estimada a CE₅₀, com intervalo de confiança de 95%.

Nos ensaios de efeito crônico com *Nitokra* sp, a taxa de eclosão de ovos obtida em cada concentração testada foram comparados por meio da análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey e pelo teste “T”, contidos no pacote estatístico TOXSTAT[®] versão 3.4, avaliando o sucesso de eclosão dos ovos.

Em ensaios com toxicidade aguda, geralmente, estima-se a concentração da substância-teste que pode variar em 24, 48, 72 a 96 horas. Estas concentrações podem corresponder a CL₅₀ (concentração letal), obtida a partir de dados quantais (dicotômicos, binomiais, binários), como número de vivos e de mortos (Gelber *et al.*, 1985). Nos ensaios para avaliação do efeito agudo com *Nitokra* sp e *Leptocheirus plumulosus*, foi avaliada inicialmente a normalidade dos dados através do teste Chi-quadrado e então estabelecida a CL₅₀ que causa efeito deletério em 50% da população durante um tempo estipulado através do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber.

3.9. Descarte do naftaleno

Para o descarte das soluções-teste contendo naftaleno, foi utilizado como referência o guia de gerenciamento de resíduos químicos perigosos (Amour, 1996).

Em uma capela, com uso de luvas de borracha nitrílica, óculos de proteção e avental, foi despejada a solução contendo naftaleno em um bécker grande. Foi estimado o peso do naftaleno e, para cada grama deste composto orgânico foi adicionado 100 mL de 3 M de ácido sulfúrico, (totalizando 17 mL de ácido sulfúrico em 83 mL de água) e 6 g de permanganato de potássio. Após de 48 horas, foi acrescentado bissulfito de sódio até a solução se tornar incolor. A mistura foi neutralizada com hidróxido de sódio aquoso 5% e finalmente descartada.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados seguiram os pré-requisitos de validação dos ensaios de sensibilidade e controle positivo com o solvente metanol (Teste *t* - *Student*) em todos os tratamentos. Os valores das análises físicas e químicas de pH e salinidade, mantiveram-se estáveis dentro dos limites de tolerância para cada espécie durante o início e final dos ensaios e estão expressos nos Anexos 1, 2, 3, 4 e 5. Para os ensaios crônicos com *Dunaliella tertiolecta* e *Lytechinus variegatus* os valores de pH no início e final dos ensaios não sofreram variações e mantiveram-se no pH 8. Do mesmo modo, a salinidade com ambas as espécies não tiveram diferenças entre o início dos ensaios e final dos ensaios, mantendo a salinidade em 35 e 36 unidades. Nos ensaios com *Nitokra* sp e *Leptocheirus plumulosus* o pH se manteve em 7, sem modificações entre os ensaios iniciais e finais. A salinidade apresentou o mesmo padrão variando o valor de 20 a 22 unidades, porém sem diferenciação entre os valores iniciais e finais.

Nos cinco primeiros ensaios realizados, foi utilizado como solvente do naftaleno, o Dimetilsulfóxido (DMSO) Merck®. A partir da solução 0,001% de DMSO em água salina, foram feitas as diluições para realização do ensaio (Pacheco & Santos, 2002). Os cristais de naftaleno não se dissolveram totalmente precipitando-se no fundo dos recipientes, portanto, se fez necessário empregar outro solvente para diluição total do composto. A partir deste ponto, em todos os ensaios considerados neste trabalho, foi utilizado o metanol como solvente.

Em todos os ensaios foram realizados um controle com o solvente metanol, denominado controle solvente e um controle branco, contendo somente água, denominado controle branco. Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos do metanol nos organismos-teste, foi avaliada a diferença significativa entre ambos os controles com auxílio dos testes estatísticos (Teste *t* - *Student*, $p \leq 0,05$). Provavelmente, devido à baixa quantidade de metanol nas soluções-teste de cada ensaio, não houve diferença significativa. Assim, foi expresso como controle nos gráficos, o controle solvente.

4.1. Ensaio com a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*

4.1.1. Curva de crescimento

Durante o período de 10 dias, diariamente, foi avaliado o crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*, representada na Tabela 5.

Tabela 7. Crescimento celular diário de *Dunaliella tertiolecta* durante os 10 dias de cultivo, determinada pela densidade celular (cél.mL⁻¹), com sua respectiva média e desvio padrão de cada ensaio.

Ensaio	Réplica	Tempo (Dias)					
		0	1	2	3	4	5
Fase exponencial							
Ensaio 1	R1	8772	8035000	47120000	59960000	74560000	69210000
	R2	4251	7935000	28060000	45200000	65400000	58450000
	R3	5842	2950000	51052000	76750000	76910000	70750000
Ensaio 2	R1	7398	8850000	39270000	78210000	58900000	77700000
	R2	4170	9910000	13125000	40680000	64230000	91075000
	R3	5061	9745000	35186000	61320000	82940000	87400000
Ensaio 3	R1	8765	8110000	47012000	55890000	73910000	62350000
	R2	5975	8990000	17123000	68180000	79560000	81165000
	R3	6162	7010000	20850000	72670000	68670000	61177500
Média		6266,2	7948333,3	33199777,8	62095555,6	71675555,6	73253055,6
Desvio Padrão		1731,6	2087817,3	14073194,4	13280739,0	7880604,5	11761003,5
Ensaio	Réplica	Tempo (Dias)					
		6	7	8	9	10	
Fase estacionária							
Ensaio 1	R1	63300000	63087500	62882500	52917500	51777500	
	R2	62875000	72587500	72692500	53040000	41890000	
	R3	53785000	92865000	42712500	72382500	51667500	
Ensaio 2	R1	73590000	64010000	64000625	64170000	51327500	
	R2	63070000	64240000	64830000	64050000	55585000	
	R3	64600000	73470000	74580000	63750000	51327500	
Ensaio 3	R1	62220000	52087500	61470000	51880000	63043750	
	R2	82150000	61920000	61280000	51850000	62468750	
	R3	91622500	51010000	73600000	71035000	66525000	
Média		68579166,7	66141944,4	64227569,4	60563888,9	55068055,6	
Desvio Padrão		11758876,2	12605492,2	9670086,1	8299472,9	7696971,7	

A média obtida em três ensaios apresentou uma fase exponencial nos primeiros dias, desde a adição do inóculo que se manteve em significativo crescimento celular até o quarto dia. A partir do quinto dia, o crescimento celular se estabilizou e as células mantiveram-se em desenvolvimento regular até o décimo dia, garantindo assim, células em fase exponencial no início dos ensaios, como requerido na norma ABNT NBR 12648 (2011).

A partir destes resultados foi possível construir uma curva de crescimento de *Dunaliella tertiolecta*, apresentada na Figura 13.

Figura 13. Curva de crescimento de *Dunaliella tertiolecta* obtida em 10 dias de cultivo.

Neste gráfico é possível observar as fases de crescimento exponencial e estacionária obtidas nas condições de cultivo.

4.1.2. Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito crônico em *Dunaliella tertiolecta*

Os resultados apresentados foram obtidos através de ensaios ecotoxicológicos preliminares que definiram as concentrações dos ensaios definitivos. Com o objetivo de se estabelecer o intervalo de concentrações com naftaleno, foram realizados ensaios preliminares nas seguintes concentrações nominais:

- 100; 200; 300; 400 e 500 mg.L⁻¹ de naftaleno
- 5; 10; 20; 30 e 40 mg.L⁻¹ de naftaleno
- 1,5; 3,12; 6,25; 12; 25 mg.L⁻¹ de naftaleno

Os resultados dos ensaios definitivos com *Dunaliella tertiolecta* ao naftaleno após 96h de exposição foram expressos por densidade celular e estão na Tabela 8 e Figura 14.

Tabela 8. Crescimento celular de *Dunaliella tertiolecta* após 96h horas de exposição ao naftaleno, média e desvio padrão (DP) por densidade celular (cél.mL⁻¹).

Ensaio	Réplica	N° inicial	Controle Branco	Controle Solvente	Naftaleno (mg.L ⁻¹)				
					6,25	12,5	25	50	75
Ensaio 1	1	8764	51000	535000	305000	235000	120000	25000	10000
	2	5321	745000	850000	425000	290000	135000	35000	5000
	3	5947	610000	550000	370000	260000	210000	10000	15000
	4	7199	520000	505000	325000	220000	125000	40000	10000
	Média	6808	481500	610000	356250	251250	147500	27500	10000
	DP	1520	301528	161090	53288	30653	42131	13229	4082
Ensaio 2	1	10937	825000	760000	175000	170000	240000	270000	11000
	2	9687	955000	855000	900000	310000	4500	155000	205000
	3	9375	870000	935299	360000	155000	320000	5000	5000
	4	5312	915000	825000	130000	455000	165000	10000	5000
	Média	8828	891250	843825	391250	272500	182375	110000	56500
	DP	2439	56181	72740	353468	140268	134416	127345	99040
Ensaio 3	1	4375	540000	470000	495000	270000	70000	10000	5000
	2	5312	604000	840000	405000	310000	75000	5000	5000
	3	8125	770000	750000	335000	205000	80000	15000	5000
	4	8937	520000	585000	410000	200000	130000	5000	5000
	Média	6687	608500	661250	411250	246250	88750	8750	5000
	DP	2188	113471	165548	65495	53131	27801	4787	0
Ensaio 4	1	6562	960000	540000	505000	335000	155000	10000	10000
	2	5000	520000	535000	480000	205000	140000	30000	10000
	3	4375	475000	560000	330000	290000	110000	15000	5000
	4	6250	515000	665000	460000	210000	200000	10000	5000
	Média	5547	617500	575000	443750	260000	151250	16250	7500
	DP	1032	229220	60964	78036	63377	37500	9465	2887
Ensaio 5	1	7500	555000	725000	375000	145000	100000	5000	5000
	2	6562	485000	445000	360000	240000	120000	5000	5000
	3	5312	725000	635000	270000	260000	85000	5000	5000
	4	8750	545000	840000	435000	240000	60000	5000	5000
	Média	7031	577500	661250	360000	221250	91250	5000	5000
	DP	1455	103078	166802	68191	51700	25290	0	0
Ensaio 6	1	3250	360000	420000	360000	230000	60000	335000	60000
	2	4500	325000	350000	210000	210000	230000	5000	165000
	3	3256	435000	410000	125000	475000	105000	25000	125000
	4	5670	510000	470000	310000	230000	155000	5000	30000
	Média	4169	407500	412500	251250	286250	137500	92500	95000
	DP	1161	82310	49244	104752	126186	72858	161941	61237

Após 96 horas de exposição, o número médio de células no controle foi 100 vezes maior que o número de células iniciais, adicionadas no início dos ensaios.

Figura 14. Taxa média de crescimento de *Dunaliella tertiolecta* após 96 horas de exposição ao naftaleno obtida por densidade celular.

A partir dos resultados obtidos no crescimento celular após 96 horas de exposição ao naftaleno foram calculadas as taxas de inibição (Tabela 9).

Tabela 9. Taxa média (%) de inibição de *Dunaliella tertiolecta* após 96h de exposição ao naftaleno (mg.L^{-1}) obtida por densidade celular.

Taxa de inibição (%) de <i>D. tertiolecta</i> ao naftaleno					
Ensaio	Naftaleno (mg.L^{-1})				
	6,25	12,5	25	50	75
Ensaio 1	12%	19%	32%	71%	100%
Ensaio 2	24%	27%	38%	68%	88%
Ensaio 3	7%	21%	54%	97%	100%
Ensaio 4	7%	18%	40%	79%	94%
Ensaio 5	12%	23%	43%	100%	100%
Ensaio 6	12%	8%	26%	64%	36%

Em presença de naftaleno houve inibição do crescimento celular de *D. tertiolecta* em todos os tratamentos, em relação ao grupo controle. Nas menores concentrações testadas 6,25 mg.L⁻¹ e 12,5 mg.L⁻¹ houve inibição no crescimento algáceo de 7% a 27%. A partir da concentração 25 mg.L⁻¹, houve uma inibição significativa que variou de 26% a 54%. Nos ensaios realizados com a concentração 50 mg.L⁻¹, houve inibição total e a variação foi de 64% a 100%. Já em 75 mg.L⁻¹, apenas um dos ensaios não se aproximou da inibição celular total. No ensaio 6 houve um decréscimo no crescimento celular na concentração 50 mg.L⁻¹ e um estímulo no crescimento celular na concentração de 75 mg.L⁻¹.

Os valores de CI(I)_{50-96h} para naftaleno, calculada para os seis ensaios estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Concentração de inibição CI(I)_{50-96h} de *Dunaliella tertiolecta* após 96h de exposição ao naftaleno (média, desvio padrão e coeficiente de variação).

Ensaio	CI(I)_{50-96h} em mg.L⁻¹
Ensaio 1	30,29 (26,60 - 34,48)
Ensaio 2	31,69 (25,20 - 39,84)
Ensaio 3	23,69 (21,13 - 26,56)
Ensaio 4	28,69 (25,88 - 32,45)
Ensaio 5	29,68 (27,07 - 31,64)
Ensaio 6	-
Média	29,01
Desvio padrão	3,16
Coeficiente de variação (%)	11

() – Intervalo de confiança

Os valores de CI(I)₅₀ de naftaleno para os ensaios com *Dunaliella tertiolecta* estiveram compreendidos entre 23,69 mg.L⁻¹ e 30,68 mg.L⁻¹. Não foi possível calcular a CI(I)₅₀ em um dos ensaios devido ao estímulo no crescimento celular ocorrido com a maior concentração de naftaleno.

4.1.3. Efeito algicida e algistático

Para a constatação do efeito algicida ou algistático do naftaleno em *Dunaliella tertiolecta*, foi retirada uma alíquota da menor concentração em que ocorreu inibição celular ao final de 96 horas de exposição ao naftaleno, e foi

comparada a um controle com formol e corante azul de Evans. As células estavam majoritariamente coradas devido ao efeito algicida do formol e foram comparadas a um controle com adição apenas do corante azul de Evans, nas quais as células se apresentavam sadias e raramente coradas (Tabela 11).

Tabela 11. Resultado do efeito algicida e algistático do naftaleno em células de *Dunaliella tertiolecta*.

		Nºcélulas Total	% células coradas
Ensaio 1	Controle, formol, Azul Evans	1248	100%
	Controle, Azul Evans	1312	0,3%
	6,25 mg.L ⁻¹ de naftaleno	992	6,4%
Ensaio 2	Controle, formol, Azul Evans	1632	100%
	Controle, Azul Evans	976	0,9%
	6,25 mg.L ⁻¹ de naftaleno	1200	2,25%
Ensaio 3	Controle, formol, Azul Evans	816	100%
	Controle, Azul Evans	1056	0,09%
	6,25 mg.L ⁻¹ de naftaleno	1536	15,6%

Como as células da menor concentração de naftaleno (6,25 mg.L⁻¹) não foram majoritariamente coradas, concluiu-se que o efeito desta substância foi algistático e não algicida.

4.1.4. Ensaio de sensibilidade de *Dunaliella tertiolecta* ao DSS

A CI(I)_{50-96h} para *Dunaliella tertiolecta* e Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) variou entre 1,82 mg.L⁻¹ e 2,40 mg.L⁻¹. Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade ao DSS (Tabela 12) situaram-se dentro dos intervalos de concentrações reportados na literatura por Lewis (1990). A carta-controle está representada na Figura 15.

