

Monitoramento ecotoxicológico contínuo da qualidade de águas superficiais: equipamentos disponíveis

Daniel Ferreira Domingues

Dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Saúde Ambiental

Orientadora: Dra. Denise Navas Pereira

São Paulo, SP

2004

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos ou científicos, a reprodução parcial ou total desta dissertação por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa Vera, por ter sempre me incentivado e acreditado em mim;

À minha filha Isabela, por ter cedido involuntariamente sua primeira infância;

À Denise, pela calma transmitida e pela confiança depositada;

À CETESB pela oportunidade promovida de desenvolvimento do tema;

Ao sempre tranqüilo, sábio e centrado Eduardo Bertoletti, por ter servido como co-orientador;

Ao Projeto GTZ e à KI, por terem me dado a chance de ver pessoalmente o que se tem feito no primeiro mundo;

Aos meus pais, por terem cobrado a finalização desta empreitada;

Ao meu irmão Tomás, pelas bibliografias úteis enviadas;

À Sandra Buratini-Mendes, pelas dáfnias e por ter conseguido atravessar seus momentos difíceis, que foram infinitamente maiores que os meus, dando exemplo de persistência e força;

Ao Hélio Montenegro, pela salvação na hora do desespero;

À Maria Inês Zanoli Sato, pela simpatia transmitida durante todo o tempo;

À Professora Maria de Lourdes Fidalgo, Universidade do Porto e ao Joaquim de Souza, Universidade de Aveiro, Portugal, pelas bibliografias cedidas;

E a todos do Setor de Ecotoxicologia Aquática da CETESB, pela compreensão e cooperação.

RESUMO

Domingues DF. **Monitoramento ecotoxicológico contínuo da qualidade de águas superficiais: equipamentos disponíveis.** São Paulo; 2004. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Existem, atualmente, equipamentos de funcionamento automático e contínuo para a avaliação da toxicidade da água os quais utilizam organismos vivos como elementos sensores dos efeitos das substâncias químicas na água. Dentre eles, podem ser citados o “Teste Dinâmico com *Daphnia*”, o “Stiptox”, o “MusselMonitor®”, o “Gymnotox®”, o “Bio-Sensor®” e o “bbe *Daphnia* Toximeter”, ou toxímetro. São observados os efeitos sobre o comportamento dos organismos sensores. Os critérios utilizados para avaliação do comportamento são o padrão de natação, a partir de vários componentes, ou padrão de abertura e fechamento de valvas ou, ainda, o de respiração ou consumo de oxigênio, dependendo do organismo utilizado. Estudos mostram que este tipo de avaliação pode ser mais sensível que o teste convencional que avalia letalidade, incluindo aqui concentração e velocidade de detecção do efeito. Esta abordagem permite que o gerenciador local da qualidade de recursos hídricos possa tomar uma decisão que envolva seus usos antes que um acidente ambiental tome proporções grandiosas ou antes mesmo que um acidente ocorra. Foram realizados ensaios com a substância de referência KCl. Os testes com o toxímetro tiveram duração de cerca de 30 horas, sendo que as primeiras 24 horas de exposição em água limpa (água de diluição); depois deste período, os organismos foram expostos à substância por 2 horas, no máximo, seguida de nova exposição à água de diluição por mais algumas horas, de modo a se avaliar a duração do efeito e a sua possível reversão a um nível normal. O resultados mostraram que, nas condições dos ensaios realizados, o efeito acusado pela exposição ao KCl foi reversível e a concentração que causa efeito foi similar à CL50;48h para *Daphnia similis*. Tal resultado indica que é possível se obter em menor tempo o resultado proveniente de testes convencionais e que a sensibilidade do ensaio não aumenta, já que a

concentração detectada foi da mesma ordem de magnitude. Espera-se, com esse trabalho, contribuir para a gestão dos recursos hídricos ao se fazer uma avaliação de tais ferramentas promissoras para avaliar continuamente, e com rápido tempo de resposta, a qualidade da água para fins de proteção das comunidades aquáticas, conforme previsto pela Resolução CONAMA 20/86.

Descritores: biomonitores, *Daphnia similis*, KCl, toxicidade, água.

SUMMARY

Domingues DF. **Monitoramento ecotoxicológico contínuo da qualidade de águas superficiais: equipamentos disponíveis** [Continuous ecotoxicological monitoring of surface water quality: available systems]. São Paulo (BR); 2004. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Nowadays, there are automatic and continuous systems which use living organisms as sensors of the toxic effects of chemicals dissolved in the water. Among them are the “Dynamic DaphniaTest”, the “Stiptox”, the “MusselMonitor®”, the “Gymnotox®”, the “Bio-Sensor®” and the “bbe Daphnia Toximeter”. The observed effects are changes on organisms’ behavior. Behavior evaluation criteria are swimming pattern, analyzed over several components, or valve opening patterns or still, the locomotion or ventilation movements and oxygen consumption, depending on used organism. Studies have shown that this evaluation can be more sensitive than traditional lethality tests, including here concentration and effect detection time. This approach allows local water resources manager to take decisions regarding its uses before an environmental accident gets out of control or even before an accident takes place. The KCl reference toxicant was used to check the functioning of the toximeter. Tests lasted 30 hours. The first 24 hours were taken for clean water exposition (dilution water). Thereafter, the organisms were exposed to KCl for a maximum of 2 hours, followed by a second clean water exposition to observe a possible effect reversion to a normal level. Results show that, with the conditions provided for the experiments, the toxic effect of KCl exposition was reversible and the toxic effect concentration was similar to the LC50;48h obtained with acute toxicity testing with *D. similis*. Such result indicates that it is possible to obtain the same results from the 48h tests in a shorter period of time and that the assay sensibility is not different from the outcomes of traditional tests. It is hoped that this research may contribute to water resources management by doing an evaluation of such a promising tool for water quality monitoring.

Descriptors: biomonitors, *Daphnia similis*, KCl, toxicity, water.

"THE PROBLEM IS NOT SHORTAGE OF DATA, BUT RATHER OUR INABILITY TO PERCEIVE THE CONSEQUENCES OF THE INFORMATION WE ALREADY POSSESS."

[O PROBLEMA NÃO É A FALTA DE DADOS, MAS SIM NOSSA INABILIDADE DE PERCEBER AS CONSEQUÊNCIAS DAS INFORMAÇÕES QUE NÓS JÁ POSSUÍMOS.]

JAY W. FORRESTER

TECHNOLOGY REVIEW, JANEIRO DE 1971

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
2.1. Geral	11
2.2. Específicos	11
3. MÉTODOS	12
3.1. Levantamento bibliográfico	12
3.2. Execução dos ensaios com o bbe Daphnia toximeter	12
4. SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE MONITORAMENTO	20
5. APLICAÇÕES DE BIOMONITORAMENTO AUTOMÁTICO	32
6. RESULTADOS	36
7. DISCUSSÃO	40
7.1. Sensibilidade	40
7.2. Relevância ecológica	46
7.3. Controle de qualidade analítica	47
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
8.1. Necessidades	48
8.2. Questões a serem respondidas sobre o bbe Daphnia toximeter	49
9. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A busca pela compreensão dos fenômenos que cercam a vida na Terra sempre foi uma das principais características da espécie humana, o que a permitiu atingir o atual nível de desenvolvimento. Desse modo, o próprio desenvolvimento e suas conseqüências se tornaram alvos de investigação.

Logo após o surgimento da Toxicologia como disciplina formal, no início do século XIX, em resposta ao desenvolvimento da química orgânica, a dupla capacidade benéfica e maléfica das substâncias havia sido reconhecida (BUIKEMA e col. 1982).

Em termos ambientais, o interesse pelos efeitos de produtos químicos e resíduos sobre a biota não humana só se tornou público por volta das décadas de 40 e 50, sendo que os primeiros trabalhos incluíram testes de pesticidas com insetos e de qualidade de água com cladóceros (RAND e col. 1995). Nessa mesma época, biólogos haviam observado diferenças entre as estruturas dos grupos biológicos presentes em rios poluídos e não poluídos. Contudo, enquanto os levantamentos biológicos nos ambientes aquáticos documentavam o dano, medidas de prevenção requeriam estimativas de impacto antes do fato ser consumado (BUIKEMA e col. 1982).

CAIRNS e van der SCHALIE (1980) postularam algumas razões que tornam a obtenção de evidências ecotoxicológicas uma necessidade tanto para a estimativa de dano devido ao lançamento de produtos químicos e efluentes, quanto para a avaliação dos possíveis benefícios advindos da melhoria da qualidade de efluentes ou da limitação de seus lançamentos em corpos de qualidade ainda adequada. São elas:

- Muitos compostos químicos e outros poluentes potenciais produzem reações biológicas adversas em concentrações abaixo

das atuais capacidades analíticas, que são restritas a poucas substâncias conhecidas.