Tabela 12. Sensibilidade $CI(l)_{50-96h}$ de *Dunaliella tertiolecta* ao DSS.

Ensaio	$CI(l)_{50-96h}$ em $mg.L^{-1}$
Ensaio 1	2,15 (1,93 - 2,40)
Ensaio 2	2,09 (1,93 - 2,27)
Ensaio 3	1,96 (1,77 - 2,17)
Ensaio 4	1,88 (1,72 - 2,06)
Ensaio 5	2,40 (2,23 - 2,58)
Ensaio 6	1,82 (1,76 - 1,87)
Média	2,05
Desvio padrão	0,2
Coeficiente de variação (%)	10

() – Intervalo de confiança

Figura 15. Carta-controle para *Dunaliella tertiolecta* exposta ao DSS.

4.2. Ensaio com embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

4.2.1. Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito crônico com *Lytechinus variegatus* e o naftaleno.

Ensaio preliminares foram realizados para identificar o intervalo de concentrações de naftaleno a ser aplicado nos ensaios definitivos. As concentrações utilizadas inicialmente foram:

- 0,18; 0,37; 0,75; 1,5; 3,1 $mg.L^{-1}$ de naftaleno
- 0,09; 0,18; 0,37; 0,75; 1,5 $mg.L^{-1}$ de naftaleno

Ao final das 96 horas as larvas em estágio *pluteus* no controle, apresentaram-se bem desenvolvidas em porcentagem superior a 80%. Portanto, dentro dos requisitos proposto pela ABNT.

Os resultados de CENO(I), CEO(I) e CE(I)_{50-24h} e as respectivas médias, desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), para o desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* na presença de naftaleno estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Concentração de efeito para embriões de *Lytechinus variegatus* ao naftaleno (CENO (I), CEO (I) e CE(I)_{50-24h}).

Ensaio	CENO (I)	CEO (I)	CE(I) _{50-24h}
	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
Ensaio 1	0,09	0,18	0,43 (0,38 - 0,48)
Ensaio 2	0,09	0,18	0,23 (0,20 - 0,25)
Ensaio 3	0,09	0,18	0,51 (0,45 - 0,58)
Ensaio 4	0,04	0,09	0,16 (0,15 - 0,17)
Ensaio 5	-	0,04	0,10 (0,09 - 0,11)
Ensaio 6	0,04	0,09	0,24 (0,22 - 0,26)
Ensaio 7	-	0,04	0,08 (0,07 - 0,08)
Ensaio 8	0,09	0,18	0,62 (0,56 - 0,68)
Média	0,07	0,12	0,30
DP	0,03	0,06	0,20
CV(%)	35	52	67,48

() - Intervalo de confiança

Os valores de CENO(I) e CEO(I) para cada ensaio realizado estão expressos na Figura 16.

Figura 16. Valores da CENO(I) e CEO(I) para ensaios crônicos com *L. variegatus* e naftaleno.

Os valores das concentrações de efeito não observado CENO(I) variaram de uma concentração abaixo da menor concentração utilizada nos ensaios a 0,09 mg.L⁻¹, e os valores das concentrações de efeito observado CEO(I) variaram de 0,04 mg.L⁻¹ a 0,18 mg.L⁻¹. As concentrações de efeito CE(I)_{50-24h} variaram entre 0,08 mg.L⁻¹ e 0,62 mg.L⁻¹.

Nos ensaios 5 e 7 foi observada uma maior sensibilidade nos organismos e não foi possível determinar um valor para concentração de efeito não observado (CENO), consequentemente o valor de efeito observado (CEO), indicou a menor concentração de naftaleno em 0,04 mg.L⁻¹.

4.2.2. Ensaio de sensibilidade de *Lytechinus variegatus* ao DSS

As CE(I)_{50-24h} para embriões de *Lytechinus variegatus* ao Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) variaram entre 1,50 mg.L⁻¹ e 3,70 mg.L⁻¹. Os resultados encontrados nos ensaios de sensibilidade com embriões de ouriço-do-mar ao

DSS (Tabela 15) estavam dentro da faixa aceitável da carta-controle do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos do Instituto Oceanográfico-USP.

Tabela 15. Sensibilidade $CE(I)_{50-24h}$ de *Lytechinus variegatus* ao DSS.

Ensaio	$CE(I)_{50-24h}$
Ensaio 1	3,70 (3,70 - 3,76) mg.L ⁻¹
Ensaio 2	1,73 (1,70 - 1,75) mg.L ⁻¹
Ensaio 3	3,68 (3,62 - 3,74) mg.L ⁻¹
Ensaio 4	3,69 (3,62 - 3,75) mg.L ⁻¹
Ensaio 5	1,50 (1,45 - 1,54) mg.L ⁻¹
Ensaio 6	2,96 (2,81 - 3,12) mg.L ⁻¹
Ensaio 7	2,34 (2,24 - 2,45) mg.L ⁻¹
Ensaio 8	3,54 (3,31 - 3,78) mg.L ⁻¹
Média	2,89
DP	0,9
CV(%)	32

() – Intervalo de confiança

A carta-controle de *Lytechinus variegatus* ao DSS está representada na Figura 17.

Figura 17. Carta de sensibilidade para embriões de *Lytechinus variegatus* exposto ao DSS durante 24 horas.

4.3. Ensaio com copépodo estuarino *Nitokra* sp

4.3.1 Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito crônico com *Nitokra* sp

Os resultados dos efeitos crônicos para *Nitokra* sp estão apresentados na Tabela 16 e Figura 18.

Tabela 16. Média de fêmeas adultas, náuplios e taxa média de eclosão, após 96h de exposição ao naftaleno.

Ensaio 1				Ensaio 2			
Naftaleno mg.L ⁻¹	Média adultos	Média náuplios	Taxa Média eclosão	Naftaleno mg.L ⁻¹	Média adultos	Média náuplios	Taxa Média eclosão
Contr. B.	10	35	3,5	Contr. B.	10	73	7,3
Contr. S.	10	39	3,9	Contr. S.	10	71	7,1
0,06	10	43	4,3	0,06	10	68	6,8
0,12	10	37	3,7	0,12	10	63	6,3
0,25	10	39	3,9	0,25	10	52	5,2
0,50	10	26	2,6	0,50	10	48	4,8
1,0	10	6	0,6	1,0	10	14	1,4
2,0	10	27	2,7	2,0	10	6	0,6

Ensaio 3				Ensaio 4			
Naftaleno mg.L ⁻¹	Média adultos	Média náuplios	Taxa Média eclosão	Naftaleno mg.L ⁻¹	Média adultos	Média náuplios	Taxa Média eclosão
Contr. B.	10	81	8,1	Contr. B.	10	81	8,1
Contr. S.	10	74	7,4	Contr. S.	10	79	7,9
0,06	10	73	7,3	0,06	10	78	7,8
0,12	10	64	6,4	0,12	10	68	6,8
0,25	10	57	5,7	0,25	10	60	6,0
0,50	10	49	4,9	0,50	10	49	4,9
1,0	10	17	1,7	1,0	10	6	0,6
2,0	10	4	0,4	2,0	10	7	0,7

Ensaio 5			
Naftaleno mg.L ⁻¹	Média adultos	Média náuplios	Taxa Média eclosão
Contr. B.	10	52	5,2
Contr. S.	10	68	6,8
0,06	10	72	7,2
0,12	10	66	6,6
0,25	10	55	5,5
0,50	10	42	4,2
1,0	10	16	1,6
2,0	10	5	0,5

Legenda

Contr. B = Controle branco

Contr. S = Controle solvente

Figura 18. Taxa média de eclosão de ovos de *Nitokra* sp expostos a diferentes concentrações de naftaleno durante 96 horas.

No primeiro ensaio, a taxa de eclosão dos ovos foi considerada a mais baixa em comparação aos demais ensaios, apresentando uma taxa de eclosão média no controle entre de 3,5 e 3,9. Os demais ensaios apresentaram a taxa de eclosão no controle entre 5,2 e 8,1. Em todos os tratamentos com a substância estudada, houve queda na eclosão de ovos em comparação ao controle. O número de náuplios foi reduzido acompanhando o aumento de concentrações de naftaleno. Também não houve taxa de mortalidade em fêmeas adultas e os controles em todos os ensaios apresentaram eclosão de ovos.

Os resultados de CENO(I), CEO(I) e a respectiva média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), para o taxa de eclosão de ovos de *Nitokra* sp na presença de naftaleno estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Resultado do ensaio ecotoxicológico de efeito crônico com *Nitokra* sp exposto ao naftaleno (CENO (I), CEO (I)).

Ensaio	CENO (I)	CEO (I)
	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
Ensaio 1	0,25	0,50
Ensaio 2	0,12	0,25
Ensaio 3	0,25	0,50
Ensaio 4	0,25	0,50
Ensaio 5	0,12	0,25
Média	0,19	0,40
DP	0,07	0,13
CV(%)	35	34

() - Intervalo de confiança

Os valores das concentrações de CENO(I) variaram entre 0,12 mg.L⁻¹ e 0,25 mg.L⁻¹, e os valores de CEO(I) variaram entre 0,25 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹.

4.3.1.1 Ensaio de sensibilidade de *Nitokra* sp ao DSS (paralelo aos ensaios crônicos)

A sensibilidade de *Nitokra* sp ao DSS foi avaliada por meio de ensaios de efeito agudo, paralelamente aos ensaios crônicos e apresentaram CL(I)_{50-96h} de 6,51 mg.L⁻¹ a 11,57 mg.L⁻¹. Os valores de CL(I)_{50-96h} estão representados na Tabela 18.

Tabela 18. Sensibilidade CL(I)_{50-96h} de *Nitokra* sp ao DSS.

Ensaio	CL(I) _{50-96h} em mg.L ⁻¹
Ensaio 1	11,57 (10,53 - 12,71)
Ensaio 2	7,63 (7,11 - 8,20)
Ensaio 3	7,27 (6,68 - 7,91)
Ensaio 4	6,51 (5,83 - 7,26)
Ensaio 5	6,63 (5,92 - 7,42)
Média	7,9
DP	2,1
CV(%)	26,4

() - Intervalo de confiança

A carta-controle representa a sensibilidade de *Nitokra* sp ao DSS está representada na Figura 19. Os resultados estão dentro da faixa de

aceitabilidade da carta controle do Laboratório de Microfitobentos e Ecotoxicologia do Instituto Oceanográfico-USP.

Figura 19. Carta-controle para *Nitokra* sp exposto ao DSS durante 96 horas, junto aos ensaios agudos e crônicos.

O primeiro ensaio até o sétimo ensaio, correspondem a CL₅₀ dos ensaios realizados com *Nitokra* sp ao DSS nos ensaios agudos. Já do oitavo ao décimo segundo ensaio, correspondem a CL₅₀ dos ensaios crônicos.

4.3.2 Ensaio ecotoxicológico de efeito agudo com *Nitokra* sp e naftaleno

Visando a obtenção de um intervalo de concentrações adequadas para realização de ensaios agudos com *Nitokra* sp, foram realizados ensaios preliminares nas seguintes concentrações:

- 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mg.L⁻¹ de naftaleno
- 20; 40; 60; 80; 100 mg.L⁻¹ de naftaleno
- 1,8; 3,7; 7,5; 15; 30 mg.L⁻¹ de naftaleno

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos definitivos com *Nitokra* sp após 96h de exposição ao naftaleno estão expressos na Tabela 19.

Tabela 19. Número de organismos mortos (média e desvio-padrão) nos ensaios agudos com *Nitokra* sp expostos ao naftaleno.

Ensaio	Réplica	Controle Branco	Controle Solvente	Naftaleno (mg.L ⁻¹)					
				2,5	5	10	20	40	80
Ensaio 1	1	0	1	0	0	2	4	4	10
	2	0	0	0	0	3	3	5	10
	3	1	0	1	1	2	5	8	10
	4	0	0	0	0	5	4	3	10
	Média	0,3	0,3	0,3	0,3	3,0	4,0	5,0	10,0
	DP	0,5	0,5	0,5	0,5	1,4	0,8	2,2	0,0
Ensaio 2	1	1	0	1	3	8	7	9	10
	2	0	0	2	3	4	8	7	10
	3	0	0	0	2	7	8	8	9
	4	0	0	3	8	8	7	8	10
	Média	0,3	0,0	1,5	4,0	6,8	7,5	8,0	9,8
	DP	0,6	0,0	1,5	3,2	0,6	0,6	0,6	0,0
Ensaio 3	1	0	0	1	3	5	8	10	10
	2	0	1	2	3	6	6	5	10
	3	0	0	0	1	5	4	7	10
	4	1	0	0	0	4	8	10	10
	Média	0,3	0,3	0,8	1,8	5,0	6,5	8,0	10,0
	DP	0,5	0,5	1,0	1,5	0,8	1,9	2,4	0,0
Ensaio 4	1	0	0	3	3	5	2	10	10
	2	0	1	0	0	6	8	8	10
	3	0	0	0	4	5	6	8	10
	4	0	0	2	2	5	7	9	10
	Média	0,0	0,3	1,3	2,3	5,3	5,8	8,8	10,0
	DP	0,0	0,5	1,5	1,7	0,5	2,6	1,0	0,0
Ensaio 5	1	0	0	0	1	8	9	10	10
	2	1	0	0	1	8	8	6	10
	3	0	0	0	0	8	10	8	10
	4	0	0	0	1	7	6	10	10
	Média	0,3	0,0	0,0	0,8	7,8	8,3	8,5	10,0
	DP	0,5	0,0	0,0	0,5	0,5	1,7	1,9	0,0
Ensaio 6	1	0	0	0	3	4	10	10	10
	2	0	0	0	0	3	8	9	10
	3	0	0	1	1	6	0	10	10
	4	0	0	0	2	5	10	10	10
	Média	0,0	0,0	0,3	1,5	4,5	7,0	9,8	10,0
	DP	0,0	0,0	0,5	1,3	1,3	4,8	0,5	0,0
Ensaio 7	1	0	0	2	5	3	7	5	10
	2	1	0	0	3	5	6	4	10
	3	0	0	2	2	3	3	7	10
	4	0	0	1	2	4	8	6	10
	Média	0,3	0,0	1,3	3,0	3,8	6,0	5,5	10,0
	DP	0,5	0,0	1,0	1,4	1,0	2,2	1,3	0,0

Os valores da $CL(I)_{50-96h}$ para naftaleno nos ensaios com *Nitokra* sp estiveram compreendidos entre 7,48 mg.L⁻¹ e 24,20 mg.L⁻¹. A letalidade em cada concentração de naftaleno esta apresentada na Figura 20.

Figura 20. Letalidade de *Nitokra* sp ao naftaleno em 96 horas de exposição.

A letalidade dos organismos no controle não ultrapassou 10%. Os valores da $CL(I)_{50-96h}$ obtidos nos ensaios, estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20. Efeito agudo $CL(I)_{50-96h}$ para o copépodo *Nitokra* sp exposto ao naftaleno.

Ensaio	$CL(I)_{50-96h}$ em mg.L ⁻¹
Ensaio 1	24,20 (20,08 - 29,16)
Ensaio 2	7,48 (5,69 - 9,83)
Ensaio 3	12,53 (9,98 - 15,73)
Ensaio 4	11,76 (9,17 - 15,07)
Ensaio 5	10,17 (8,65 - 11,96)
Ensaio 6	11,49 (9,71 - 13,58)
Ensaio 7	15,95 (12,01 - 21,17)
Média	13,4
DP	5,41
CV(%)	40

() - Intervalo de confiança

4.3.2.1 Ensaio de sensibilidade de *Nitokra* sp ao DSS (paralelo aos ensaios agudos)

Nos ensaios com a substância de referência, os valores de CL(I)_{50-96h} estão representados na Tabela 21.

Tabela 21. Sensibilidade CL(I)_{50-96h} de *Nitokra* sp ao DSS.

Ensaio	CL(I) _{50-96h}
Ensaio 1	5,79 (5,22 - 6,43) mg.L ⁻¹
Ensaio 2	7,48 (5,69 - 9,83) mg.L ⁻¹
Ensaio 3	7,20 (6,57 - 7,89) mg.L ⁻¹
Ensaio 4	10,95 (10,27 - 11,69) mg.L ⁻¹
Ensaio 5	6,12 (5,51 - 6,81) mg.L ⁻¹
Ensaio 6	6,50 (5,85 - 7,23) mg.L ⁻¹
Ensaio 7	9,50 (7,72 - 11,68) mg.L ⁻¹
Média	7,6
DP	1,9
CV(%)	25

() - Intervalo de confiança

Os ensaios de sensibilidade com *Nitokra* sp ao DSS foram ensaios de letalidade paralelos aos ensaios agudos e apresentaram CL(I)_{50-96h} de 5,79 mg.L⁻¹ a 10,95 mg.L⁻¹.

4.4. Ensaio com anfípodo bentônico *Leptocheirus plumulosus*

4.4.1 Ensaio ecotoxicológico para avaliar o efeito agudo com *Leptocheirus plumulosus* ao naftaleno

A partir dos resultados dos ensaios preliminares com *Leptocheirus plumulosus* nas concentrações descritas abaixo, foram estabelecidas as concentrações de naftaleno para os ensaios definitivos.

- 10; 15; 20; 30; 40; 80; 120; 240; 320 mg.L⁻¹ de naftaleno
- 3,0; 4,0,5,0; 6,7; 10; 15 mg.L⁻¹ de naftaleno

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos definitivos com *Leptocheirus plumulosus* ao naftaleno, após 96h de exposição, estão expressos na Tabela 22.

Tabela 22. Número de organismos mortos (média e desvio-padrão) nos ensaios agudos com *Leptocheirus plumulosus* expostos ao naftaleno.

Ensaio	Réplica	Controle Branco	Controle Solvente	Naftaleno (mg.L ⁻¹)				
				0,62	1,25	2,5	5	10
Ensaio 1	1	0	0	2	3	6	17	20
	2	0	1	1	4	4	20	20
	3	0	0	2	4	5	19	20
	4	0	0	1	5	2	18	20
	Média	0,0	0,3	1,5	4,0	4,3	18,5	20,0
	DP	0,0	0,5	0,6	0,8	1,7	1,3	0,0
Ensaio 2	1	0	0	2	5	4	10	20
	2	0	0	2	4	6	14	20
	3	1	2	2	3	5	10	20
	4	0	0	1	7	4	17	20
	Média	0,3	0,5	1,8	4,8	4,8	12,8	20,0
	DP	0,5	1,0	0,5	1,7	1,0	3,4	0,0
Ensaio 3	1	0	1	0	5	6	20	20
	2	0	0	3	3	12	18	20
	3	0	0	2	4	7	18	20
	4	0	0	1	3	5	19	20
	Média	0,0	0,3	1,5	3,8	7,5	18,8	20,0
	DP	0,0	0,5	1,3	1,0	3,1	1,0	0,0
Ensaio 4	1	0	0	2	9	16	20	20
	2	2	2	1	6	18	19	20
	3	0	0	1	12	17	18	20
	4	0	0	0	5	18	20	20
	Média	0,5	0,5	1,0	8,0	17,3	19,3	20,0
	DP	1,0	1,0	0,8	3,2	1,0	1,0	0,0
Ensaio 5	1	1	0	0	10	12	16	18
	2	0	0	2	4	9	18	20
	3	0	0	0	6	21	18	19
	4	0	0	0	11	18	14	20
	Média	0,3	0,0	0,5	7,8	15,0	16,5	19,3
	DP	0,5	0,0	1,0	3,3	5,5	1,9	1,0

A porcentagem média de sobrevivência dos organismos no controle foi superior ou igual 80%. Os valores da CL(I)₅₀₋₉₆ obtidos nos ensaios estão expressos na Tabela 23.

Tabela 23. Resultado dos ensaios ecotoxicológicos de efeito agudo $CL(I)_{50-96h}$ de *Leptocheirus plumulosus* exposto ao naftaleno (média, desvio padrão e coeficiente de variação).

Ensaio	$CL(I)_{50-96h}$
Ensaio 1	2,84 (2,54 - 3,17) $mg.L^{-1}$
Ensaio 2	3,28 (2,84 - 3,78) $mg.L^{-1}$
Ensaio 3	2,51 (2,23 - 2,83) $mg.L^{-1}$
Ensaio 4	1,48 (1,34 - 1,64) $mg.L^{-1}$
Ensaio 5	1,80 (1,58 - 2,04) $mg.L^{-1}$
Média	2,38
DP	0,66
CV(%)	27,75

() - Intervalo de confiança

Os resultados da $CL(I)_{50-96h}$, dos ensaios com *Leptocheirus plumulosus* exposto ao naftaleno estiveram compreendidos entre 1,48 $mg.L^{-1}$ e 3,28 $mg.L^{-1}$. A taxa de letalidade em cada concentração de naftaleno esta apresentada na Figura 21.

Figura 21. Letalidade de *Leptocheirus plumulosus* ao naftaleno em 96 horas de exposição.

4.4.2 Ensaio de sensibilidade de *Leptocheirus plumulosus* ao DSS

Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade de *Leptocheirus plumulosus* ao DSS estão apresentados na Tabela 24 e a carta controle está representada na Figura 22.

Tabela 24. Sensibilidade CL(I)_{50-96h} de *Leptocheirus plumulosus* ao DSS.

Ensaio	CL(I) _{50-96h}
Ensaio 1	1,74 (1,53 - 1,96) mg.L ⁻¹
Ensaio 2	3,65 (3,23 - 4,12) mg.L ⁻¹
Ensaio 3	2,75 (2,33 - 3,24) mg.L ⁻¹
Ensaio 4	4,39 (3,97 - 4,87) mg.L ⁻¹
Ensaio 5	0,99 (0,82 - 1,20) mg.L ⁻¹
Média	2,70
DP	1,38
CV(%)	51,0

() - Intervalo de confiança

Os ensaios com a substância de referência DSS nos ensaios com *Leptocheirus plumulosus* tiveram a CL_{50-96h} entre 0,99 mg.L⁻¹ a 4,39 mg.L⁻¹.

Figura 22. Carta-controle para *Leptocheirus plumulosus* exposto ao DSS durante 96 horas.

4.5. Intervalo de valores dos níveis tróficos

Em um total de 8 ensaios o desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* apresentou uma maior sensibilidade ao naftaleno em uma média de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$, a média dos valores para *Nitokra* sp nos ensaios crônicos foi um valor aproximado de $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$, avaliado através do sucesso da eclosão de ovos em fêmeas adultas. Já o anfípodo estuarino *Leptocheirus plumulosus* apresentou significativa sensibilidade ao naftaleno, e uma média de 5 ensaios foi obtida a concentração letal de $2,38 \text{ mg.L}^{-1}$. Em um intervalo distante, foi obtida a concentração letal de *Nitokra* sp e a média dos 5 ensaios determinaram o intervalo de valor em $13,4 \text{ mg.L}^{-1}$. Dentre os organismo-teste utilizados, a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* foi o mais resistente, em relação as demais espécies avaliadas, com a média nos 6 ensaios de $29,01 \text{ mg.L}^{-1}$. Estes valores estão expressos na Figura 23.

Figura 23. Intervalo de valores dos ensaios crônicos e agudos entre os diferentes níveis tróficos

4.6. Análise espectrofotométrica de ultravioleta

A análise de perda de naftaleno durante o período de exposição dos ensaios foi realizada por espectrofotometria de ultravioleta, que registra os dados de absorbância em função do comprimento de onda. Para tal, medições espectrofotométricas das amostras foram feitas no comprimento de onda de 221 nm.

Através do método descrito por Neff & Anderson (1975), foram preparadas as seguintes concentrações:

- 0,05; 0,5; 1,5; 5, 15 e 75 mg.L⁻¹ de naftaleno.

As amostras foram analisadas imediatamente após terem sido acidificadas e tratadas em cada intervalo de tempo. Os intervalos foram compreendidos em 24 h, 48 h, 72 h e 96 horas, verificando assim, a taxa de evaporação do naftaleno. As amostras foram mantidas em frascos âmbar devidamente tampados, do mesmo modo como foram realizados os ensaios de toxicidade com naftaleno. Inicialmente foi detectado o valor especificado como branco, que compreende a absorbância do reagente n Hexano e este valor foi subtraído em todas as concentrações para estimar o valor real da absorbância (Tabela 25).

Tabela 25. Absorbância do naftaleno em nm após 24h, 48h, 72h e 96h.

Naftaleno mg.L ⁻¹	Absorbância em nm				
	(0 h)	(24 h)	(48 h)	(72 h)	(96 h)
Absorbância-branco	0,004	0,003	0,006	0,004	0,003
0,05	0,0087	0,009	0,0092	0,0075	0,0065
0,5	0,1095	0,1165	0,1231	0,1312	0,0782
1,5	0,3508	0,3282	0,3247	0,2805	0,2537
5	1,0735	1,1491	1,1461	0,9934	0,7926
15	3,3516	3,2056	3,1026	2,8691	2,6467
75	nc	nc	nc	nc	nc

O cálculo em porcentagem que representa a perda do naftaleno durante todo o tempo de exposição está na Tabela 26.

Tabela 26. Porcentagem de perda do naftaleno em diferentes períodos de exposição.

Naftaleno mg.L ⁻¹	Absorbância em nm com desconto do branco				
	(0 h)	(24 h)	(48 h)	(72 h)	(96 h)
0,05	0%	0%	0%	14%	26%
0,50	0%	0%	0%	0%	29%
1,50	0%	7%	8%	20%	28%
5,00	0%	0%	0%	8%	27%
15,00	0%	4%	8%	15%	21%

A diminuição da concentração do contaminante, em percentual, foi observada a partir de 24 horas de exposição, sendo que nas concentrações 1,5 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹ apresentaram perda total de 7% e 4%, e em 48 horas de exposição 8% de perda em ambas as concentrações. Em 72 horas as concentrações de naftaleno, majoritariamente sofreram decaimento, com exceção da concentração de 0,5 mg.L⁻¹, as demais variaram de 8% a 20%. Em 96 horas, período de maior interesse neste estudo devido ao período de exposição nos ensaios ecotoxicológicos, foi identificada perda em todas as concentrações nominais, variando de 21% em 15 mg.L⁻¹ e 29% em 0,5 mg.L⁻¹ de naftaleno.

Com os valores de absorbância obtidos no período de 96h em cada concentração, foi realizada uma curva de calibração para o naftaleno, a partir de uma linha de regressão linear (Figura 24).

Figura 24. Curva de calibração para o naftaleno analisado por espectrofotometria de ultravioleta.

Os valores de absorbância obtidos, expressos em tabelas e gráfico, descontaram os valores da absorbância do branco (n-Hexano puro), utilizado para calibração do espectrofotômetro, eliminando assim, a diferença de absorbância do solvente e promovendo a leitura real da solução. A concentração de decaimento do naftaleno foi observada logo após o preparo da solução e quantificada de 24 em 24 h. A absorbância verificada na mesma concentração em diferentes intervalos de tempo sofreram aumento, como ocorreu com a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de naftaleno no intervalo de tempo (0 h) a absorbância obtida foi de 0,1095 nm e após 24 horas chegou a 0,1165 nm. Não foi possível obter a absorbância para concentração de 75 mg.L⁻¹ de naftaleno. A alta concentração do composto pode ter sido a causa da impossibilidade de leitura.

Para verificar a homogeneidade dos dados entre absorbância e a concentração de naftaleno foi realizado um tratamento estatístico pelo software Bioestat 5.0 empregando o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Os valores apresentaram nível de probabilidade (< 0,05), considerado estatisticamente significativo. A correlação linear de Pearson entre a absorbância e a

concentração de naftaleno em 96 horas, se evidenciou pela alta correlação positiva ($r = 0,99$ $p < 0,001$). Portanto, os resultados foram considerados homogêneos e não apresentaram diferença significativa.

5. DISCUSSÃO

Há tempos se discute a degradação do meio ambiente decorrente do sistema de desenvolvimento predatório estabelecido. Nesse contexto, é notória a importância de estudos ecotoxicológicos na elaboração de diagnósticos da qualidade ambiental, avaliação de áreas sensíveis e na identificação de substâncias nocivas e o potencial tóxico de substâncias químicas liberadas no meio ambiente (Nascimento *et al.*, 2002).

Como em qualquer outro método de análise, os ensaios ecotoxicológicos também apresentam variabilidade entre os resultados e esta variabilidade pode ser atribuída a possíveis variações de fatores abióticos, habilidade técnica na execução dos ensaios e a variabilidade intrínseca da sensibilidade do lote de organismos-teste. No entanto, os métodos destes ensaios dispõem de ferramentas bastante eficientes que possibilitam um melhor monitoramento das condições ambientais. Geralmente, ensaios ecotoxicológicos são desenvolvidos em condições laboratoriais estáveis. Por isso, essas condições podem não ser similares às situações de interação de compostos químicos no ambiente real. Para minimizar estas variáveis, ensaios de sensibilidade com substância de referência, por exemplo, são utilizados para avaliar as condições de integridade e sensibilidade dos organismos-teste, dentre outras funções, aumentando a confiabilidade dos dados gerados em laboratório (Zagatto, 2006).

Para facilitar a análise da sensibilidade dos organismos-teste é construída uma carta-controle, onde é estabelecida uma faixa de aceitação dos resultados dos ensaios de sensibilidade (Environment Canada, 1990). Segundo Zagatto (*op. cit.*) estas cartas também podem ser utilizadas como instrumento de validação para comparação de resultados entre diferentes laboratórios ou até mesmo comparações intralaboratoriais, onde é gerado o termo *repetibilidade de resultados*, o qual é utilizado para designar a precisão analítica, ou seja, variações dentro de um mesmo laboratório.

Considerando os diferentes níveis tróficos empregados neste estudo, a discussão será delineada a partir do primeiro nível de organização entre as espécies.

5.1. Microalga Marinha *Dunaliella tertiolecta*

As microalgas se situam na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Com isso, o uso destes organismos em ensaios ecotoxicológicos tem fundamental importância devido à representação na teia trófica como produtores primários. Dentre as vantagens em se utilizar microalgas em ensaios ecotoxicológicos podemos destacar a grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (Reginato, 1998), também por serem produtores primários dominantes no ambiente aquático (Pfleeger *et al.*, 1991) apresentam uma rápida resposta fisiológica e, assim, uma rápida resposta aos efeitos deletérios provocados pelos compostos tóxicos (Sicko-Goad & Stoermer, 1988). Para Hellawell (1986) as microalgas podem ser utilizadas como monitores biológicos de qualidade de água sendo espécies indicadoras na avaliação de impacto ambiental de poluentes.