- Agentes tóxicos potenciais são raramente encontrados isolados uns dos outros. Em geral, os agentes tóxicos estão presentes em efluentes e sistemas naturais como misturas, e o impacto biológico da mistura não pode ser adequadamente estimado por uma série de análises químicas por si só, mesmo que a capacidade analítica seja adequada.
- É bastante conhecido o fato de que a qualidade da água, em termos de dureza, oxigênio dissolvido, pH e temperatura, tem influência marcante na expressão da toxicidade. É a combinação entre agentes tóxicos, qualidade da água e organismos presentes que produz a estimativa definitiva da probabilidade de dano. Como conseqüência, saber meramente a concentração do composto químico (ou poluente potencial) não produz informação útil para o gerenciamento do ambiente.

Outros motivos relevam a importância do uso rotineiro de organismos aquáticos para a caracterização da qualidade ambiental, tais como:

- Anualmente são produzidos no mundo cerca de 1000 a 2000 novos produtos químicos (ALBERT e GARCIA 1985, COONEY 1995).
- Cerca de 300 milhões de toneladas de produtos químicos são produzidas anualmente, o que pode incluir mais de 100.000 compostos (KORTE e COULSTON 1994, citados por PITOT III e DRAGAN 1996).

Portanto, o estabelecimento de um gerenciamento do risco de substâncias químicas ou efluentes deve estar baseado também nos testes de toxicidade destas matrizes e não apenas nas tradicionais análises químicas e biológicas.

No Estado de São Paulo, em atendimento à lei estadual número 118 de 29/06/1973, a CETESB criou a Rede de Monitoramento da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo. Os principais objetivos dessa rede são:

- Avaliar a evolução da qualidade das águas interiores dos rios e reservatórios do Estado.
- Propiciar o levantamento das áreas prioritárias para o controle da poluição das águas.
- Subsidiar o diagnóstico da qualidade das águas doces utilizadas para o abastecimento público e outros usos.
- Dar subsídio técnico para a elaboração dos Relatórios de Situação dos Recursos Hídricos, realizados pelos Comitês de Bacias Hidrográficas.
- Identificar trechos de rios onde a qualidade d'água possa estar mais degradada, possibilitando ações preventivas e de controle da CETESB, como a construção de ETE pelos municípios ou a adequação de lançamentos industriais.

Detalhes sobre a Rede de Monitoramento podem ser encontrados no Relatório de Qualidade das Águas Interiores da CETESB (2003).

A poluição das águas tem como origem várias fontes. Dentre elas destacam-se os efluentes domésticos, os efluentes industriais e as cargas difusas urbanas e agrícolas. Por isso, torna-se impraticável o monitoramento sistemático de todos os poluentes que possam estar presentes nas águas superficiais. A CETESB faz uso de 43 parâmetros de qualidade de água (físicos, químicos, hidrobiológicos, microbiológicos e ecotoxicológicos):

- **Parâmetros físicos:** temperatura da água e do ar, série de resíduos, absorvância no ultravioleta, turbidez e coloração.

- **Parâmetros químicos:** pH, OD, DBO, DQO, carbono orgânico dissolvido, potencial de formação de THM, série de nitrogênio, fósforo total, ortofosfato solúvel, condutividade específica, surfactantes, cloreto, fenóis, ferro total, manganês, alumínio, bário, cádmio, chumbo, cobre, cromo total, níquel, mercúrio e zinco.
- **Parâmetros microbiológicos:** coliformes fecais, *Giardia* sp, *Cryptosporidium* sp, *Clostridium perfringens* e estreptococos fecais.
- **Parâmetro hidrobiológico:** clorofila-a.
- **Parâmetros ecotoxicológicos:** teste de toxicidade crônica, teste de Ames e Microtox®.

Para facilitar a interpretação das informações de qualidade de água e para torná-las mais compreensíveis e utilizáveis pelo público em geral (especialistas ou não), são utilizados índices que sintetizam tais informações. Até recentemente, o índice utilizado para avaliar a qualidade das águas no Estado de São Paulo foi o IQA – Índice de Qualidade da Água.

O IQA foi definido como o produto ponderado das qualidades de água correspondentes aos parâmetros: temperatura, pH, OD, DBO, coliformes fecais, nitrogênio total, fósforo total, resíduo total e turbidez.

Nota-se, com isso, que há limitações no uso desse índice. Uma delas é a possibilidade de se superestimar a condição real do recurso hídrico, pois contempla apenas nove parâmetros; e, o mais importante, é que tal índice restringe-se ao uso da água para abastecimento público.

Desse modo, em 1998 (SÃO PAULO 1998) um grande esforço foi dirigido à elaboração de um novo índice com vistas ao estabelecimento de uma classificação da qualidade de água para a proteção das comunidades aquáticas. Para tanto, nesse índice, além das análises químicas convencionais, foi incluído o resultado do teste de toxicidade crônica com o crustáceo *Ceriodaphnia dubia*, o qual pode detectar a presença, interações e

a biodisponibilidade de substâncias em concentrações capazes de causar efeito adverso na reprodução e/ou na sobrevivência dos organismos. Tal índice é denominado atualmente de IVA – Índice de Proteção da Vida Aquática (ZAGATTO e col. 1999).

Na esfera legal, a Resolução CONAMA 20/86 (CONAMA 1986) estabelece a classificação dos corpos hídricos de acordo com o uso. No caso das águas doces, as classes que contemplam a proteção da vida aquática são:

- Classe Especial – águas destinadas ao abastecimento doméstico, sem prévia ou com simples desinfecção e preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.
- Classe 1 – águas destinadas ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado; proteção das comunidades aquáticas e recreação de contato primário.
- Classe 2 – águas destinadas ao abastecimento doméstico após tratamento convencional, proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutíferas, criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

No caso das águas salinas:

- Classe 5 – águas destinadas à recreação de contato primário, à proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

No caso das águas salobras:

- Classe 7 – águas destinadas à recreação de contato primário, à proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva (aqüicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

Considerando-se a leitura do Artigo 12 desta Resolução, a necessidade de execução de ensaios ecotoxicológicos fica estabelecida para a avaliação dos efeitos sobre os vários aspectos da fisiologia dos seres vivos (“Art. 12 - Os padrões de qualidade das águas estabelecidos nesta Resolução constituem-se em limites individuais para cada substância. Considerando eventuais ações sinérgicas entre as mesmas, estas ou outras não especificadas, não poderão conferir às águas características capazes de causarem efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida.”).

Somado a isso, há no Estado de São Paulo a resolução SMA n.º 3 de 22.02.2000 (SÃO PAULO 2000), que obriga o uso de testes de toxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados diretamente nos corpos receptores.

Sendo assim, os testes de toxicidade estão instituídos como instrumento de avaliação da qualidade da água e de gerenciamento ambiental. Esta forma de gerenciamento pode ser útil na avaliação momentânea da qualidade da água, na avaliação de tendências da qualidade da água de cada ponto amostrado, na detecção de contaminações crônicas e para o controle de emissões. Todavia, os ensaios de toxicidade são insuficientes para se detectar ou prevenir acidentes ambientais, que por sua vez são esporádicos ou até mesmo ilícitos (estes, realizados em horários improváveis tanto para a amostragem de monitoramento quanto de fiscalização). Portanto, para a contenção de ou reação a acidentes e

lançamentos ecologicamente prejudiciais, devem estar à disposição mecanismos mais *rápidos e eficientes* de avaliação do dano, em oposição aos testes de toxicidade tradicionais (que têm um prazo de análise de pelo menos 24h), *contínuos*, de forma que possam ser detectados eventos a qualquer momento, e *sensíveis*, de modo que poluentes sejam detectados no início de um acidente ou lançamento ilícito.

Para preencher esta lacuna, foram desenvolvidos os biomonitores de avaliação contínua da toxicidade das águas. Estes equipamentos foram concebidos de forma a serem bastante sensíveis, rápidos e representativos dos acontecimentos ao longo do tempo, ou seja, capazes de detectar acidentes breves ou variações tempo-dependentes de substâncias químicas (BBE MOLDAENKE 2001).

Cabe aqui fazer uma descrição do significado dos termos relacionados com esta atividade. O *biomonitoramento* pode ser definido, conforme ROSENBERG e RESH (1993, citados por CARVALHO 2003), como sendo o uso de variáveis biológicas para a avaliação de alterações do ambiente dentro de programas de controle de qualidade. Tal biomonitoramento pode ser *passivo*, no qual os organismos são retirados do seu meio e suas estruturas populacionais são avaliadas por meio de avaliações ecológicas, ou *ativo*, no qual são usadas determinadas espécies de organismos na avaliação da qualidade da água. Já *biomonitor* é o organismo ou sistema que utiliza organismos para dar indicação da presença de agentes estressores na água que, por sua vez, são quaisquer entidades ou processos físicos, químicos ou biológicos que induzem efeitos adversos em indivíduos, populações, comunidades ou ecossistemas (De ROUX 1999, citado por GERHARDT 1999a). O uso do termo *bioindicador* é efetuado com relação a qualquer nível biológico capaz de reagir à poluição com mudanças nas suas funções, podendo ser uma comunidade (indicador ecológico), um organismo (bioindicador, sentinela, biomonitor, organismo-teste) ou parâmetro sub-organismal (biomarcador) (GERHARDT 1999a). O termo *biossensor* refere-se ao material imobilizado, biologicamente sensível,

em contato íntimo com um adequado sistema de transdução, que converte o sinal bioquímico em um sinal elétrico quantificável e processável (LOWE 1985, citado por COWELL e col. 2000).

A prática do biomonitoramento contínuo da toxicidade da água não é nova. De início, usavam-se peixes colocados em águas correntes ou efluentes. Os peixes eram observados visualmente quanto à mortalidade e sinais de estresse (JONES e col. 1956; HENDERSON e PICKERING 1963, JACKSON e BRUNGS 1966, citados por CAIRNS e van der SCHALIE 1980). Este procedimento não é adequado para funcionamento extra-experimental, já que requer uma pessoa em tempo integral para a observação dos efeitos.

Portanto, já em 1970, CAIRNS e col. e, em 1971, JUHNKE e BESCH, citados por GUNATILAKA e col. (2000), propuseram o uso de aparatos de biomonitoramento para auxiliar o gerenciamento da qualidade de corpos d'água em sistemas contínuos de geração de informação instalados em pontos estratégicos, dentro de plantas industriais ou em pontos preestabelecidos num dado corpo hídrico receptor.

Diversos métodos e equipamentos automáticos para o biomonitoramento contínuo da qualidade da água e de efluentes industriais, principalmente com peixes, foram desenvolvidos nas últimas décadas. Alguns exemplos são os trabalhos desenvolvidos por SHIRER e col. (1968), WALLER e CAIRNS (1972), CAIRNS e col. (1973), que detectam alterações na natação dos peixes; MORGAN (1976) e GRUBER e col. (1979), que utilizam o aumento da frequência do ritmo opercular de peixes como resposta; KNIE (1978) e LECHOLT e col. (2000), que utilizam a alteração na natação do cladóceros *Daphnia magna*; GERHARDT (1994) e GERHARDT e col. (1999b), que utilizam a técnica de conversão de impedância para estudos comportamentais; THOMAS e col. (1996), que avaliam a alteração na atividade elétrica de peixe elétrico e KRAMER e FOEKEMA (2000), que utilizam a atividade comportamental de bivalves.

Dentre esses estudos, vale destacar o desenvolvido por KNIE (1978) sobre um aparelho que foi denominado "Teste Dinâmico com Daphnia". Por meio deste equipamento foi detectada a presença de material tóxico lançado no ambiente aquático devido ao acidente ocorrido na Empresa Sandoz, na Suíça, 500 km a jusante no rio Reno. Este fato mostrou às organizações de proteção ambiental a importância do uso de sistemas biológicos de monitoramento no gerenciamento da qualidade da água (GUNATILAKA e DIEHL 2000). A partir de então, diversos esforços foram realizados para o desenvolvimento de tecnologia de biomonitoramento, como, por exemplo, o projeto alemão descrito em BEO (1993).

Os equipamentos destinados ao biomonitoramento contínuo devem levar em conta alguns requisitos básicos para a sua boa aceitação, quais sejam (segundo CAIRNS e van der SCHALIE 1980):

- A variável fisiológica ou comportamental do organismo selecionada para o monitoramento deve ser quantificável através de técnicas apropriadas de interface para a análise tanto por um computador *como por outro equipamento de registro eletrônico, o que permite que a operação do sistema seja contínua e automática.* Contudo, o método não deve resultar em estresse indevido ao organismo e, por isso, técnicas que necessitem de aprisionamento ou a ligação de algum dispositivo ao organismo são menos apropriadas.
- Rapidez de detecção do aumento da toxicidade no ambiente. O atraso de muitas horas entre a introdução do agente químico e a reação do organismo não permite que se previna um evento tóxico antes que este tome proporções alarmantes.
- Não devem apresentar alarmes falsos.
- Sistemas devem ser fáceis de operar e produzir resultados fáceis de serem interpretados.
- O organismo deve ser barato e fácil de ser obtido.

- O aparelho deve ser confiável e não requerer manutenção freqüente.

Equipamentos com os requisitos relacionados se baseiam, para a obtenção da resposta, na variação do comportamento do organismo-teste, ou seja, avaliam o desvio de um comportamento normal frente à alteração ambiental. A importância desta variável consiste na integração dos processos fisiológicos e bioquímicos. Como disseram LITTLE e col. (1985), "Estudos comportamentais são um meio particularmente promissor de detecção de efeitos subletais de contaminantes, pois o comportamento reflete as mudanças cumulativas nas funções fisiológicas e bioquímicas". Ainda, mudanças no comportamento parecem ser os mais sensíveis indicadores de alterações ambientais (WARNER 1967, citado por GERHARDT 1995).

Embora seja evidente a utilidade de tais equipamentos no monitoramento da qualidade da água, nota-se um direcionamento do seu uso para o abastecimento público. Poucos estudos têm sido dirigidos à aplicação na proteção das comunidades aquáticas. E, ainda neste universo restrito, são poucos os trabalhos publicados que apresentam dados verificáveis do funcionamento destes equipamentos, tais como definição dos valores das variáveis utilizadas para a deflagração de alarmes e metodologia utilizada.

Sendo assim, se faz premente a execução de avaliações protocoladas do funcionamento dos diversos equipamentos, disponíveis comercialmente, para o fim de proteção de comunidades aquáticas. Nesse sentido, torna-se importante o estabelecimento da correlação entre as concentrações que causam efeito crônico obtidas através dos testes de toxicidade tradicionais e as concentrações de efeito apresentadas pelos biomonitores contínuos.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Avaliar a utilização de biomonitores contínuos no controle da qualidade da água destinada ao abastecimento doméstico e à proteção das comunidades aquáticas .

2.2. Específicos

Avaliação e comparação dos equipamentos de biomonitoramento contínuo disponíveis no mercado internacional.

Avaliação do desempenho do bbe Daphnia Toximeter.

3. MÉTODOS

3.1. Levantamento bibliográfico

Nesta atividade foi verificado o material disponível, através da utilização das palavras-chave: monitoramento biológico contínuo, biomonitoramento automático, *biological early warning system*, *toximeter*, *automated biomonitor*. Foi efetuada, também, busca de referências citadas nos artigos obtidos. Outros materiais foram obtidos através de consulta pessoal a diversos pesquisadores no Brasil, Alemanha e Países Baixos.

3.2. Execução dos ensaios com o bbe *Daphnia* toximeter

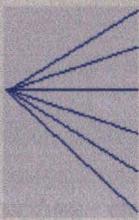
Os experimentos com o toxímetro foram efetuados com exposição máxima de 2 horas de 8 jovens de *Daphnia similis* (Daphniidae, Cladocera) com idade entre 24 e 72 horas, obtidos do cultivo do laboratório do Setor de Ecotoxicologia Aquática da CETESB. Tal exposição ocorreu após 24 horas de permanência em água de diluição, para a obtenção do padrão de natação. O momento exato da introdução do agente químico foi marcado no gráfico por meio do *software*.

O *software* utilizado para execução dos ensaios foi o Daphmfc 1.50.8 sp 6 opt 1 e aquele utilizado para visualizar os dados foi o Dviewer 1.50.7. As configurações aqui apresentadas foram definidas pelo fabricante do equipamento. Deve-se ressaltar, entretanto, que as configurações podem ser alteradas na hora da visualização dos arquivos e, dependendo das definições empregadas, caso sejam diferentes daquelas do toxímetro onde foram gerados os gráficos que não apresentaram sinal de toxicidade, podem apresentar um evento tóxico muito definido.