Na utilização de microalgas em ensaios ecotoxicológicos, a determinação da concentração algácea pode ser realizada através de contagem celular, conteúdo de clorofila, turbidez ou absorbância (EPA, 1994). Independentemente do método utilizado, os resultados podem ser expressos como concentração de inibição (CI) (Lewis, 1990). Segundo, Aidar *et al.* (2002), esses valores são uma boa indicação do dano potencial que esses produtos químicos podem causar em ambiente natural.

5.1.1. Curva de crescimento

O crescimento das microalgas depende unicamente das propriedades intrínsecas das células algáceas, quando os fatores em condição laboratoriais são adequados como exemplo, a luz que atua na fotossíntese das microalgas (Meseck *et al.*, 2005). Segundo Lourenço (2006) a curva de crescimento das

microalgas é única para cada espécie e varia com a concentração de nutrientes, intensidade luminosa, entre outros fatores. Em geral, apresenta cinco fases distintas: fase de adaptação, fase de crescimento, fase exponencial, fase de redução de crescimento, fase estacionaria e fase de declínio.

Neste estudo a curva de crescimento teve início na fase exponencial, onde o número de células algáceas aumentou significativamente em relação ao dia inicial, demonstrando estar em condições de divisão imediata, principalmente, pela adaptação ao meio de cultivo. Em decorrência de tais fatos, no período de 48 h, 72 h e 96 h (2, 3 e 4 dias de crescimento, respectivamente) foram observadas a maior taxa de crescimento.

A densidade celular após 48 h apresentou $3,3 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, em 72 h o crescimento celular chegou a $6,2 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ e o período de maior interesse no estudo, em 96 h, apresentou densidade celular de $7,3 \times 10^7$ cél.mL⁻¹. Um estudo comparativo com a mesma espécie realizado por Nieves *et al.* (2005), a densidade celular de *Dunaliella tertiolecta* após 96 h, apresentou $9,0 \times 10^5$ cél.mL⁻¹. Levando em conta as condições experimentais semelhantes, sendo utilizado o mesmo meio de cultura - Guillard “f”, mesma temperatura, iluminação e agitação contínua, a densidade celular se apresentou um pouco menor comparado a este estudo.

5.1.2. Efeito algicida e algistático

Neste trabalho o naftaleno apresentou efeito algistático para células de *Dunaliella tertiolecta*, avaliado através do método de coloração celular. Segundo ABNT (2011) substâncias algistáticas inibem o crescimento das células e impedem que estas células se desenvolvam durante o período de exposição à substância química. Contudo, após o período de exposição, é possível haver regeneração das células e retornar as atividades celulares novamente. Já as substâncias que causam efeito algicida, inativam totalmente as células algáceas e após o período de exposição, estas estão inaptas a realizar qualquer função.

No estudo realizado por Gray (1982) o naftaleno e outros hidrocarbonetos policíclico aromáticos de baixo peso molecular, demonstraram efeito algistático em microalga de água doce *Selenastrum capricornutum*. Essa tendência foi aplicada apenas em HPAs de baixo peso molecular, em HPAs de alto peso molecular, não foi constatado em literatura.

5.1.3. Ensaio ecotoxicológico crônico com *Dunaliella tertiolecta*

Segundo Eaton *et al.* (1995), várias espécies de microalgas têm sido utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, nos quais é avaliado o potencial tóxico de substâncias específicas. É importante salientar que ao se trabalhar com microalgas, deve-se levar em consideração que estes organismos são muito sensíveis a alterações no ambiente e que seu crescimento pode ser facilmente inibido ou acelerado pela presença de diferentes substâncias químicas (Parrish, 1985).

Como se pôde observar neste estudo, o crescimento celular de *Dunaliella tertiolecta* foi afetado devido à presença do naftaleno, diminuindo a velocidade de multiplicação de tal maneira que a porcentagem de inibição foi maior na medida em que foi aumentada a concentração da substância-teste, até inibir totalmente seu crescimento.

De acordo com o cálculo da concentração que causou efeito de inibição em 50% dos organismos dentro das 96 horas de exposição e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* exposta ao naftaleno teve sua concentração de inibição estimada em $CI(I)_{50-96h} = 30,29$ (26,60- 34,48) $mg.L^{-1}$, $CI(I)_{50-96h} = 31,69$ (25,20- 39,84) $mg.L^{-1}$, $CI(I)_{50-96h} = 23,69$ (21,13- 26,56) $mg.L^{-1}$, $CI(I)_{50-96h} = 28,69$ (25,88- 32,45) $mg.L^{-1}$, $CI(I)_{50-96h} = 29,68$ (27,07- 31,64) $mg.L^{-1}$. As concentrações de inibição seguiram uma tendência homogênea, com média de todos os ensaios em 29,01 $mg.L^{-1}$. Em comparação a outras espécies de microalgas, a *Dunaliella tertiolecta* exposta ao naftaleno foi menos sensível, como em um estudo realizado por Millemann *et al.* (1984) utilizando a microalga de água doce *Selenastrum capricornutum*, apresentou $CI(I)_{50-48h}$ em 2,9 $mg.L^{-1}$ de naftaleno. Já a diatomácea *Nitzschia palea* em um estudo paralelo realizado pelo mesmo autor, teve a $CI(I)_{50-48h}$ em 2,8 $mg.L^{-1}$ de naftaleno. Jiang *et al.* (2002) realizou

ensaios ecotoxicológicos com a microalga *Zooxanthella croadriz tica* e obteve a $CI(I)_{50-72h}$ em 7,3 mg.L⁻¹. Hutchinson *et al.* (1980) em um período de exposição muito menor, apenas 3 horas de exposição, obteve $CI(I)_{50-3h}$ a 8,9 mg.L⁻¹ para *Chlamydomonas angulosa*. De acordo com Kong (2010), a concentração de naftaleno de 5 mg.L⁻¹, após 48 horas de exposição, inibiu completamente a multiplicação de células da microalga *Isochrysis galbana*.

Embora, todos os ensaios citados acima tenham sido realizados em um menor tempo de exposição, um estudo de Kauss *et al.* (1975) com apenas 48 horas se assemelhou aos resultados obtidos neste estudo. A microalga *Chlorella vulgaris*, apresentou $CI(I)_{50-48h} = 33,0$ mg.L⁻¹. Esses resultados são corroborados por Cerniglia *et al.* (1980a) ao afirmaram que as microalgas verdes *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta*, podem apresentar menor sensibilidade ao naftaleno, podendo indicar metabolização de compostos de hidrocarbonetos.

Uma variedade de microrganismos tais como algas, bactérias, fungos, tem potencial para metabolizar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e principalmente os HPAs de baixo peso molecular. Os HPAs de elevado peso molecular passam a ser de difícil degradação, devido a limitações de biodisponibilidade (Cerniglia, 1992; Wilson & Jones 1993). Alguns estudos têm investigado a capacidade de algas degradarem HPAs, como o realizado por Cerniglia (1980) com algumas microalgas verdes, incluindo *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta*, demonstraram potencial para transformar o naftaleno em quatro metabólitos, sendo: I-naftol, 4-hidroxi-I-tetralona, cis-naftaleno diidrodiol, e trans-naftaleno diidrodiol. Porém, a degradação total de naftaleno foi inferior a 2% do nível original (Cerniglia *et al.*, 1980a). Portanto, é possível ter havido alguma forma de degradação da substância química pelas microalgas, e por esta razão, neste estudo, a microalga *Dunaliella tertiolecta* demonstrou ser o organismo-teste mais resistente ao naftaleno neste estudo.

5.1.4. Ensaio de sensibilidade de *Dunaliella tertiolecta* ao DSS

De acordo com Rodgher & Rocha (1999) uma das formas de se avaliar as condições fisiológicas de um organismo-teste, é através de ensaios de sensibilidade com uma substância tóxica de referência. Estes ensaios

consistem em submeter os organismos a diferentes concentrações de uma substância, e desta maneira, obter a faixa de sensibilidade para posterior realização de bioensaios. Valores fora desta faixa de sensibilidade não garantem que o lote de organismos se encontre em condições para serem utilizados.

Neste estudo, o surfactante DSS tido como substância de referência, afetou *Dunaliella tertiolecta*, inibindo seu crescimento em baixas concentrações. A concentração de inibição média $CI(I)_{50-96h}$ para *Dunaliella tertiolecta* ao DSS, foi de 2,05 mg.L⁻¹. Comparado a um estudo realizado por Mariani *et al.* (2006) que obtiveram $CI(I)_{50-72h} = 4,8$ (3,6 - 6,0) mg.L⁻¹ de DSS para *Dunaliella tertiolecta*, embora com menor período de exposição, mais de duas vezes maior que a concentração encontrada neste estudo.

5.2. Ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

Os ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus* são herbívoros-pastadores, atuantes na ciclagem de nutrientes no ambiente marinho (Chiu, 1988). A importância dos invertebrados marinhos no ecossistema aquático tem sido uma razão relevante para utilizá-los como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos (Fliedner & Klein, 1996). Estes organismos são sujeitos às condições ambientais predominantes e, em geral, se deslocam com pouca frequência, deste modo, podem refletir alterações fisiológicas em condições ambientais alteradas. Ovos e larvas de muitos organismos marinhos, também podem apresentar uma fase planctônica, o que podem vir a ser prejudicados pelo contato com diferentes poluentes dissolvidos no ambiente aquático, como ocorre com HPAs de baixo peso molecular (Falk-Petersen, 1979).

Um dos ensaios ecotoxicológicos mais frequentemente utilizados na avaliação da qualidade ambiental, são ensaios com embriões de equinodermas (Kobayashi, 1995; Beiras *et al.*, 2003). Em estudos de poluição marinha, os ensaios utilizando o desenvolvimento embriolarval de ouriços-do-mar como organismos-teste, vêm sendo amplamente empregados para caracterizar os efeitos de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (Cesar *et al.*, 2004). Este fator se deve a sensibilidade dos embriões a diferentes substâncias

e a rapidez dos resultados obtidos em 24 a 36 horas de exposição (Kobayashi, 1981).

Segundo Cruz (2001) é preferível utilizar embriões em ensaios ecotoxicológicos comparado à outra fase do ciclo de vida, pois se trata da fase mais sensível dos organismos. Além disso, a maior parte dos invertebrados marinhos tem fecundação externa, o que seria seriamente comprometido no caso de uma contaminação no meio ambiente aquático e, por essa razão, sofreriam a ação direta de poluentes. Foi observado por Zamboni (1993) que embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* são cerca de dez vezes mais sensíveis a alguns compostos tóxicos do que os gametas.

Esses experimentos são aceitos internacionalmente como apropriados para ensaios ecotoxicológicos (ABNT, 2011; USEPA, 1995; Environment Canadá, 1992; CETESB, 1999).

5.2.1. Ensaio de efeito crônico com embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

Hidrocarbonetos de baixo peso molecular e solúveis em água são geralmente conhecidos como a fração mais tóxica dos HPAs para organismos que vivem na coluna d'água (Fernandez, 2006). Em um estudo realizado por Allen (1971) foi constatado que HPAs de baixo peso molecular causam grandes distúrbios no começo da clivagem de ovos de ouriço-do-mar. Já Lönning & Petersen (1982), descreveram uma inibição na formação e diferenciação do esqueleto calcário na presença de naftaleno. Outros ensaios realizados pelos mesmos autores indicaram que ouriços-do-mar da espécie *Strongylocentrotus droebachiensis*, sofreram irregularidade nos padrões de clivagem e formação da blástula na presença de 0,1 mg.L⁻¹ de naftaleno, o desenvolvimento da gástrula nestes embriões foi inibida em 12 horas e ficaram, em sua maior parte, deformados.

No presente estudo, a avaliação de efeito crônico do naftaleno foi baseada no desenvolvimento embrionar do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Este organismo tem sido utilizado em ensaios ecotoxicológicos de efeito crônico com base na verificação do desenvolvimento embrionar,

demonstrando ser uma fase crítica para o crescimento normal do indivíduo, sendo este fato relacionado ao sucesso reprodutivo das espécies.

A concentração média de naftaleno que causou efeito no desenvolvimento embriolarval a 50% dos embriões de *Lytechinus variegatus* foi $CE(I)_{50-24h} = 0,30 \text{ mg.L}^{-1}$ de naftaleno, porém este resultado teve um coeficiente de variação um pouco elevado, chegando a 67%. De acordo com EPA (1991), o coeficiente de variação entre os resultados dos ensaios ecotoxicológicos, deve estar compreendido na faixa de 30%. Neste estudo, a variabilidade encontrada entre os resultados dos ensaios foi acima do recomendado. Taban (2004) verificou inibição no desenvolvimento embriolarval de *Strongylocentrotus droebachiensis* em naftaleno e obteve $CE(I)_{50-24h} = 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$. As condições de ensaios foram similares e houve diferença entre as duas espécies em uma ordem de magnitude.

Segundo Lönning & Hagström (1975) os efeitos dos HPAs, de baixo peso molecular, no desenvolvimento de embriões de ouriço-do-mar podem também provocar efeitos agudos. Analisando especificamente o naftaleno (Falk-Petersen *et al.*, 1982) registrou além de irregularidades nos padrões de clivagem e formação da blástula e gástrula, mortalidade das larvas durante os ensaios, caracterizando-se como um HPA de alta toxicidade a ouriços-do-mar.

5.2.2. Ensaio de sensibilidade de *Lytechinus variegatus* ao DSS

Segundo o Environment Canada (1990) a habilidade de uma substância de referência realmente detectar lotes de organismos debilitados, ou geneticamente diferentes, ainda é pouco comprovada experimentalmente. Assim, segundo este órgão ambiental, o objetivo dos ensaios ecotoxicológicos com substâncias de referência é avaliar a repetibilidade do método analítico em um determinado lote de organismos. Substâncias de referência são utilizadas para avaliar as condições de sensibilidade dos organismos-teste, sejam eles provenientes do campo ou mesmo os cultivados no laboratório. Com ensaios utilizando substâncias de referência, é possível obter resultados comparáveis, ou seja, que apresentem boa repetibilidade e reprodutibilidade, podendo assim avaliar variações sazonais dos organismos em resposta a um determinado reagente (Zagatto & Bertoletti, 2006).

De acordo com os cálculos, a concentração média que causou efeito deletério a 50% dos embriões de *Lytechinus variegatus*, após 24 horas de exposição, foi $CE(I)_{50-24h} = 2,89 \text{ mg.L}^{-1}$ de DSS. Mastroti (1997) e Rachid (1996) obtiveram, respectivamente, CE_{50-24h} de $1,89 (1,83-1,97) \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,07 (1,87-2,29) \text{ mg.L}^{-1}$ para a mesma substância e mesmo organismo-teste. Outros estudos como o de Pereira *et al.* (2000) a $CE(I)_{50-24h}$ foi calculada em $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de DSS e para CETESB (1991) a $CE(I)_{50-24h}$ foi de $3,51 \text{ mg.L}^{-1}$, indicando uma menor sensibilidade ao DSS.

5.3. Copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp

Copépodos bentônicos são amplamente empregados na avaliação de toxicidade de efeito crônico e agudo com amostras ambientais, da mesma forma que para substâncias químicas específicas. Segundo Lotufo (1997) *Nitocra lacustris* e *Schizopera knabeni* são frequentemente utilizados em ensaios ecotoxicológicos de efeito subletal com HPAs. Tal fato ocorre, de acordo com Bengtsson (1981), devido a fácil manutenção dos organismos em cultivos laboratoriais e a eficiente sensibilidade a diversos produtos químicos.