As seguintes configurações do sistema foram utilizadas para a visualização dos ensaios com o toxímetro:

parameter for the toxic index:

rating of	points	slope
minimal level v: 0.2 cm/s	0	1 min
maximal level v: 1.2 cm/s	4	1 min
min. recognition rate: 30 %	1	1 min
initial Daphnia-no.: 8 , loss counts	1 per daphnia	
	single peak counts	30 min
a level below 3 Daphnia generates	5	30 min
	Hinkley	Hinkley
	Gradient	Gradient
velocity: 4 / 5	4 / 5	120 / 150 min
fractal dimension: 4 / 3	4 / 3	120 / 150 min
frc.dim.boxcounting: 4 / 3	4 / 3	120 / 150 min
v-class-index: 5 / 5	5 / 5	120 / 150 min
height: 2 / 4	2 / 4	120 / 150 min
distance: 2 / 2	2 / 2	120 / 150 min

Hinkley / Gradient alarms: 

Levels:

level for yellow alarm:  8 level for red alarm:  10

Cancel OK

Figura 3.1. Parâmetros para a composição do Índice Tóxico.

v-class-calculation

parameter for the v-class-index:

distance to median (+): 80 %

fit value

distance to median (-): 40 %

A alarm only occurs, if the amount of % for the fast and slow classes is not under 10 %-units

limits for v-classes:

lower limit: 0.2 cm/s

upper limit: 1 cm/s

the resulting v-classes:

0.2 cm/s 0.3 cm/s 0.4 cm/s 0.5 cm/s 0.6 cm/s 0.7 cm/s 0.8 cm/s 0.9 cm/s 1 cm/s

cancel OK

Figura 3.2. Parâmetros para o cálculo do V-Class-Index.

The screenshot shows the 'Hinkley parameter' dialog box with the following settings:

Parameter	Value
fit points (gradient 1)	24
fit points (gradient 2)	51
gradient limit 1	0.25
gradient limit 2	0.5
fit points	27
sigma coefficient	3
jump factor	1.3
Hinkley factor	0.6
Hinkley 50	<input checked="" type="checkbox"/>

Channel: velocity

(Changes are applied when channel changes!)

Figura 3.3. Definições dos parâmetros do detector Hinkley; canal de velocidade.

The screenshot shows the 'Hinkley parameter' dialog box with the following settings:

Parameter	Value
fit points (gradient 1)	24
fit points (gradient 2)	15
gradient limit 1	0.5
gradient limit 2	0.85
fit points	27
sigma coefficient	3
jump factor	1.1
Hinkley factor	1
Hinkley 50	<input checked="" type="checkbox"/>

Channel: height

(Changes are applied when channel changes!)

Figura 3.4. Definições dos parâmetros do detector Hinkley; canal de altura.

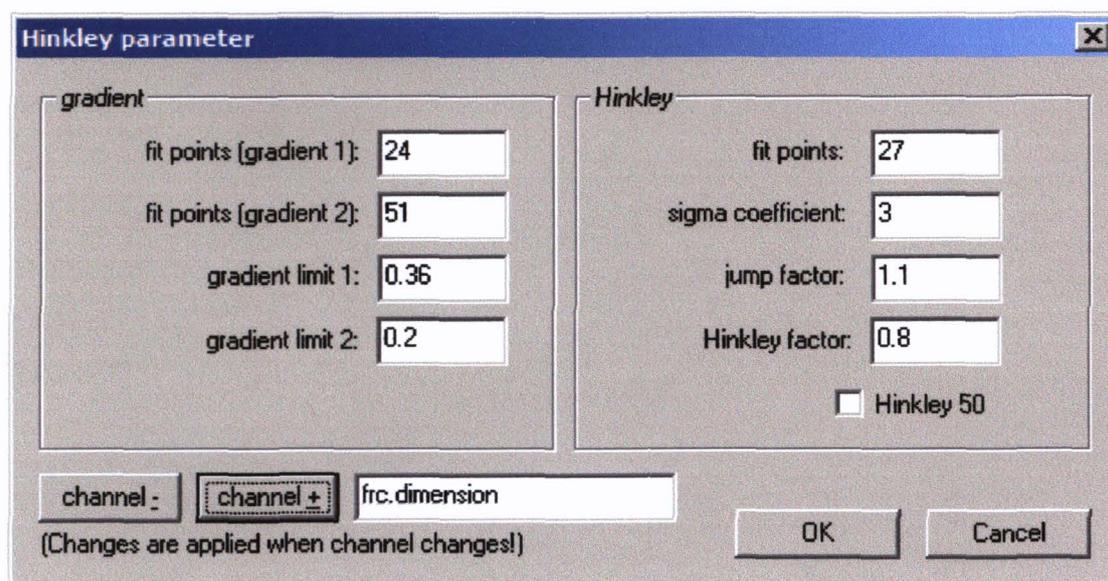


Figura 3.5. Definições dos parâmetros do detector Hinkley; canal de dimensão fracionária calculada através de regressão linear.

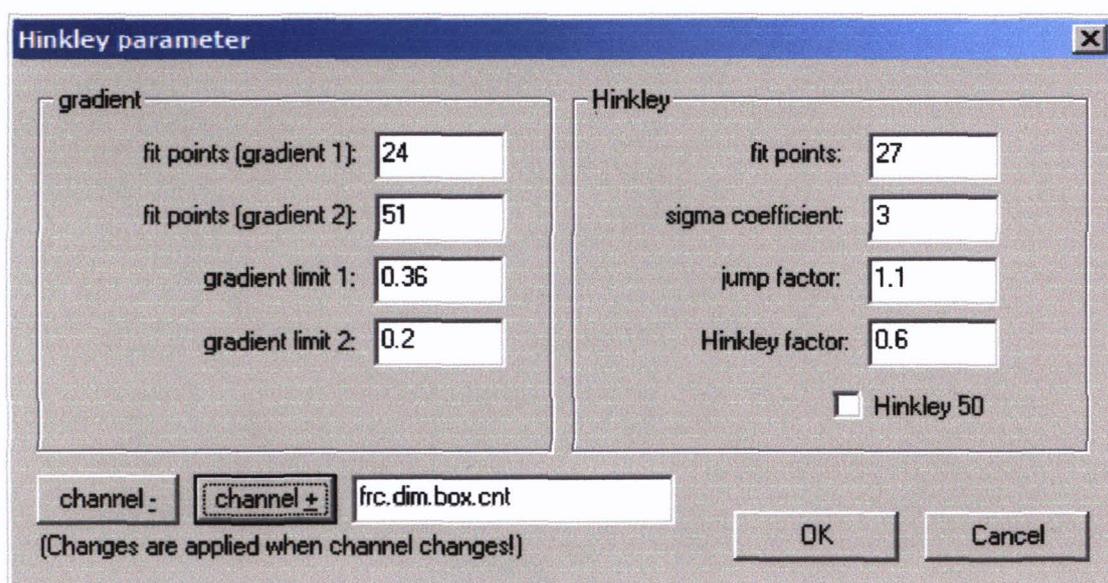


Figura 3.6. Definições dos parâmetros do detector Hinkley; canal de dimensão fracionária calculada através método de "box counting".

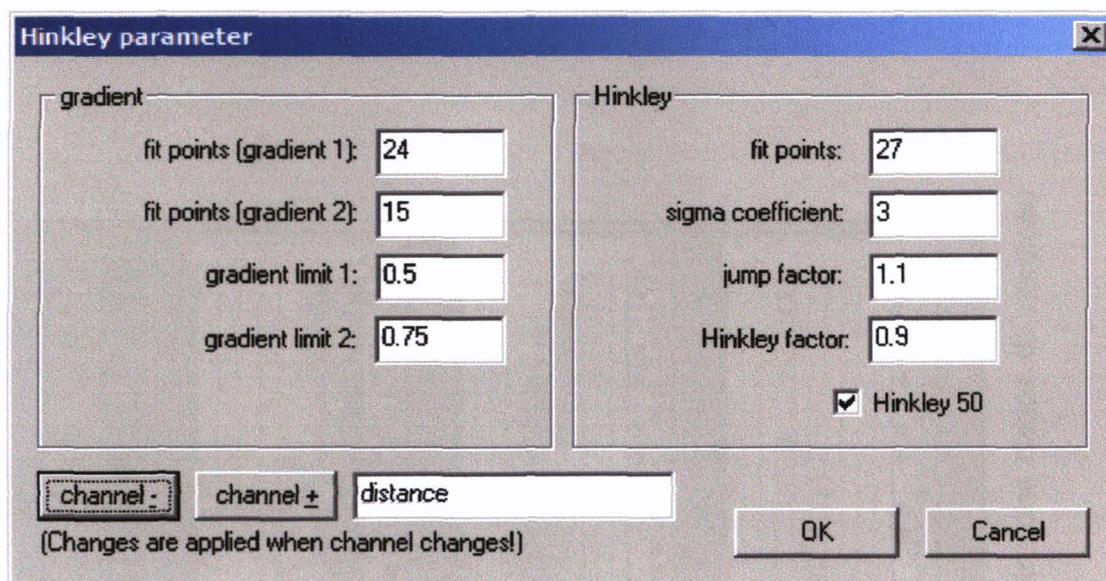


Figura 3.7. Definições dos parâmetros do detector Hinkley; canal de distância.

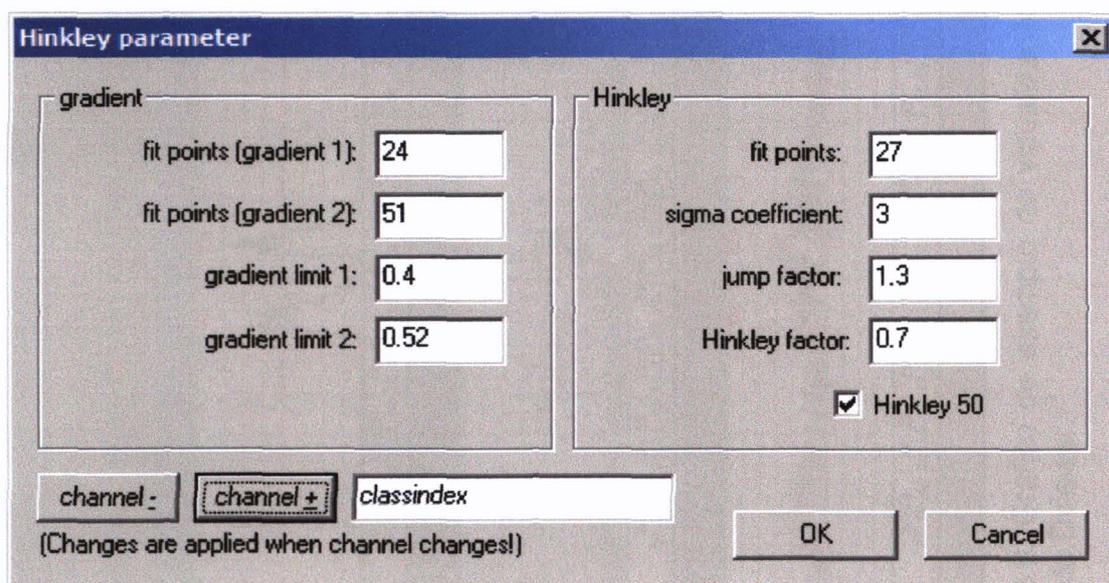


Figura 3.8. Definições dos parâmetros do detector Hinkley; canal de Índice de classe.

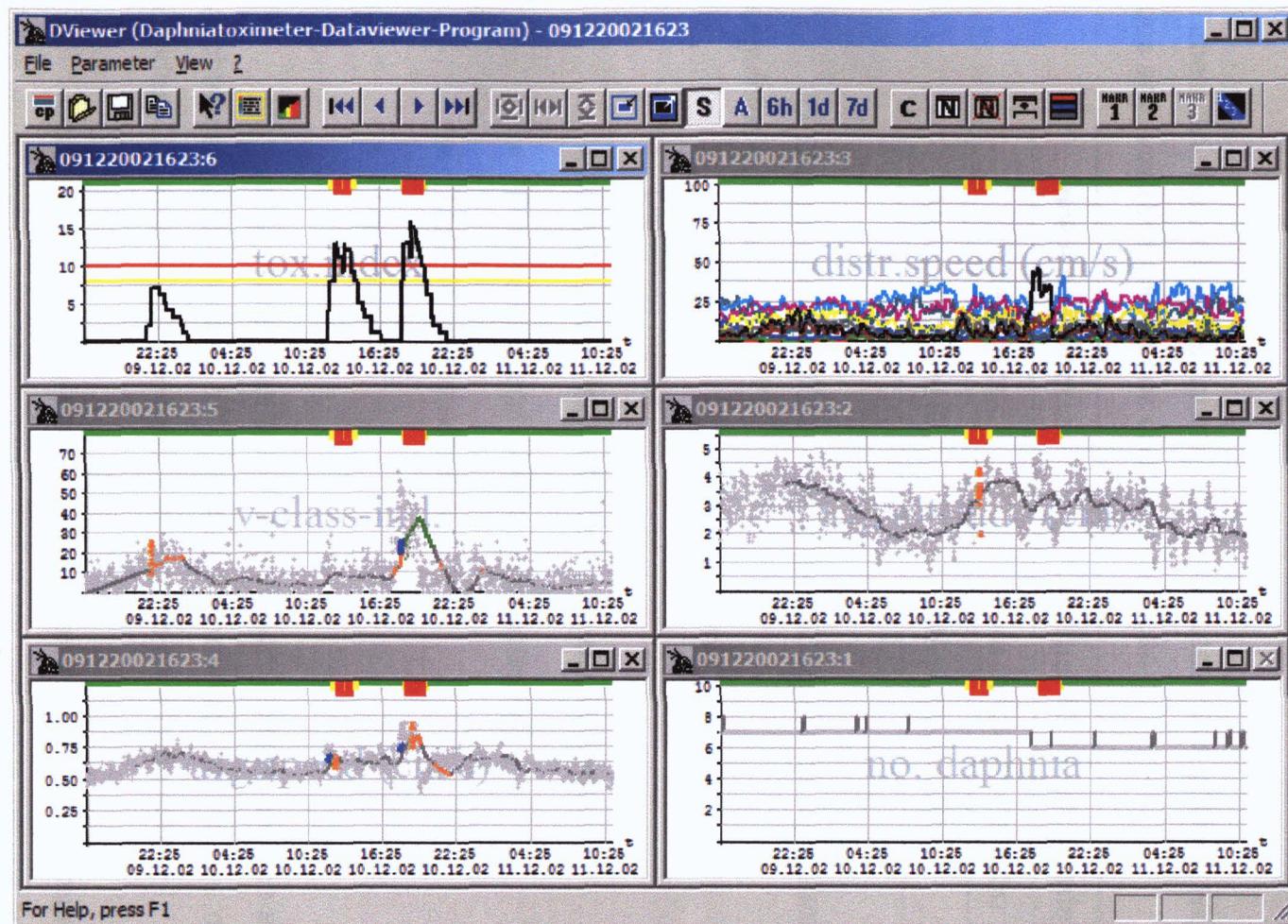


Figura 3.9. Gráfico de exemplo de visualização dos arquivos de registro dos dados de medição através do Dviewer.

Por conveniência e facilitação da visualização dos valores, os gráficos apresentados no item 6. (Resultados) apresentam a mesma configuração da Figura 3.9., onde foram selecionados apenas os gráficos de seis variáveis, como segue representado na tabela 3.1.:

Tabela 3.1. Esquema das figuras de apresentação dos gráficos (visualização dos arquivos de registros dos dados de medição).

Índice de Toxicidade	Distribuição da velocidade
V-Class index	Altura média de natação
Velocidade média	Número de dáfnias

O sistema conta ainda com a possibilidade de apresentação dos seguintes gráficos:

- Distância média
- Dimensão fractal (método da regressão linear)
- Dimensão fractal (método *Box counting*)
- Taxa de reconhecimento
- Temperatura

No eixo das abscissas está representado o tempo em que se estende a obtenção dos dados e no eixo das ordenadas, os valores dos dados obtidos. Observe-se que a escala é específica para cada variável.

Em todos os gráficos pode-se visualizar, na sua porção superior, uma faixa verde que se apresenta interrompida por pequenos trechos em amarelo ou vermelho. Essas cores indicam os períodos no tempo (eixo das abscissas) em que o Índice de Toxicidade apresenta-se abaixo do nível de

atenção (verde), entre este e o nível de alarme (amarelo) e acima do nível de alarme (vermelho).

A letra **C** que aparece na porção superior do gráfico (barra de cores) indica a presença de um comentário que é exibido por sobre o gráfico e está posicionado exatamente sobre o horário em que se deseja incluir informação em forma de texto.

Os pontos nos gráficos são as representações dos valores individuais num período de um minuto de leitura. A linha consiste nos valores calculados a cada dez minutos. As possibilidades de reconhecimento dinâmico de diferenças significativas entre um ponto e outro na linha são avaliadas pelo “Detector Adaptável Hinkley” (HINKLEY 1971, citado por LECHÉLT e col. 2000). Quando ocorre um alarme parcial detectado pelo Hinkley, indicando diferença significativa entre os pontos, é marcado na curva um ponto em cor diferente (laranja, verde ou azul). Para mais detalhes sobre o funcionamento do equipamento, devem ser consultados o manual do equipamento e/ou LECHÉLT e col. (2000).

4. SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE BIOMONITORAMENTO

Os monitoramentos contínuos, químico e biológico, no norte da Europa têm sido realizados desde os anos 70. Após três décadas de desenvolvimento, existem sistemas confiáveis de monitoramento químico de rios, mas o biológico ainda está em fase inicial de desenvolvimento (GUNATILAKA e DIEHL 2000). Contudo, já existem equipamentos em operação desde a década de 80 e, a partir desta época, um grande esforço foi feito para a construção de novas tecnologias de biomonitoramento para a prevenção de acidentes (LECHELT e col. 2000).