Nos estudos realizados por Kusk & Petersen (1997) e Raisuddin *et al.* (2007) os copépodos são conhecidos por serem especialmente sensíveis a diferentes xenobióticos, e por esta razão, têm sido utilizado como grupo alvo de ensaios ecotoxicológicos para proteção de ameaças ambientais. Para Barata *et al.* (2002) estes organismos, na presença de pequenas concentrações de HPAs, demonstram grande sensibilidade ocorrendo uma redução no sucesso de eclosão dos ovos, que inibe o recrutamento de náuplios, e consequentemente indivíduos adultos, resultando em danos para a comunidade zoobentônica.

5.3.1. Ensaio de efeito crônico e agudo com o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp

Várias espécies de copépodos harpacticóides têm sido utilizadas em ensaios ecotoxicológicos de efeito agudo, enquanto que poucas espécies têm sido utilizadas para avaliar os efeitos de contaminantes sobre a reprodução

(Suderman & Marcus, 2002), sendo menores ainda as pesquisas voltadas ao efeito dos HPAs na reprodução de copépodos bentônicos (Ustach, 1979).

Copépodos são vulneráveis a contaminação por HPAs em todas as fases do seu ciclo de vida (Wright *et al.*, 1996), mas seu efeito sobre os primeiros estágios de vida é particularmente mais delicado devido a maior sensibilidade desta fase de desenvolvimento (Tester & Costlow, 1981). Efeitos subletais são ecologicamente relevantes e substâncias tais como o naftaleno pode afetar drasticamente a reprodução destes organismos (Berdugo *et al.*, 1977).

Em estudo realizado por Cowles & Remillard (1983), foi identificado efeitos significativos sobre a viabilidade dos ovos de copépodos quando fêmeas de *Centropages hamatus* foram expostas a diferentes concentrações de naftaleno. Estes autores sugeriram que os produtos de hidrocarbonetos de petróleo podem provocar danos fisiológicos, tais como interrupção da oogênese. Desta forma, estes contaminantes podem afetar severamente a dinâmica das populações de copépodos.

Como pôde ser observado no presente estudo, fêmeas ovadas de *Nitokra* sp, expostas ao naftaleno durante 96 horas, mostraram queda na taxa de eclosão de ovos. Foi observada uma redução significativa no número de ovos eclodidos da maior concentração de naftaleno em relação ao número de ovos eclodidos no controle. No controle foi observado que para cada dez fêmeas era obtido em média 64 ovos eclodidos, e na presença de naftaleno, este número de ovos era significativamente menor, sendo que na maior concentração utilizada nos ensaios, 2,0 mg.L⁻¹ de naftaleno, a média obtida foi de nove ovos eclodidos para o mesmo número de fêmeas.

Apesar do tempo de exposição ter sido diferentes, resultados semelhantes foram obtidos em estudo realizado por Calbet (2007) onde fêmeas de *Paracartia grani* foram expostas durante 48 horas ao naftaleno e também sofreram uma significativa redução no número de ovos eclodidos, de tal maneira que a taxa de reprodução variou de 25 ovos eclodidos no controle para três ovos na concentração de 0,8 mg.L⁻¹ de naftaleno.

O ensaio ecotoxicológico de efeito agudo pode ser definido como aquele que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias. Devido à facilidade na execução e curta duração, estes ensaios foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base dos dados ecotoxicológicos (Birge *et al.*, 1985).

No presente estudo foram utilizadas concentrações mais altas, para ensaios de efeito agudo com *Nitokra* sp e, a CL_{50-96h} média foi de 13,4 mg.L⁻¹ de naftaleno. Outros estudos utilizando copépodos apresentaram maior sensibilidade, como Ott *et al.* (1978) utilizando o copépodo calanoide *Eurytemora affinis* encontraram a CL_{50-48h} em 2,0 mg.L⁻¹ de naftaleno, Barata *et al.* (2005) encontraram a CL_{50-48h} de 3,1 mg.L⁻¹ a 5,1 mg.L⁻¹ de naftaleno para harpacticoida *Tisbe battagliai* e de 2,9 a 7,6 mg.L⁻¹ de naftaleno para *Oithona davisae*. Calbet *et al.* (2007) obtiveram a CL_{50-48h} de 2,54 mg.L⁻¹ de naftaleno para *Paracartia grani* e Neverdal *et al.* (2006) obtiveram CL_{50-96h} em 7,02 mg.L⁻¹ de naftaleno para *Calanus finmarchicus*. De maneira geral a sensibilidade do *Nitokra* sp foi menor quando comparada a estes estudos.

5.3.2. Ensaio de sensibilidade de *Nitokra* sp ao DSS

Exemplares de *Nitokra* sp vem sendo cultivado há mais de uma década no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos (LEcotox) do IOUSP e, desde o início do cultivo, a sensibilidade foi avaliada com dicromato de potássio como substância de referência. Porém, devido à forte ação residual de baixa degradabilidade deste metal (Peláez-Rodríguez *et al.*, 2000) este vem sendo substituído por um surfactante como substância de referência. O DSS possui ação rápida, não seletiva e age dentro de uma faixa menor de concentrações, tendo uma alta degradação (Environmental Canada, 1990).

A sensibilidade de *Nitokra* sp ao DSS apresentou uma média entre todos os ensaios de CL_{50-96h} 7,26 mg.L⁻¹. Estudos realizados por Nipper *et al.* (1993) utilizando os copépodos *Acartia lilljeborgi*, *Acartia tonsa* e *Eurytemora affinis* obtiveram a CL_{50-96h} em 2,22 mg.L⁻¹, 2,60 mg.L⁻¹ e 2,66 mg.L⁻¹ de DSS, respectivamente. CETESB (1991) utilizou os copépodos *Temora stylifera* e

Acartia lilljeborgi e a CL_{50-96h} foi de 2,60 mg.L⁻¹ e 2,22 mg.L⁻¹, respectivamente, valores esses muito similares aos obtidos por Nipper (*op. cit.*).

Cabe ressaltar, que para os ensaios ecotoxicológicos com naftaleno e DSS, o organismo-teste *Nitokra* sp demonstrou maior resistência quando comparado a outros copépodos, indicando ser um menos suscetível a estas substâncias que os demais organismos pertencentes a mesma sub-classe. O fato de *Nitokra* sp ser estuarino e os demais citados serem marinhos pode indicar uma diferença fisiológica, inerente ao habitat de origem. Estudos com este enfoque poderão ser abordados futuramente.

5.4. Anfípodo estuarino bentônico *Leptocheirus plumulosus*

Os anfípodos possuem uma grande relevância ecológica, uma vez que se trata de um dos principais componentes da biomassa e da diversidade, em ambientes caracterizados por um leque de salinidades muito variadas (Ré, 1996). São fonte de alimento para peixes e outros animais que se alimentam também de vegetais e de detritos (Allaby, 1999), caracterizados como componentes importantes das comunidades bentônicas estuarinas e marinhas, estão amplamente distribuídos e são tolerantes a uma gama de variáveis ambientais, adequados para o manuseio e cultivo em laboratório (Casado-Martinez *et al.*, 2007).

Uma espécie pode ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos quando apresenta alta sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, como ocorre com o anfípodo *Leptocheirus plumulosus* (Schlekat 1995; DeWitt *et al.*, 1992a). Sua sensibilidade deve ser relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos garantindo assim, boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. São necessários conhecimentos sobre a biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para a realização dos ensaios.

5.4.1. Ensaio de efeito agudo com o anfípodo estuarino *Leptocheirus plumulosus*

Anfípodos têm sido extensivamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos com amostras de água marinha, estuarina e com sedimentos de água doce e salina (Swartz *et al.*, 1985; DeWitt *et al.*, 1992a; Schlekat *et al.*, 1992; ASTM, 2000a). O anfípodo *Leptocheirus plumulosus* segundo Swartz *et al.* (1994) é reconhecido como uma boa escolha para a avaliação de alguns agentes tóxicos e os resultados obtidos nos ensaios podem ser correlacionados positivamente com alterações nas comunidades bentônicas.

A sensibilidade de um organismo-teste está relacionada com a via de exposição e resposta bioquímica para determinado contaminante. Landrum (1989) relata que algumas espécies de anfípodos, podem acumular HPAs por adsorção direta pela parede do corpo ou por absorção através do tegumento (Knezovich *et al.*, 1987). Contudo, no presente estudo foi relatada a concentração de efeito letal do naftaleno para estes organismos.

Neste estudo, após 96 h de exposição, a CL₅₀ média de naftaleno para *Leptocheirus plumulosus* obtida pelo cálculo de letalidade dos organismos, foi 2,38 mg.L⁻¹ de naftaleno. Outro anfípodo bentônico, *Grandidierella japonica* distribuído na costa da Coreia, foi utilizado como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos similares as condições deste estudo e mostrou-se um pouco mais resistente ao naftaleno com CL_{50-96h} = 5,3 mg.L⁻¹ (Lee, 2005).

McGee *et al.* (1999) em ensaios de efeito agudo, utilizaram a mesma substância-teste, porém o ensaio foi realizado com sedimento, durante 10 dias de exposição de *L. plumulosus* resultou na concentração letal a 50% dos indivíduos de 2,1 mg.kg⁻¹ de naftaleno. A sensibilidade de *Leptocheirus plumulosus* comparado a outros anfípodos foi relatada por McGee *et al.* (1993) como tão sensível quanto organismos de água doce como o anfípodo *Hyaella azteca* e *Ampelisca abdita*.

5.4.2. Ensaio de sensibilidade de *Leptocheirus plumulosus* ao DSS

O cultivo do anfípodo *Leptocheirus plumulosus* no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos (LEcotox) do IOUSP é recente. Os primeiros ensaios de sensibilidade realizados com substância de referência apresentaram uma concentração média de CL_{50-96h} = 2,70 mg.L⁻¹ de DSS.

Outros microcrustáceos utilizando DSS em ensaios de sensibilidade apresentaram, após 96 horas de exposição, concentração letal a 50% dos indivíduos de 6,60 mg.L⁻¹ de DSS para *Mysidopsis bahia* (Nipper *et al.*, 1993) e valores similares ao apresentado neste estudo, 2,62 mg.L⁻¹ de DSS para *Artemia salina* (CETESB, 1991) e 2,30 mg.L⁻¹ de DSS para *Mysidopsis juniae*.

5.5. Análise espectrofotométrica de decaimento do naftaleno

A espectrofotometria ultravioleta baseia-se na absorbância de luz por parte da amostra ao passar através de qualquer radiação eletromagnética. Normalmente isto ocorre entre as faixas do ultravioleta ao infravermelho, em um dado comprimento de onda. Sabe-se que os compostos com anéis aromáticos, como o naftaleno, absorvem luz na região do ultravioleta e utilizando o método proposto por Neff & Anderson (1975) foi quantificada a taxa de evaporação do naftaleno.

Seguindo a lei de Lambert-Beer, a concentração do naftaleno no decorrer das horas pode ser quantificado através da relação da concentração deste composto com a absorbância. Neste estudo, a absorbância das amostras foi proporcional à concentração do composto. Quando existe a redução dos valores de absorbância das amostras, este fato é classificado como degradação do composto, neste caso a evaporação do naftaleno.

Após as 96 horas, intervalo de tempo de maior interesse neste estudo, a porcentagem de evaporação variou entre 21% em 15 mg.L⁻¹ de naftaleno e 29% em 0,50 mg.L⁻¹ de naftaleno. Neste caso, vale a pena salientar que em todos os tratamentos foram utilizados valores nominais e não reais de naftaleno. No entanto, foi possível estimar a perda por evaporação nas mesmas condições dos ensaios. Obviamente na natureza fatores como hidrodinamismo, degradação bacteriana entre outros podem contribuir para evaporação deste composto com maior intensidade.

5.6. Sensibilidade ao naftaleno entre os diferentes níveis tróficos

Em razão da multiplicidade de espécies existentes e das inúmeras relações de dependência entre elas, Rand (1995) preconizou que os ensaios de potenciais efeitos no ambiente fossem realizados com, no mínimo, três

organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos, de modo a obter um resultado com o organismo mais susceptível, estimando com maior segurança o impacto. Assim, são propostas normas ou técnicas com organismos diversos e muitas vezes indicados organismos-teste exóticos para ensaios ecotoxicológicos. Porém, é preferível o uso de espécies nativas como sentinelas ambientais ao invés da utilização de espécies exóticas.

No presente estudo foram utilizadas três espécies nativas, e uma espécie de anfípodo exótico *Leptocheirus plumulosus*, pertencente a regiões estuarinas do Hemisfério Norte. Contudo, o método aplicado para esta espécie foi a ABNT NBR 15638 (2008), que requer condições físicas e químicas similares a regiões tropicais. Este organismo-teste além de ser um importante representante de ecossistemas estuarinos também pode ser comparado com os organismos nativos de nossa costa.

Segundo Rust *et al.* (2004) e Ferguson & Chandler (1998), comparando *L. plumulosus* com outras espécies, este anfípodo apresenta uma taxa relativamente baixa no metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sugerindo uma maior sensibilidade a contaminantes HPAs.

Neste estudo, os ensaios de efeito agudo realizados com o *L. plumulosus*, apresentaram alta sensibilidade, cujas respostas letais podem ser consideradas uma abordagem simples, que permitem a identificação apenas dos últimos sinais de efeito biológico, em uma alta concentração de substância tóxica.

Apesar de terem sido realizados ensaios de efeito crônico e agudo com diferentes organismos, as concentrações de efeito agudo do naftaleno para *L. plumulosus* foram relativamente baixas refletindo sua grande susceptibilidade ao composto tóxico. Este consumidor secundário demonstrou ser pouco mais resistente que os organismos utilizados em ensaios crônicos, *Nitokra* sp e *Lytechinus variegatus*.

Neste contexto, cabe ressaltar que a maior parte do impacto quando há o *input* de HPAs de baixo peso molecular causam efeitos agudos nos

organismos devido à disponibilidade na coluna d'água (Glegg & Rowland, 1996; Lee & Page, 1997; Gesteira *et al.*, 2003; Arana *et al.*, 2005).

Como consumidor primário, o copépodo *Nitokra* sp utilizados nos ensaios agudos, apresentou maior resistência ao naftaleno, o que é corroborado por Berrojalbiz *et al.* (2009) ao constatarem que copépodos podem ser capazes de metabolizar alguns HPAs. Estes autores analisaram pelotas fecais de copépodos adultos e a eliminação de HPAs, a partir da ingestão de produtores primários contaminados foi baixa comparada ao metabolismo ligeiramente elevado destes organismos.

Ao contrário, os ensaios de efeito crônico com *Nitokra* sp, apresentaram maior sensibilidade sendo observado efeito em baixas concentrações de naftaleno. Outros estudos, como o de Cowles & Remillard (1983), avaliaram os efeitos deletérios do naftaleno em fêmeas ovadas, desde a produção inicial de ovos (oogênese), como a viabilidade da eclosão dos ovos na presença de naftaleno (Calbet, 2007) e em todos os estudos os danos foram eminentes.

O ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, echinoidea herbívoro, exerce um controle significativo na população de várias espécies de algas (Hopp & Herding, 1996), essa característica lhe confere grande importância ecológica, no funcionamento dos ecossistemas aquáticos (Fliedner & Klein, 1996). Os estágios de desenvolvimento embrionário e larval de invertebrados marinhos são menos tolerantes aos compostos tóxicos quando comparados a indivíduos adultos (Marin *et al.* 1991; Ringwood, 1992). Como esperado, dentre todos os organismos utilizados neste estudo, os embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* foi o mais sensível ao naftaleno.