Um dos sistemas mais antigos de biomonitoramento contínuo é o “*Teste Dinâmico de Daphnia*” (KNIE 1978). Este equipamento tem sido utilizado desde 1982, predominantemente na Alemanha, Áustria, Benelux, Países Baixos e Bélgica, em aproximadamente 30 pontos (GUNATILAKA e col. 2000).

O princípio deste método consiste na reclusão, para observação, de 20 organismos (geralmente *Daphnia magna* ou *pulex*) em cada uma de duas câmaras-teste de 30mL de volume, nas quais há um fluxo contínuo de amostra com temperatura adequada. Estas câmaras possuem uma série de lâmpadas de infravermelho num lado e sensores do outro. A atividade de natação é registrada como impulsos quando os organismos cruzam o feixe de luz. Os impulsos são somados e apresentados em contagens de 10-15 minutos. Caso a qualidade da água/efluente em avaliação mude, os organismos reagem mudando também seu padrão de natação: passam a nadar mais lenta ou rapidamente. Quando um valor preestabelecido é ultrapassado, um alarme é deflagrado. A validação dos resultados é feita pela comparação dos registros traçados para cada uma das câmaras (Figura 4.1).



Figura 4.1 “Dynamic Daphniatest” (Teste Dinâmico de Daphnia) – Produzido por Elektron GmbH. Imagem proveniente de [<http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/wgmn/BFWS/Elektron-Daphtox.htm>], acessado em 04/09/2003.

Um outro equipamento, mais recente, que também utiliza *Daphnia* como sensor de contaminação da água, é o “*bbe Daphnia Toximeter*” (LECHELT e col. 2000; Figura 4.2). Este não se baseia nos feixes de infravermelho, mas numa câmera de vídeo para avaliar os movimentos dos oito a dez organismos sujeitos a um fluxo contínuo de água/amostra dentro da câmara. Através da digitalização e binarização da imagem captada pela câmera e da determinação do centro dos objetos (organismos) em movimento, são calculadas as distâncias percorridas, a velocidade, a altura de natação dentro da câmara, a distância entre os organismos, o número de organismos ativos e o modo como o movimento de cada organismo se dá.

A deflagração do alarme ocorre pelo reconhecimento de mudanças estatisticamente significativas em um ou mais parâmetros. Além disso, através de pesos e imposição de limites às variáveis, é apresentado um parâmetro único integrador das diversas variáveis analisadas, denominado Índice de Toxicidade. Para a composição deste índice, os seguintes eventos são avaliados:

- Limite inferior de velocidade média excedido
- Limite superior de velocidade média excedido
- Relação com o número inicial de organismos
- Mudanças na dimensão fractal do movimento dos organismos
- Mudanças no índice de classe de velocidade
- Mudanças na altura média de natação dos organismos
- Mudanças na distância média de natação entre os organismos

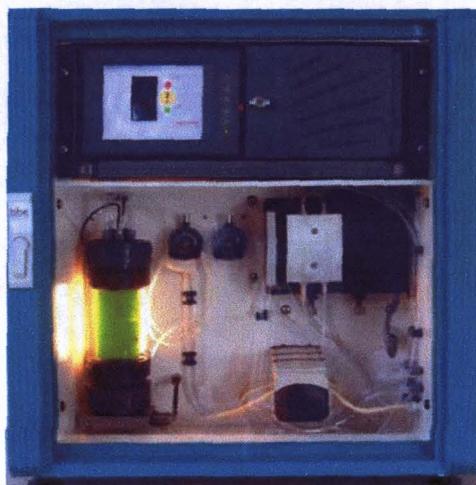


Figura 4.2. “bbe Daphnia Toximeter” (Toxímetro de Daphnia bbe) – Produzido por bbe Moldaenke GmbH. Imagem proveniente de [http://www.bbe-moldaenke.de/english/daphnien_toximeter_e.html] acessado em 09/08/2003.

O toxímetro de algas (*bbe Algae Toximeter*) compara periodicamente o efeito de uma amostra na fluorescência emitida por uma determinada quantidade de células de algas injetada numa câmara de teste com o efeito da água de controle. A medida da fluorescência leva 10 minutos. Caso haja algum dano nas células ocasionado por agentes químicos na amostra, a fluorescência será diminuída, pois a luz provida deixa de ser utilizada pelas algas na fotossíntese. Nesse caso, sendo significativa a diferença entre as emissões na amostra e no controle, haverá a deflagração de um alarme. Este equipamento, embora automático, é semi-contínuo, já que avalia amostras periodicamente (Figura 4.3).

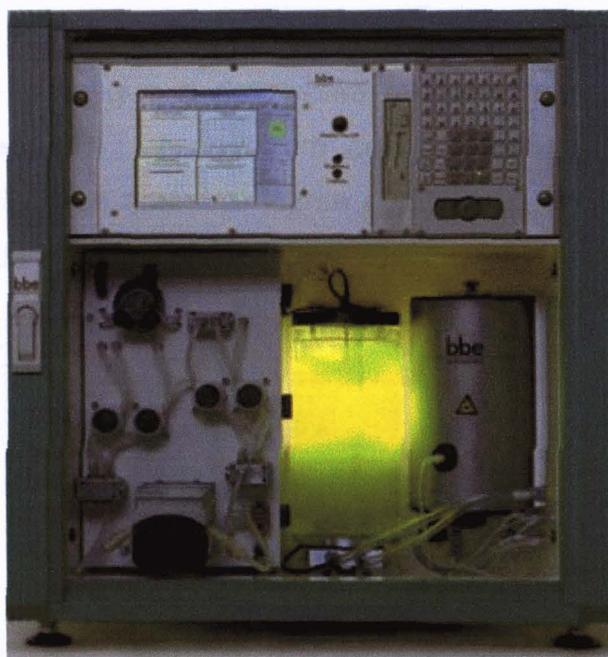


Figura 4.3 bbe Algae Toximeter (Toxímetro de Algas bbe) – Produzido por bbe Moldaenke. Imagem proveniente de [http://www.bbe-moldaenke.de/english/hz_online_e.html], acessado em 09/08/2003.

O princípio dos equipamentos que operam com bactérias luminescentes, como, por exemplo, o Microtox®-OS ([<http://www.siemens.co.uk/env-sys>]), é basicamente o mesmo descrito para as algas, contudo se baseia no fato de que as bactérias emitem luz como um subproduto da

respiração. Diferenças na emissão de luz entre amostra e controle, causadas pela inibição metabólica, são avaliadas e um alarme é deflagrado assim que tal diferença se torne significativa. Este equipamento, embora automático, é semi-contínuo, já que avalia amostras periodicamente.

A utilização de comunidades microbianas em bio-reatores simulando estações de tratamento de esgotos também foi aplicada na construção de biomonitores automáticos. Como exemplo, cita-se o *Stiptox* (Figura 4.4). O monitoramento da taxa de consumo de oxigênio por tais microorganismos foi automatizado e o efeito tóxico de substâncias entrando em contato com eles gera um decréscimo na taxa de respiração. Para que a comunidade microbiana não seja eliminada do sistema, que deve trabalhar sem supervisão por dias a fio, promove-se uma diluição da amostra automaticamente para que a depressão na taxa de respiração não seja nunca maior que 20%. Levando em conta a redução do consumo de oxigênio e a diluição da amostra, faz-se a leitura da toxicidade num tempo que pode variar de 3 a 15 minutos (Fig. 4.4).



Figura 4.4. Stiptox – Produzido por STIP Isco GmbH. Imagem proveniente de [<http://www.stateoftheart.it/stip.h2.jpg>], acessado em 09/08/2003.

Recentemente foi descrito um novo biomonitor automático, denominado *Ecotox*, que utiliza o flagelado *Euglena gracillis* (TAHEDL e HÄDER 2001). Este equipamento utiliza um microscópio miniaturizado acoplado a uma câmera de vídeo para analisar o movimento de cerca de 50 organismos no campo de visão de um total de 1000 organismos na câmara de observação. Esta é colocada na vertical para que possa ser avaliado o efeito na sua orientação gravitacional. Para evitar perturbação por fototaxia e produção de oxigênio por fotossíntese, um diodo de infravermelho ($\lambda_{\max}=875$ nm) é utilizado como fonte de iluminação. Esse sistema funciona como um executor automático de ensaio de toxicidade, onde, por meio de bombas e válvulas, se expõem os organismos a diversas diluições da amostra, em seqüência, determinando-se assim a CE50 da amostra. Tais resultados são comparados com um controle. O tempo total do procedimento de medida, incluindo teste do controle e da amostra, enchimento e lavagem do sistema, requer oito minutos e meio. Este equipamento, embora automático, é semi-contínuo, já que avalia amostras periodicamente.

O comportamento de bivalves frente a poluentes na água também tem sido utilizado no biomonitoramento contínuo. Tais organismos possuem duas conchas (valvas) que, em condições ambientais normais, são mantidas abertas para respiração e alimentação. Por serem sedentários, ao fechar as valvas, em condições desfavoráveis, esses organismos podem excluir, fisicamente, o ambiente externo e, caso as condições não sejam muito ruins, muitas espécies podem sobreviver por dias. Esta resposta pode ser utilizada como indicativo da presença de agentes químicos na água. Tal comportamento varia de espécie para espécie e, não raro, de indivíduo para indivíduo. Assim, é possível se obter períodos de fechamento de valvas mais prolongados em condições normais de qualidade da água. Contudo, a avaliação do conjunto de organismos expostos bem como do comportamento da espécie utilizada é um meio de se obter respostas indicativas da presença de produtos químicos na água. Várias espécies de mexilhões podem ser utilizadas e é altamente recomendável o uso de

espécies locais, caso o tamanho das valvas seja adequado à aplicação nos aparelhos (KRAMER e FOEKEMA 2000) (Figura 4.5).

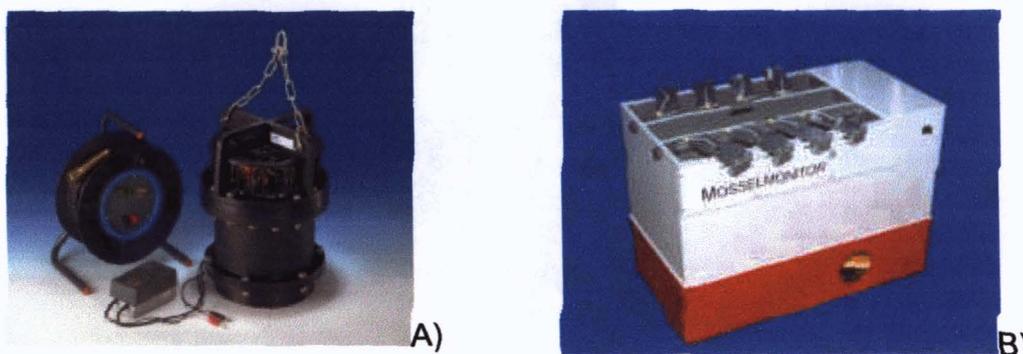


Figura 4.5. MusselMonitor® – Produzido por Kema GmbH. A) Versão in situ. B) versão “flow-through”. Imagem proveniente de [http://www.mosselmonitor.nl/01_engels/01_starteng.htm], acessado em 09/08/2003.

Os equipamentos que utilizam peixes para a detecção de poluentes na água são certamente os mais antigos e, sem dúvida, os que trouxeram a público a possibilidade de monitoramento contínuo da água com organismos aquáticos. Existem diversos tipos de metodologias de avaliação do estresse provocado por substâncias químicas em peixes, que incluem comportamento de ventilação (batimentos operculares), atividade locomotora, reotaxia e descarga de órgãos elétricos.

A avaliação dos batimentos operculares e atividade locomotora de peixes se baseia no campo bioelétrico resultante de suas atividades musculares captadas por eletrodos submersos na água. Os sinais captados são então amplificados, filtrados e analisados por um sistema computadorizado. Cerca de 8 a 12 organismos são monitorados, e quando um número significativo apresenta comportamento alterado, é deflagrado um alarme (Figura 4.6).

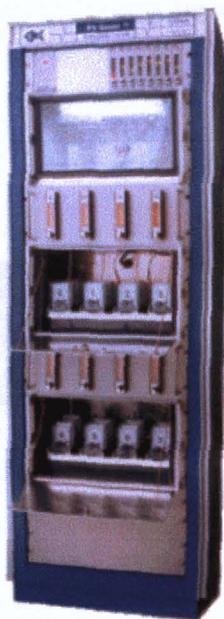


Figura 4.6. Bio-Sensor® – Produzido por Biological Monitoring, Inc. Imagem proveniente de [<http://www.biomon.com/biosenso.html>], acessado em 09/08/2003.

A reotaxia de peixes, ou seja, sua capacidade de mover-se de acordo com o fluxo e direção do meio onde se encontram, pode ser acessada por equipamentos automáticos. Um deles, proposto por JUHNKE e BESCH (1971), citados por HENDRICKS e STOUTEN (1993), opera com fluxo contínuo e, periodicamente, induz os peixes a uma natação forçada por aumento do fluxo. Uma tela com sensor é instalada na parte traseira da câmara de observação, na direção do fluxo, e gera impulsos pelo contato com os peixes. Se um composto tóxico é introduzido na água em análise, os peixes tendem a fugir ou sua condição é afetada de tal forma que eles não podem mais manter sua posição no fluxo. Assim, os organismos são empurrados contra a tela e um alarme é deflagrado.

Da mesma forma que os cladóceros, os peixes podem também ser avaliados quanto ao seu comportamento de natação através do sistema de processamento de imagens capturadas por câmera de vídeo (SPIESER e

col. 2000, BAGANZ e col. 2000 e BLÜBAUM-GRONAU e col. 2000). Um exemplo disponível no mercado atual é o bbe Fish Toximeter (Figura 4.7).

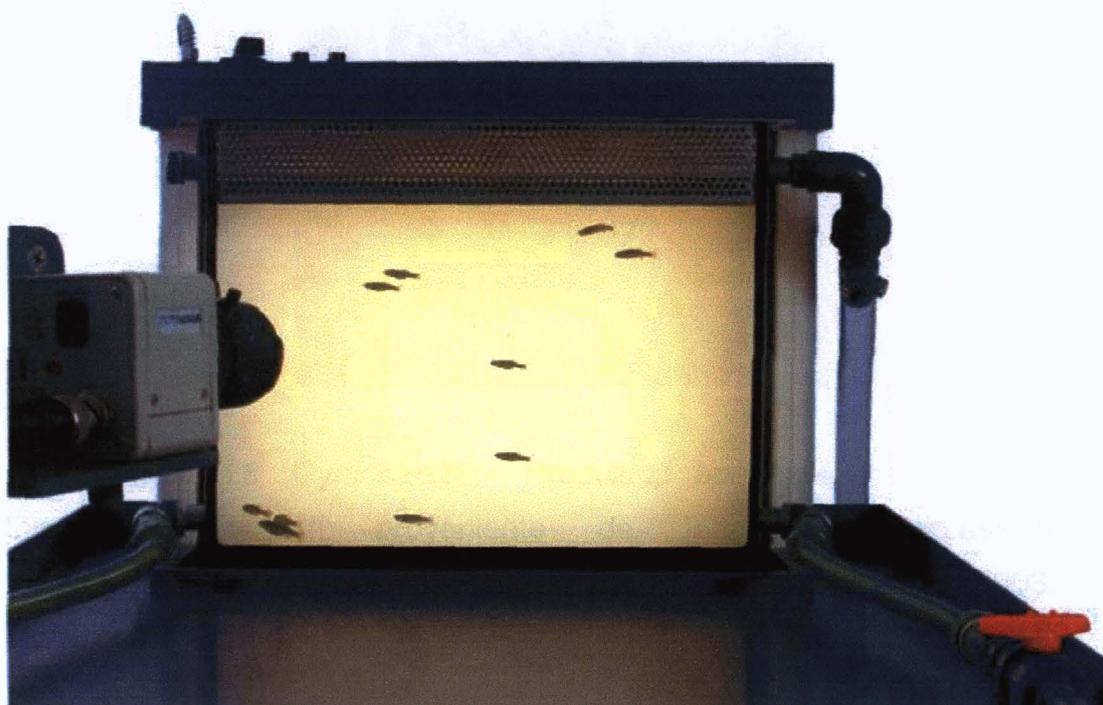


Figura 4.7 bbe Fish Toximeter (Toxímetro de Peixes bbe) – Produzido por bbe Moldaenke. Fotografia proveniente de [http://www.bbe-moldaenke.de/english/hz_online_e.html], acessado em 15/04/2004.

Outro biomonitor disponível no mercado é o *Gymnotox*® (Figura 4.8), que avalia os sinais elétricos sinusoidais emitidos espontaneamente por peixes elétricos da espécie *Apteronotus albifrons* (Apteronotidae, Gymnotiformes). Este equipamento conta com alimentador automático para os peixes e, para sua proteção, assim que é detectado um efeito tóxico, o sistema é lavado com água limpa proveniente de um reservatório próprio. Um alarme é garantido pela emissão de sinais alterados de três peixes em observação. Os princípios do equipamento e alguns resultados podem ser encontrados nos trabalhos de THOMAS e col. (1996, 1998).