Os produtores primários são essenciais ao funcionamento dos ecossistemas aquáticos, uma vez que participam do primeiro nível trófico da cadeia alimentar e fornecem oxigênio e substâncias orgânicas para outras formas de vida (Kong, 2010). São amplamente distribuídos no ambiente marinho e, por causa de sua mobilidade reduzida podem ser impactados, por exemplo, por um derramamento de óleo.

De acordo com Rosato (1997) a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo é apresentada por diversos gêneros de microrganismos, principalmente bactérias, fungos e leveduras. Entretanto, cianobactérias e algumas microalgas também possuem essa capacidade. No presente estudo, o ensaio para verificar o efeito crônico com a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e naftaleno, foi avaliado como o mais resistente de todos os organismos utilizados. Como anteriormente comentado, as microalgas verdes em especial, são microorganismos capazes de metabolizar HPAs de baixo peso molecular, contribuindo assim com o processo biológico de remediação, ou seja, auxiliando na degradação de substâncias tóxicas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas (USEPA, 1990).

Resumidamente, neste estudo foram realizados dois tipos de ensaios para avaliar o efeito do naftaleno em diferentes espécies de diferentes níveis tróficos. Segundo os autores listados na Tabela 27, cada organismo responde com mecanismos de absorção distintos, podendo metabolizar o composto tóxico em questão.

Tabela 27. Metabolismo dos organismos-teste a HPAs de baixo peso molecular.

Organismo-teste	Possível metabolização HPA de baixo peso molecular	Referências
Microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Apresentam potencial para transformar o naftaleno em 4 metabólitos: I-naftol, 4-hidroxi-I-tetralona, cis-naftaleno diidrodíol, e trans-naftaleno diidrodíol	Cerniglia (1980)
Ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	Os padrões observados na capacidade de metabolizarem HPAs apresentaram-se muito baixos	Bechmann & Taban (2004)
Copépodo bentônico <i>Nitokra</i> sp	A eliminação de HPAs em pelotas fecais foi relativamente baixa comparada ao metabolismo ligeiramente elevado de copépodos bentônicos	Berrojalbiz <i>et al.</i> (2009)
Anfípodo bentônico <i>Leptocheirus plumulosus</i>	Baixa taxa metabólica e maior sensibilidade a estes compostos comparado com outros anfípodos	Rust <i>et al.</i> (2004); Ferguson & Chandler (1998)

5.7. Limites de concentração de naftaleno em leis nacionais

Um dos objetivos da ecotoxicologia é o desenvolvimento de protocolos de ensaios que permitam definir limiares de toxicidade que sirvam como valores orientadores para as entidades reguladoras numa tomada de decisão.

No Brasil, contamos com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), órgão responsável pelo desenvolvimento de protocolos de ensaios ecotoxicológicos e, dentre outros, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), órgão ambiental que contribui para padronização destes ensaios. A aplicação de ensaios padronizados é muito favorável, pois se tornam uniformes, facilitando a reprodução entre diversos laboratórios, além da comparação dos resultados.

Os ensaios ecotoxicológicos avaliam o potencial de risco ambiental dos contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação. Além disso, há alguns anos as análises ecotoxicológicas vem sendo exigidas por leis ambientais no Brasil. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) refere-se, em algumas resoluções como a 357, sobre a classificação dos corpos de água no capítulo IV, nos § 1 e 2 do artigo 34, que “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados utilizando organismos aquáticos”.

A caracterização do efeito tóxico, portanto faz-se necessária para definir o grau de periculosidade da substância tóxica e o efeito biológico usado como índice de efeito de um contaminante em determinado organismo (USEPA, 1989). A partir dela pode-se determinar uma máxima concentração permitida de um contaminante no ambiente que seja considerado seguro, buscando desta forma, gerenciar o risco e permitir a entrada segura destas substâncias no ambiente.

A legislação federal CONAMA 357/2005 tem inserido dentro de sua resolução valores máximos, para uma série de potenciais contaminantes, que garantam a proteção da vida aquática. Porém, cabe ressaltar, que muitos compostos tóxicos, passíveis de causar danos a organismos aquáticos não estão listados nesta resolução, como ocorre com o naftaleno. A resolução que regulamenta a avaliação do sedimento a ser dragado, CONAMA 344/2004 apresenta uma lista de contaminantes, incluindo o naftaleno, com valores máximos destes contaminantes em unidade de material seco. Estes dados

estão baseados nos valores de referência de qualidade de sedimentos canadense para proteção e manutenção da vida aquática, elaborado pelo ministério do meio ambiente do Canadá em 2002. Estes limites estão baseados em condições ambientais do Hemisfério Norte.

Estudos com HPAs provenientes do Kuwait indicaram que toxicidade destas substâncias pode aumentar significativamente conforme a temperatura aumenta (Saeed *et al.*, 1998). Portanto, foi definido que quanto maior a temperatura, maior a toxicidade de hidrocarbonetos de petróleo em organismos marinhos, como exemplo em algas (Gaur & Singh, 1991) e crustáceos (Tatem *et al.*, 1978). É possível, por conseguinte, que os efeitos potenciais de contaminação por hidrocarbonetos em organismos marinhos e estuarinos possam ser mais graves em regiões tropicais e subtropicais do que em climas temperados. Com isso, seria de grande valia, que dentro das resoluções CONAMA os limites estabelecidos para os contaminantes fossem enquadrados em condições ambientais nacionais.

O naftaleno é comumente encontrado no meio ambiente aquático. Nos Estados Unidos da América foram encontradas em ambientes hídricos naturais concentrações variando de 0,00005 até mais de 66 mg.L⁻¹ de naftaleno (Environment Canadá, 1993; ATSDR, 1995). A EPA (2002) analisou 94.915 amostras de água de poços de abastecimento urbano e rural dos Estados Unidos e relatou que 90% das amostras, estavam contaminadas em níveis acima do permitido, com concentrações entre 0,073 mg.L⁻¹ e 0,9 mg.L⁻¹ de naftaleno. Um estudo realizado por (Pereira *et al.*, 1996) analisou amostras de águas no estuário do Rio São Joaquim, na Califórnia, e encontrou concentrações de até 14 mg.L⁻¹ de naftaleno. Em um estudo realizado por Goerlitz (1992) amostras de águas subterrâneas na cidade de Nova York chegaram a ultrapassar 15 mg.L⁻¹ de naftaleno. Já em águas pluviais no estado de Oregon, nos Estados Unidos, foram detectadas concentrações na faixa de 0,008 mg.L⁻¹ a 0,780 mg.L⁻¹ de naftaleno. Os dados existentes no Brasil referem-se apenas ao sedimento.

Os ensaios ecotoxicológicos realizados neste estudo podem contribuir com dados eficientes para futuros critérios específicos de qualidade da água e

tipo de contaminação a ser avaliada, uma vez que no Brasil, ainda não há valores nacionais para naftaleno adotados pelos órgãos de fiscalização e regulamentação para a manutenção da qualidade dos corpos hídricos.

6. CONCLUSÃO

Para as condições de ensaio descritas neste trabalho concluiu-se que:

- A toxicidade crônica do naftaleno para a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* (inibição do crescimento algáceo) teve o valor médio de $CI(I)_{50-96h}$ em 29,01 mg.L⁻¹ de naftaleno.
- O naftaleno apresentou efeito algistático em células da microalga *Dunaliella tertiolecta*.
- A toxicidade crônica do naftaleno para embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (desenvolvimento embriolarval) teve o valor médio da $CE(I)_{50-24h}$ em 0,30 mg.L⁻¹ de naftaleno.
- A toxicidade crônica para o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp (eclosão dos ovos) teve o valor médio de $CENO(I)$ em 0,19 mg.L⁻¹ e $CEO(I)$ em 0,40 mg.L⁻¹ de naftaleno.
- A toxicidade aguda para o copépodo estuarino bentônico *Nitokra* sp (letalidade) teve o valor médio da $CL(I)_{50-96h}$ em 13,4 mg.L⁻¹ de naftaleno.
- A toxicidade aguda para o anfípodo estuarino bentônico *Leptocheirus plumulosus* (letalidade) teve o valor médio da $CL(I)_{50-96h}$ em 2,38 mg.L⁻¹ de naftaleno
- Dentre os quatro organismos de diferentes níveis tróficos utilizados neste estudo, o produtor primário *Dunaliella tertiolecta* apresentou maior resistência ao naftaleno e o consumidor secundário *Lytechinus variegatus* apresentou maior sensibilidade a esta substância.
- Uma vez que um dos objetivos deste estudo foi propor valores seguros de naftaleno para qualidade de água e o ensaio crônico com embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* apresentou maior sensibilidade entre as espécies utilizadas, o valor seguro que pode ser proposto neste estudo, é a média de $CENO$ em 0,07 mg/L⁻¹ de naftaleno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S., 2002. Avaliação da Qualidade de Sedimentos do Sistema Estuarino de Santos. SP. Brasil. Doc. Thesis. Universidade de São Paulo. Instituto Oceanográfico. São Paulo. p. 290.

ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas, 2005. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). NBR 12648.

ABNT - Associação Brasileira de Normas e Técnicas, 2008. Qualidade de água - Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarinos com anfípodos. NBR 15638.

ABNT- Associação Brasileira de Normas e Técnicas, 2011. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata: Echinoidea). NBR 15350.

AIDAR, E.; SOUSA, E. C. P. M.; BRASIL-LIMA, G. M. S., 2002. Testes de toxicidade com microalgas In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M, 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha. Ed. artes gráficas e indústria Ltda., São Paulo, p. 51-61.

ALLABY, M., 1999. A Dictionary of Zoology. In: Kline Science Library Reference (ed). QL9 C66X. Oxford: Ed. Oxford University Press, p. 66.

ALLEN, H., 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin Mar. Pollut. Bull, v. 2, p. 138–140.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – “Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e Gás Natural – Panorama Internacional - 2012”. Disponível no endereço eletrônico www.anp.gov.br.

ARAGÃO, M. A.; **ARÚJO**, R. P. A., 2006. Métodos de ensaio de toxicidade com organismos aquáticos. IN: **ZAGATTO**, P.A.; **BERTOLETTI**, E. (ed). Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. Rima Editora, p. 464.

ARANA, H. A.; **WARWICK**, R. M.; **ATTRILL**, M. J.; **ROWDEN**, A. A.; **GOLDBOUCHOT**, G., 2005. Assessing the impact of oil-related activities on benthic macroinfauna assemblages of the Campeche shelf, southern Gulf of Mexico. Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 289, p. 89-107.

ARMOUR, M. A., 1996. Hazardous laboratory chemicals disposal guide. Boca Raton: Lewis, p. 546.

ASTM – American Society for testing and Materials, 1992. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. E1218-90, p. 874-885.

ASTM – American Society for testing and Materials, 1992. Standard guide for conducting 10 days static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. In: Annual Book of Standards: Water and Environmental Technology. Philadelphia. E-1367-90, p. 1083-1115.

ASTM – American Society for testing and Materials, 2000a. Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine invertebrates. E1367-03.

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995. Toxicological profile for naphthalene, 1-methylnaphthalene, and 2-methylnaphthalene. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Research Triangle Park.

BARATA, C.; BAIRD, D. J.; MEDINA, M.; AALBALAT, A.; SOARES, A. M. V. M., 2002. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 230, p. 183–194.

BARATA, C.; CALBET, A.; SAIZ, E.; ORTIZ, L.; BAYONA, J. M., 2005. Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons to the copepod *Oithona davisae*. Environ. Toxic. and Chem. v. 24, p. 2992–2999.

BARBIERI, E.; NGAN, P. V.; GOMES, V., 2000. Efeito do LAS-C12 no metabolismo de rotina de tainhas em função da temperatura em três salinidades. In: Espíndola, E. L. G.; BOTTA-PASCHOA, C. M. R.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C. & OLIVEIRA-NETO, (ed). Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI. São Carlos: Ed. RiMa, p. 293 - 308.

BEIRAS, R.; FERNANDEZ, N.; BELLAS, J.; BESADA, V.; GONZALEZ-QUIJANO, A.; NUNES, T., 2003. Integrative assessment of marine pollution in galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation and embryo-larval toxicity bioassays. Chemosphere v. 52, p. 1209–1222.

BENGTSSON, B. E., 1981. The harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea) as a test organism in brackish water toxicological bioassays. INSERM 106- 42 I-430.

BENLAHCEN, K. T.; CHAOUI, A.; BUDZINSKY, H.; BELLOCQ, J.; GARRIGUES, P. H., 1997. Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Mediterranean Coastal Sediments. *Marine Pollution Bulletin*. v. 34, n. 5, p. 298-305.

BERDUGO, V.; HAALS, R. P.; O'HA, S. C. M., 1977. The effect of petroleum hydrocarbons on reproduction of an estuarine planktonic copepod in laboratory cultures. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 8, p. 13843.

BERROJALBIZ, N.; LACORTE, S.; CALBET, A.; SAIZ, E.; BARATA, C.; DACHS, J., 2009. Accumulation and cycling of polycyclic aromatic hydrocarbons in zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* v. 43, p. 2295–2301.

BÍCEGO, M. C., 1996. Alguns aspectos sobre a degradação fotoquímica e a deterioração de hidrocarbonetos do petróleo no ambiente marinho. Tese de doutorado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BILLIARD, S.M.; TIMME-LARAGY, A. R.; WASSENBERG, D.M.; COCKMAN, C.; DI GIULIO, R.T., 2006. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic development toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon to zebrafish. *Toxicology Science*. v. 92, p. 526-536.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G., 1985. Short-term fish and amphibian test for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*.

BOONYATUMANOND, R.; WATTAYAKORN, G.; TOGO, A.; TAKADA, H., 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 942-956.

BOROWITZKA, M.; BOROWITZKA, L., 1988. *Dunaliella*. In BOROWITZKA, M; BOROWITZKA, L. (ed) *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press, p. 27-58.

BOROWITZKA, M. A.; SIVA, C. J., 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J. Appl. Phycol.*, v. 19, p. 567-590.

BOUSFIELD, E. L., 1973. *Shallow water gammaridean amphipoda of New England*. Ithaca. NY: Cornell University Press, p. 312.

BROMAN, D.; NÄF. C.; ROLFF. C.; ZEBBUHR. Y., 1991. Occurrence and dynamics of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and polycyclic aromatic hydrocarbons in the mixed surface layer of remote coastal and offshore waters of the Baltic. *Environ. Sci. Technol.* v. 25, p. 1850–1864.

CALBET, A.; SAIZ, E.; BARATA. C., 2007. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on the marine copepod *Paracartia grani*. *Marine Biology*, v. 151, p. 195-204.

CASADO-MARTINEZ, M. C.; FORJA, J. M.; DELVALLS, T. A., 2007. Direct comparison of amphipod sensitivities to dredged sediments from Spanish ports. *Chemosphere*, v. 68, p. 677–685.

CDUM - Convenção das Nações Unidas sobre o direito do mar., 1985. Versão em Língua Portuguesa, DHN.

CELINO, J. J.; **QUEIROZ**, A. F. S., 2006. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. REM - Revista Escola de Minas, v. 59, p. 265-270.

CETESB, 1990. Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Relatório anual. São Paulo, CETESB, p. 28.

CETESB, 1991. Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos - Testes com organismos marinhos.

CETESB, 1999. Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. (Echinodermata: Echinoidea). Norma Técnica L5.250. São Paulo, p. 40.

CETESB, 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 230.

CERNIGLIA, C. E.; **GIBSON**, D. T.; **BAALEN**, C., 1980a. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. J. Gen. Microbiol., v. 116, p. 495–500.

CERNIGLIA, C. E., 1992. Biodegradation of polycyclicaromatic hydrocarbons. Biodegradation, v. 3, p. 351-368.

CESAR, A.; MARÍN, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R., 2004, Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. Sci. Mar, v. 68, p. 205-213.

CHANDLER, G. T.; CARY, T.; VOLTZ, D.; WALSE, S.; FERRY, J.; KLOATERHAS, S., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility and reproduction. Environ. Toxicol. Chem. v. 23, p. 117-124.

CHAPMAN, P. M.; LONG, E. R., 1983. The use of bioassay as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. Mar. Pollut. Bull, v. 14, p. 81-84.

CHAPMAN, P. M., 1995. Ecotoxicology and pollution. Marine Pollution Bulletin, v. 31, p. 167–177.

CHAPMAN, P. M.; McDONALD, B. G.; LAWRENCE, G.S., 2002. Weight of evidence frameworks for sediment quality and other assessments. Hum. Ecol. Risk Assess. V. 8, p. 1489–1515.

CHEN, Y.; ZHU, L.; ZHOU, R., 2007. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface water and sediment from Qiantang River, China. Journal of Hazardous Materials, v. 141, p. 148- 155.

CHIU, S. T., 1988. *Anthocardis crassispina* (Echinodermata: chinoidea) grazing epibenthic macroalgae in Hong Kong. Asian Marine Biology, v. 5, p. 123-132.

CLARK, C.; **HENDERSON**, T.; **ROYER**, R.; **BROOKS**, A.; **MCCLELLAN**, R.; **MARSHALL**, W.; **NAMAN**, T., 1982. Mutagenicity of diesel exhaust particulate extracts: influence of fuel composition in two diesel engines. Fundam Appl Toxicol, v. 2, p. 38–43.

CORNER, E. D. S., 1978. Pollution studies with marine plankton. Part I. Petroleum hydrocarbons and related compounds, Advances in Marine Biology v. 15, p. 289–380.

CRUZ, A. C., 2001. Seleção de substâncias orgânicas como referencia em testes de toxicidade com embriões de ostra *Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1928: Controle da qualidade analítica de testes ecotoxicológicos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia.

DE LUCA, G.; **FURESI**, A.; **MICERA**, G.; **PANZANELLI**, A.; **PIU**, P.C.; **PILO**, M.I.; **SPANO**, N.; **SANNA**, G., 2005. Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy). Marine Pollution Bulletin, v. 50, p.1223–1232.

DEWITT, T. H.; **REDMOND**, M. S. D.; **SEWALL**, J. E.; **SWARTZ**, R. C., 1992a. Development of a chronic sediment toxicity test for marine benthic amphipods. U.S. Environmental Protection Agency. CBP/TRS/89/93.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E., 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19. ed. American Public Health Association, Washington. p. 1040 .

ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D., 2003. Priority list for persistent organic pollutants and emerging contaminants. Trac-Trends in Analytical Chemistry v. 22, p. 655-665.

ENVIRONMENT CANADA, 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Report EPS 1/RM/12. p. 85.

ENVIRONMENT CANADA, 1992. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Environmental Protection Series, Report. EPS 1/RM/12.

ENVIRONMENT CANADA, 1993. Priority substances list assessment report on creosote-impregnated waste material. Report of the chemicals evaluation division, Quebec, Canada, Environment Canada. p. 25.

ENVIRONMENT CANADA, 1999. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. Report of the chemicals evaluation division, Quebec, Canada.

ENVIRONMENT CANADA, 2008. Department of the Environment, Department of Health. Screening Assessment for Naphthalene. v. 91, p. 20-3.

EPA – Environmental Protection Agency., 1989. Risk Assessment Guidance for Superfund, Volume I, Human Health Evaluation Manual (Part A), Interim Final.89/003. Washington, D.C. December. EPA/ 540/1.

EPA – Environmental Protection Agency., 1998. Health effects assessment for naphthalene. Report of the U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of health and environmental assessment, office of research and development. EPA/ 600/8-89/094.

FALANDYSZ, J., RAPPE, C., 1997. Specific pattern of tetrachloronaphthalenes in black cormorant. Chemosphere v. 35, p. 1737–1746.

FALK-PETERSEN, L.; SAETHRE J.; LONNING, S., 1982. Toxic effects of naphthalene and methyl-naphthalenes on marine plankton organisms. Sarsia v. 67, p. 171-178.

FALK-PETERSEN, I. B., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of Ekofisk crude oil, crude oil fractions, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. Sarsia v. 64, p. 161-169.

FAY, E. F.; SILVA C. M. M., 2004. Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. In: SILVA, C. M. de S. FAY, E. F. (ed) Agrotóxicos e ambiente. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 108-143.

FERGUSON, P.; CHANDLER, G. T., 1998. A laboratory and field comparison of sediment polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation by the cosmopolitan

estuarine polychaete *Streblospio benedicti*. Marine Environmental Research v. 45, p. 387-401.

FERNÁNDEZ, N.; CESAR, A.; SALAMANCA, M. J.; DELVALLS, T. A., 2006. Toxicological characterisation of the aqueous soluble phase of the Prestige fuel-oil using the sea-urchin embryo bioassay. Ecotoxicology (London), v. 15, p. 593-599.

FLIEDNER, A.; KLEIN, J., 1996. Effects of Lindane on the planktonic community in Freshwater microcosms. Ecotoxicol. Environ. Saf. v. 33, p. 228-235.

FONSECA, A. L., 1991. A Biologia da Espécie *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestre* (Cladocera, Crustacea) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o Comportamento destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais. USP, p. 210.

GAUR, J. P.; SINGH, A. K., 1991. Regulatory influence of light and temperature on petroleum toxicity to *Anabaena doliolum*. Environ. Toxicol. Water Qual. v. 6, p. 341-350.

GELBER, R. D.; LAVIN, P. T.; MEHTA, C. R.; SCHOENFELD, D. A., 1985. Statistical Analysis. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology. G. M. Rand; S.R. Petrocelli. p. 110-123.

GERALDES-KATAOKA, A. P. A., 2001. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "Landfarming". Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, p. 202.

GESTEIRA, J. L. G.; DAUVIN, J. C.; FRAGA, M. S., 2003. Taxonomic level for assessing oil spill effects on soft-bottom sublittoral benthic communities. Mar. Pollut. Bull. v. 46, p. 562-572.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, P. R. A.; RAMOS, M. L. L. C., 1990. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, p.17.

GLEGG, G. A.; ROWLAND, S. J., 1996. The braer oil spill-hydrocarbon concentrations in intertidal organisms. Mar. Pollut. Bull. v. 32, p. 486-492.

GOERLITZ, D. F., 1992. A review of studies of contaminated groundwater conducted by the US geological survey organics project, Menlo Park (CA), 1961–1990, In: Lesage S, Jackson RE (ed) Groundwater contamination and analysis at hazardous waste sites. Marcel Dekker, New York.

GRAY, R. H.; HANF, R. W.; DAUBLE, D. D.; SHALASKI, J. R., 1982. Chronic effects of a coal liquid on a freshwater alga. *Selenastrum capricornutum*. Environ. Sci. Technol. v.16. p. 225-229.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating lethal concentration in toxicity bioassays. Environmental Science Technology v. 11, p. 714-719.

HEAD, I. M.; SWANNELL, R. P. J., 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Current Opinion in Biotech. v. 10, p. 234- 239.

HEEMKEN, O. P.; **STACHEL**, B.; **THEOBALD**, N.; **WENCLAWIAK**, B. W., 2000. Temporal variability of organic micropollutants in suspended particulate matter of the River Elbe at Hamburg and the River Mulde at Dessau, Germany. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. v. 38, p. 11- 31.

HELLAWELL, J. M.; 1986. Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management, (Pollution Monitoring Series), Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. p. 509.

HERRICKS, E., 2002. Princípios gerais de toxicologia. In: **MATSUI**, S.; **BARRETT**, B. F. D.; **BANERJEE**, J. Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. (Série Diretrizes para o gerenciamento de lagos). São Carlos: ILEC - IIE. v. 4, p. 9-30.

HICKS, G. R. F.; **COULL**. B. C., 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. Oceanography and Marine Biology Annual Review v. 21, p. 67–175.

HOLDWAY, D. A., 2002. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperate and tropical marine ecological processes. Marine Pollution Bulletin, v.44, p.185-203.

HOLLAND, A. F.; **SHAUGHNESSY**, A. T.; **SCOTT**, L. C.; **DICKENS**, V. A., **RANASINGHE**, J. A.; **SUMMER**, J. K., 1998. Progress report: Long-term benthic monitoring and assessment program for the Maryland portion of Chesapeake Bay (July 1986- October 1987). PPRP- LTB/EST- 88-1.

HOPP, S.; **HERDING**, B., 1996. The Boreholes of the Sea Urchin Genus *Echinometra* (Echinodermata: Echinoidea: Echinometridae) as a Microhabitat in Tropical South America. *Marine Ecology*, v. 13, p. 181-186.

HUTCHINSON, T. C.; **HELLEBUST**, J. A.; **TAM**, D.; **MACKAY**, D.; **MASCARENHAS**, R. A.; **SHIU**, W. Y., 1980. The correlation of the toxicity to algae of hydrocarbons and halogenated hydrocarbons with their physical-chemical properties. *Environ. Sci. Res.* v. 16, p. 577–586.

HYLLAND, K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* v. 69, p. 109-123.

ISO - International Standardization for Organization, 1999. Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). International Organization for Standardization. ISO14669, p. 8.

JOBLING, M., 1995. *Environmental Biology of Fishes*. (ed) Chapman & Hall, London, UK, p. 415-422.

JOHNSEN, A. R., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, Oxford, v. 133, p. 71-84.

KAUSS, P. B.; **HUTCHINSON**, T. C., 1975. The effects of petroleum components on the growth of *Chlorella vulgaris* Biejerinck. *Environ. Pollut.* v. 9, p. 157.

KNEZOVICH, J. P.; **HARRISON**, F. R.; **WILHELM**, R. G., 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water, Air, Soil Pollut.* v. 32, p. 233–275.

KOBAYASHI, N., 1980. Comparative sensitivity Marine ecotoxicological of various developmental stages of sea urchins to some chemicals, *Marine Biology*, v. 58, p. 163.

KOBAYASHI, N., 1981. Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant extracts to Canadian and Japanese sea urchin eggs. *Mar. Biol. Lab.* XXVI(1/3), p.123–133.

KOBAYASHI, N., 1995. Bioassay data for marine pollution using echinoderms. In: Cheremisinoff PN (ed) *Encyclopaedia of environmental control technology*. Gulf. Publ. Co., Houston.

KONG, Q. X.; **ZHU**, L. L.; **SHEN**, X. Y., 2010. The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 178, p. 282–286.

KRAUSS, M.; **WILCKE**, W.; **CHRISTOPHER**, M.; **ADELMAR**, G. B.; **MARCOS**, V.B.G.; **WULF**, A., 2005. Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environmental Pollution*. v. 135, p. 143–154.

KUSK, K. O.; **PETERSEN**, S., 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 16, p. 1629–1633.

LANDRUM, P. F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod, *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Tech. v. 23, p. 588-595.

LEE, R. F., Page, D. S., 1997. Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. Mar. Pollut. Bull. v. 34, p. 928-940.

LINICK, M., 1983. Illness associated with exposure to naphthalene in mothballs- Indiana. MMWR, v. 32, p. 34- 35.

LIVINGSTONE, D. R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 57, p. 195- 211.

LIVINGSTONE, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology A, v. 120, p. 43-49.

LÖNNING, S.; HAGSTRÖM, B. E., 1975. The effects of crude oils and the dispersant Corexit 8666 on sea urchin gametes and embryos. Norw. J. Zool. v. 23, p. 121-129.

LÖNNING, S.; PETERSEN, F. I., 1982. Eletron Microscopical Studies of the Effects of Aromatic Hydrocarbons on Sea Urchin Embryos. Sarsia, v. 67, p. 149-155.

LOTUFO, G. R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behaviour. *Mar Environ Res* v. 44, p. 149–166.

LOTUFO, G.R, ABESSA, D.M.S., 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento IA, Sousa ECPM, Nipper MG. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráfica, p.151-162.

LOURENÇO, S. O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas - Princípios e aplicações. São Carlos: Ed. RIMA, p. 588.

MABEY, W. R.; **SMITH**, J. H.; **PODOLL**, R. T., 1982. Aquatic fate process data for organic priority pollutants. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards. EPA 440/4-81-014.

MAGALHÃES, D. P.; **FILHO**, A. S. F. A., 2008. Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. *Ecol. Bras.* v.12, p. 355-381.

MANTIS, J.; **CHALOULAKOU**, A.; **SAMARA**, C., 2005. PM10-bound polycyclic hydrocarbons (PAHs) in the greater área of Athens, Greece. *Chemosphere*, v. 59, p. 593- 604.

MARIANI, L.; **DePASCALE**, D.; **FARAPONOVA**, O.; **TORNAMBE**, A.; **SARNI**, A.; **GIULIANI**, S.; **RUGGIERO**, G.; **ONORATI**, F.; **MAGALETTI**, E., 2006. The use of a test battery in marine ecotoxicology: the acute toxicity of sodium dodecyl sulfate. *Environ. Toxicol.* v. 21, p. 373–379.

MARIN, M. G.; **BRESSAN**, M.; **BRUNETTI**, R., 1991. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on two marine benthic organisms. *Aquat. Toxicol.* v. 9, p. 241– 248.

MARSH, A. G.; **TENORE**, K. R., 1990. The role of nutrition in regulating the population dynamics of opportunistic, surface deposit feeders in a mesohaline community. *Limnol. Oceanogr.* v. 35, p. 710- 724.

MASTROTI, R. R., 1997. Toxicidade e biogradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. Dissertação de mestrado, USP, Instituto Oceanográfico.

MASTROTI, R. R., 2002. Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (Fertilização). In: **NASCIMENTO**, I. A; **SOUSA**, E. C. P. M.; **NIPPER**, M. (ed.), *Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil*. Ed.Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 91-97.

McGEE, B. L.; **SCHLEKAT**, C. E.; **REINHARZ**, E., 1993. Assessing sublethal levels of sediment contamination with the estuarine amphipod, *Leptocheirus plumulosus*. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 12, p. 577-58.

McGEE, B. L.; **SCHLEKAT**, C. E.; **BOWARD**, D. H.; **WADE**, T. L., 1999. Sediment contamination and biological effects in a Chesapeake Bay marina. *Ecotoxicology*. In Press.

McKEE, J. E.; **WOLF**, H. W., 1963. Water Quality Criteria. Publication 3-A, California State Water Resources Control Board, Sacramento.

MESECK, S. L.; ALIX, J. H.; WIKFORS, G. H., 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY 429). *Aquaculture*, v. 246, p. 393-404.

MILLEMANN, R. E.; BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; CUSHMAN, R. M.; DANIELS, K. L.; FRANCO, P. J.; GIDDINGS, J. M.; McCARTHY, J. F.; STEWART, A. J., 1984. Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Trans. Am. Fish. Soc.* v. 113, p. 74–85.

MONTAGNA, P. A., 1995. Rates of metazoan meiofaunal microbivory: A review. *Vie Milieu* v. 45, p. 1–9.

NASCIMENTO, R. F.; CAVALCANTE, R. M.; FILHO, N. S. M.; VIANA, R. B.; OLIVEIRA, I.R.N., 2007. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. *Química Nova*. v. 30, p. 560-564.

NEFF, J. M.; J. W. ANDERSON., 1975. Na ultraviolet spectrophometric method for the determination of naphthalene and alkyl naphthalenes in the tissues of oil-contaminated marine animals. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* v. 14, p. 122-128.

NEFF, H. M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects. UK: Applied Science Publishers Ltd., Inglaterra.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J., 2000. Avaliação da

contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitratos (NHPAS): uma revisão metodológica. Química Nova, v. 23, n. 6, p. 765-773.

NEVERDAL, G.; **NORDTUG**, T.; **JOHNSES**, H. G.; **ALTIN**, D., 2006. *Calanus finmarchicus* acute toxicity test with eight selected components released to the water column after an oil spill. Statoil report, 200602270001, C.FOU.DE.B02.

NIEVES, M.; **VOLTOLINA**, D.; **PIÑA**, P., 2005, Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in a standard medium added with three products of zeolitic nature. Aquacult. Eng., v. 32, p. 403-410.

NIPPER, M. G., **PROSPERI**, V. A., **ZAMBONI**, N. S., 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 646-452.

NIPPER, M., 2002. Testes estatísticos para a análise de resultados de testes de toxicidade com amostras líquidas e sedimentos. In: Nascimento, I.; Sousa, E. C. P. M. e Nipper, M. (ed). Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil., Cap. 21, p. 245-253.

NRC - National Research Council., 2003. Oil in the sea III: Inputs, Fates and Effects. Ocean Studies Board and Marine Board, Washington, DC.

OTT, F. S.; **HARRIS**, R. M.; **O'HARA**, S. C. M., 1978. Acute and sublethal toxicity of naphthalene and three methylated derivatives to the estuarine copepod, *Eurytemora affinis*. Mar. Environ. Res. v. 1, p. 49-58.

PACHECO, M; **SANTOS**, M. A., 2002. Naphtalene and B-naphthoflavone effects on *Anguilla Anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. Environ. Int., v. 28, p. 285-293.

PATIN, S. A., 1999. Environmental Impact of the Offshore Oil & Gas Industry. Eco Monitor Publishing, East Northport, New York. ISBN 0-967 1836-0-X.

PELÁEZ-RODRÍGUEZ, M.; **PERET**, A. M.; **MATSUMURA-TUNDISI**, T.; **ROCHA**, O.; 2000. Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu. In: Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C. & Oliveira-Neto, A. L., (ed). Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI. São Carlos: Ed. RiMa, p. 95 - 114.

PELLIZZARI, E. D., 1978. Identification of components of energy-related wastes and effluents. U.S. EPA Environmental Research Laboratory, Athens, GA EPA-600/7-78-004.

PEDROZO, M. F. M.; **BARBOSA**, E. M.; **CORSEUIL**, H. X.; **SCHENEIDER**, M. R.; **LINHARES**, M. M., 2002. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. Série Cadernos de Referência Ambiental, v.12, p. 229.

PEREIRA, W. E.; **DOMAGALSKI**, J. L.; **HOSTETTLER**, F. D.; **BROWN**, L. R.; **RAPP**, J. B., 1996. Occurrence and accumulation of pesticides and organic contaminants in river sediment, water and clam tissues from the San Joaquin river and tributaries, California. Environ Toxicol Chem. v. 15, p. 172–180.

PEREIRA, C. S.; ABESSA, D. M. S.; ROVAI, A. S.; RACHID, B. R. F.; SOUSA, E. C. P. M., 2000. Comparação da sensibilidade a substâncias de referência de duas populações de ouriço do mar provenientes do litoral de São Paulo. VI Enc. Brasileiro de Ecotoxicologia. São Carlos, São Paulo. p.141.

PIETZSCH, R.; PATCHINEELAM, R. S.; TORRES, M. P. J., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments from a subtropical estuary in Brazil. *Marine Chemistry*, v. 118, p. 56-66.

PFLEEGER, T.; McFARLANE, J.C.; SHERMAN, R.; VOLK, G., 1991. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: GORSUCH, J.W., LOWER, W.R., WANG, W., LEWIS, M.A. Ed. *Plants for toxicity assessment*, STP 1115. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. v. 2, p. 355-364.

RACHID, B. R. F., 1996. Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto oceanográfico, p. 106.

RAISUDDIN, S.; KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; SCHLENK, D.; LEE, J. S., 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* v. 83, p. 161–173.

RAND, G. M.; PETROCELI, S. R., 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Taylor & Francis, Washington, p. 115.

RAND, G. M., 1995. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis, p. 1125.

RÉ, A., 1996. Estudo da utilização de *Corophium multisetosum* (Amphipoda:Corophiidae) na avaliação ecotoxicológica de sedimentos estuarinos e marinhos. Dissertação de mestrado- Universidade de Aveiro, Portugal.

REGINATTO, V., 1998. Avaliação do ensaio de toxicidade com alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. Campinas: IQ, UNICAMP. Tese doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

RINGWOOD, A. H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures Arch. Environ. Contam. Toxicol. v. 22, p. 288–95.

RODRIGUES, A.; RODRIGUES, R., 2006. Influência do manganês em ensaios de toxicidade com algas em amostras ambientais. J. Braz. Soc. Ecotoxicol, v. 1, p. 7-11.

RODGHER, S.; ROCHA, O., 1999. Estudo da sensibilidade de organismos aquáticos a uma substância de referência, o cloreto de sódio (NaCl). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 7. Anais. Florianópolis, p. 527.

ROSATO, Y. B., 1997. Biodegradação do petróleo. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed). Microbiologia Ambiental. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, p. 307-334.

ROMANELLI, M. F.; SENA, H. C; SILVA, G. P.; SAMPA, M. H.O.; BORRELY, S. I., 2004. Whole acute toxicity removal from industrial and domestic effluents treated by electron beam radiation: emphasis on anionic surfactantes. *Radiat Phys. Chem.*, v. 71, p. 463-465.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D., 1996. *Zoologia dos Invertebrados*. Editora Roca, São Paulo.

RUST, A. J.; BURGESS, R. M.; McELROY, A. E.; CANTWELL, M. G.; BROWNAWELL, B. J., 2004. Influence of soot carbon on the bioaccumulation of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons by marine benthic invertebrates: an interspecies comparison. *Environ. Toxicol. Chem*: p. 2594–2603.

SAX, N. I.; LEWIS, R. J., 1989. *Dangerous properties of industrial materials*. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Company, p. 2341-2342.

SCHLEKAT, C. E; MACGEE, B. L.; REINHARZ, E., 1992. Testing sediment toxicity in Chesapeake Bay with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*: An evaluatin. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 11, p. 225-236.

SCHLEKAT, C. E.; SCOTT, K. J.; SWARTZ, R. C.; ALBRECHT, B.; ANTRIM, L.; DOE, K.; DOUGLAS, S.; FERRETTI, J. A.; HANSEN, D.J.; MOORE, D. W.; MUELLER, C., 1995. Tang. Interlaboratory comparison of a 10-day sediment toxicity test method using *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius*, and *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 14, p. 2163–2174.

SHELFORD, V. E., 1917. An experimental study of the effects of gas waste upon fishes, with especial reference to stream pollution. Bull. Ill. State Lab. Nat. Hist, p. 11.

SILLIMAN, J. E.; MEYERS, P. A.; EADIE. B. J., 1998. Perylene: an indicator of alteration processes or precursor materials? Org. Geochem. v. 29, p. 1737-1744.

SOUSA, E. C. P. M., 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha In: Nascimento, I.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. (ed) Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo. Cap. 1, 9-14.

SOUSA, E. C. P. M., 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha In: Nascimento, I.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. (ed) Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. (ed). Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo. Cap. 8, p. 151-162.

SICKO-GOAD, S., 1988. In: Toxic contaminants and ecosystem health: A great lakes focus. Evans, M.S. (ed) Advances in environmental science and technology. THODE. v. 21, p. 19- 52.

SKEIST LABORATORIES., 1969. Chemical by-products from coal. Office of Coal Research, Research and Development Report n. 43, Washington, DC.

STRUHSAKER, W.; ELDRIDGE, M. B.; ECHEVERRIA, T., 1974. Effects of benzene (a water-soluble component of crude oil) on eggs and larvae of pacific

herring and northern anchovy. In: F. J. Veruberg and W. B. Vernberg. Ed. Pollution and physiology of marine organisms, Symposium xiii: Academic Press.

SUDERMAN, B. L.; MARCUS, N. H., 2002. The effects of Orimulsion and Fuel Oil #6 on the hatching success of copepod resting eggs in the seabed of Tampa Bay, Florida. *Environ. Pollut.* v. 120, p. 787-795.

SWARTZ, R. C.; DEBEN, W. A.; JONES, J. K. P.; LAMBERSON, J. O.; CODE, F. A., 1985. Phoxocephalid amphipod bioassay for marine sediment toxicity. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 7th Volume*, ASTM STP 854, R.D. Cardwell, R. Purdy. and R.C. Bahner, (ed), Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, p. 284-307.

SWARTZ, R.C.; COLE, A.; LAMBERSON, J.O.; FERRARO, S.P.; SCHULTS, D.W.; DEBEN, W.A.; LEE, H.I.; OZRETICH, R.J., 1994. Sediment toxicity, contamination and amphipod abundance at a DDT and dieldrin contaminated site in San Francisco Bay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 13, p. 949–962.

TABAN, I. C.; BECHMANN, R. K.; TORGRIMSEN, S.; BAUSSANT, T.; SANNI, S., 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research*, v. 58, p. 701-705.

TATEM, H. E.; COX, B. A.; ANDERSON, J. W., 1978. The toxicity of oils and petroleum hydrocarbon to estuarine crustaceans. *Est. Coast. Mar. Sci.* v. 6, p. 365-373.

TESTER, P. A.; **COSTLOW**, J. D., 1981. Effect of insect growth regulator Dimlin (TH6040) on fecundity and egg viability of the marine copepod *Acartia tonsa*. Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 5, p. 297-302.

UNEP - United Nations Environment Programme, 1991. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments: reference methods for marine pollution studies. Monaco Cedex. v. 20. p. 97.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 1989. Ambient water quality criteria for copper. EPA 440/5-80-036, p. A1-A4

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/600/R-95-136. Cincinnati, Ohio

USTACH, J. F., 1979. Effects of sublethal oil concentrations on the copepod, *Nitocra affinis*. Estuaries v. 2, p. 273-276.

VALDMAN, E.; **VALDMAN**, B.; **BATTAGLINI**, F. E.; **LEITE**, S. G. F., 2004. On line detection of low naphthalene concentrations by a bioluminescent sensor. Proc. Biochem, v. 10, p. 1217-1222.

VASCONCELLOS, P. C.; **BRUNS**, R. E.; **MAGALHÃES**, D., 2007. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: uma abordagem estatística. Química Nova. v. 30, p. 577-581.

VERSCHUEREN, K., 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Company, p. 862-865.

VIJAYAVEL, K.; **GOMATHI**, R.D.; **DURGABHAVANI**, K.; **BALASUBRAMANIAN**, M.P., 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. Mar. Pollut. v. 48, p. 429-433.

WALLEN, I. E.; **GREER**, W. C.; **LASETER**, R., 1957. Toxicity to *Gambusia affinis* of certain pure chemicals in turbid waters. Sewage and Industrial Wastes v. 29, p. 695.

WEAST, R. C.; **ASTLE**, M. J.; **BEYER**, W. H., 1985. CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data. Boca Raton, p. 357-361.

WILCKE, W.; **AMELUNG**, W.; **KRAUSS**, M.; **MARTIUS**, C.; **BANDEIRA A.**; **GARCIA**, M., 2003. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Patterns in Climatically Different Ecological Zones of Brazil. Organic Geochem. v. 34, p. 1405–1417.

WILSON, S.C.; **JONES**, K.C., 1993. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut., v. 88, p. 229–249.

WRIGHT, D. A.; **SAVITZ**, J. D.; **DAWSON**, R.; **MAGEE**, J.; **SMUCKER**, R. A., 1996. Effect of diflubenzon on the maturation and reproductive success of the copepod *Eurytemora affinis*. Ecotoxicology v. 5, p. 47-58.

YUNKER, M. B.; MACDONALD, R. W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, H.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S., 2002. PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*. v. 33, p. 489-515

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E., 2006. *Ecotoxicologia aquática. Princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, p. 464.

ZAKARIA, M. P.; TAKADA, H.; TSUTSUMI, S.; OHNO, K.; YAMADA, J.; KOUNO E.; KUMATA, H., 2002. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Rivers and Estuaries in Malaysia: A widespread Input of Petrogenic PAHs. *Environmental Science and Technology*. v. 36, p.1907–1918.

ZAMBONI, A. J., 1993. Avaliação da qualidade da água e sedimentos do Canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (Echinoderma: Echinoidea). Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ZITKO, V., 2000. Marine pollution. In: Wangersky, P. (ed.). *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer Verlag, Heidelberg. v. 5, p. 75-109.

8. ANEXOS

Anexo 1. Condições físicas e químicas nos ensaios crônicos com naftaleno e a microalga *Dunaliella tertiolecta* no início e final dos ensaios.

Ensaio crônico com <i>Dunaliella tertiolecta</i>							
Variável		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6
pH	Inicial	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	Final	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Salinidade	Inicial	36	36	36	36	36	36
	Final	35	36	36	36	36	36

Anexo 2. Condições físicas e químicas nos ensaios crônicos com naftaleno e o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* no início e final dos ensaios.

Ensaio crônico com <i>Lytechinus variegatus</i>						
Variável		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
pH	Inicial	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	Final	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Salinidade	Inicial	36	36	35	36	36
	Final	36	36	35	36	36
Variável		Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8		
pH	Inicial	8,0	8,0	8,0		
	Final	8,0	8,0	8,0		
Salinidade	Inicial	36	35	36		
	Final	36	35	36		

Anexo 3. Condições físicas e químicas nos ensaios crônicos com naftaleno e o copépodo *Nitokra* sp no início e final dos ensaios.

Ensaio crônico com <i>Nitokra</i> sp						
Variável		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
pH	Inicial	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
	Final	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Salinidade	Inicial	21	20	21	21	21
	Final	21	20	21	21	21

Anexo 4. Condições físicas e químicas nos ensaios agudos com naftaleno e copépodo *Nitokra* sp no início e final dos ensaios.

Ensaio agudos com <i>Nitokra</i> sp								
Variável		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7
pH	Inicial	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
	Final	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Salinidade	Inicial	20	20	21	21	21	20	21
	Final	20	20	21	21	21	20	21

Anexo 5. Condições físicas e químicas nos ensaios agudos com naftaleno e o anfípodo *Leptocheirus plumulosus* no início e final dos ensaios.

Ensaio agudos com <i>Leptocheirus plumulosus</i>						
Variável		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
pH	Inicial	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
	Final	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Salinidade	Inicial	21	21	21	21	22
	Final	21	21	21	21	22