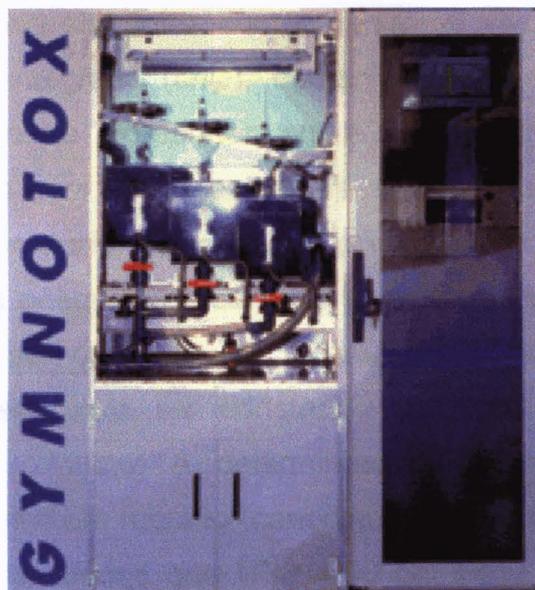


Figura 4.8. Gymnotox® – Produzido por Equipement Realization Ingenierie. Imagem proveniente de [[http://www.nancie.asso.fr/cgi-local/xsh/page\(val:life_en_project_gymnotox\)](http://www.nancie.asso.fr/cgi-local/xsh/page(val:life_en_project_gymnotox))], acessado em 04/09/2003.

O MFB, “*Multispecies Freshwater Biomonitor*”, utiliza a medida e análise de diferentes tipos de comportamento de diversas espécies de organismos aquáticos, inclusive simultaneamente, para o monitoramento *on-line* da qualidade da água doce ou salgada. A unidade de medição é a própria câmara teste, que pode ser imersa diretamente na água a ser analisada. O princípio de medida é baseado na análise das mudanças no campo elétrico de corrente alternada (conversão da impedância). Este sistema pode trabalhar com câmaras de diversos tamanhos e testar tanto água como sedimento. Baseado na avaliação dos sinais elétricos gerados pelos organismos, este equipamento pode apresentar como sensores espécies nativas e representativas dos corpos receptores em avaliação (GERHARDT 1999b). Esta idéia não é original, já que MORGAN e col. (1987) já haviam apresentado trabalho referente ao uso de diversas espécies sendo avaliadas ao mesmo tempo num mesmo aparelho.

Como exemplo de biossensor, como definido anteriormente neste trabalho, combinando eletrônica com organismos vivos, foi produzido um circuito eletrônico integrado (*chip*), contendo bactérias bioluminescentes. Este *chip*, chamado de *bioreporter*, emite uma luz visível verde azulada quando em contato com certos poluentes e explosivos. De acordo com o laboratório que o produziu, este sensor, por ser barato, pequeno, robusto, não requerer muita energia elétrica e por poder funcionar sem cabos a ele conectados, pode ser colocado em lugares onde nenhum outro sistema poderia. Além disso, pode ser construído de forma a responder muito específica e sensivelmente a determinadas substâncias e também a transmitir um alarme a um receptor conectado a um computador. Espera-se que tal sensor custe menos que US\$ 1,00 por peça numa produção em massa (<http://www.sciam.com/article.cfm?articleID=00067164-2F29-1D5D-90FB809EC5880000>).

Com base nos diversos equipamentos disponíveis, pode-se efetuar uma comparação entre eles, disponibilizando-se, assim, uma fácil visualização de suas principais características, facilitando a seleção do que for mais conveniente em cada situação específica (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Comparação dos diversos biomonitores apresentados.

Sistema	Organismo	Princípio de medição	Características principais
<i>Teste Dinâmico de Daphnia</i>	<i>Daphnia</i>	Comportamento de natação por sensores de infravermelho	Pouca eletrônica envolvida; fácil cultivo de organismos; verificação de natação apenas na vertical
<i>bbe Daphnia toximeter</i>	<i>Daphnia</i>	Comportamento de natação por digitalização de imagem	Verificação da natação em todos os sentidos. Pode trabalhar com duas câmaras isoladas
<i>bbe Algae toximeter</i>	Algas (várias espécies)	Variação na atividade fotossintética (fluorescência)	Sensível para herbicidas. Serve também para identificar grupos de algas na amostra
<i>Microtox® OS</i>	Bactérias luminescentes	Avaliação da variação da fluorescência	Semi-contínuo
<i>Stiptox</i>	Microorganismos	Consumo de oxigênio	Reproduz estação de tratamento por lodos ativados
<i>Ecotox</i>	<i>Euglena gracilis</i>	Análise de imagem digitalizada	Faz comparação com um controle. Semi-contínuo
<i>MusselMonitor®</i>	Bivalves (várias espécies)	Frequência e amplitude de abertura de valvas	Trabalha com espécies locais. Também trabalha com águas marinhas
<i>Bio-Sensor®</i>	Peixes (várias espécies)	Campo bioelétrico gerado por atividade neuromuscular	Trabalha com até doze peixes em câmaras isoladas
<i>bbe Fish toximeter</i>	Peixes (várias espécies)	Comportamento de natação por digitalização de imagem	Verificação da natação em todos os sentidos
<i>Gymnotox®</i>	<i>Apteronotus albifrons</i>	Frequência de descargas dos órgãos elétricos	Trabalha com 3 peixes em câmaras isoladas
<i>Multi Freshwater Biomonitor</i>	Qualquer um que caiba na câmara	Conversão de impedância - Campo bioelétrico gerado por atividade neuromuscular	Trabalha com várias espécies inclusive simultaneamente. Também trabalha em águas marinhas

5. APLICAÇÕES DE BIOMONITORAMENTO AUTOMÁTICO

A adequação do uso de equipamentos automáticos no monitoramento da qualidade da água tem o mesmo arsenal de argumentos favoráveis ao uso de respostas biológicas obtidas nos testes de toxicidade clássicos, apresentados por inúmeros autores. Apesar de não fornecerem informação quantitativa ou qualitativa sobre um determinado agente químico, sua força reside no fato de operarem continuamente, apresentarem respostas rapidamente e detectarem um amplo espectro de substâncias químicas (GERHARDT 1999b, KRAMER e FOEKEMA 2000).

Essa possibilidade pode servir para o gerenciamento dos recursos hídricos de várias formas. A primeira aceção de uso, defendida por CAIRNS e col. nos repetidos trabalhos publicados (CAIRNS 1975; CAIRNS e col. 1973, 1975), refere-se ao controle da emissão de efluentes e dos corpos receptores. Sistemas de monitoramento contínuo instalados em indústrias dariam um aviso caso a toxicidade de seus efluentes excedesse a normalidade ou o nível permitido. Nesse caso, um controle interno, automático e induzido pelo próprio biomonitor reteria o efluente antes que este fosse lançado no corpo receptor, podendo ser retornado ao sistema de tratamento ou conduzido a um tanque de contenção. Com isso, o processo gerador do efluente poderia ser analisado (quanto a possíveis erros de operação), reduzido ou parado, conforme o plano de contingência implantado pelo sistema de gestão ambiental.

Uma outra forma de utilização desse tipo de sinal seria o gerenciamento da qualidade dos recursos hídricos em termos de bacia hidrográfica ou considerando os diversos agentes poluidores de um rio. Numa situação onde uma indústria tenha tido problemas e lançado uma carga tóxica, duas ações poderiam ser tomadas pelos gerenciadores do manancial. Uma delas seria a contenção de novos lançamentos ao corpo receptor por parte das demais indústrias usuárias do corpo receptor. Esse

procedimento poderia reduzir a carga tóxica a ser suportada pela comunidade aquática. A outra ação possível, porém menos viável, dependendo da distância do local onde ocorreu o lançamento irregular, seria a liberação de uma maior quantidade de água do reservatório a montante, resultando numa diluição da carga tóxica. Uma desvantagem desta ação é o efeito do maior volume de água e, portanto, do fluxo de água, na comunidade adaptada ao ambiente menos turbulento, o que poderia resultar num arraste de espécies, destruição de nichos e, dependendo da época, desovas e larvas de peixes, fito e zooplâncton e demais organismos de vida livre. Este conceito, portanto, envolve o gerenciamento de risco de acidentes e a proteção das comunidades aquáticas, que, dependendo do local, podem constituir importante fonte de alimento, além dos benefícios relativos ao tratamento dos resíduos lançados na água.

Outra possibilidade de uso de tais equipamentos consiste na avaliação contínua da água captada em estações de tratamento para consumo humano. Na Alemanha, biomonitores têm sido parte integrante de todas as estações de controle da qualidade da água para abastecimento público; assim, caso seja acusada a presença de substâncias químicas em concentrações suficientes para causar efeito adverso aos organismos, tal água não deve ser utilizada para consumo humano e, por isso, deve ser interrompida a captação para este fim.

Segundo um levantamento feito pelo órgão de proteção ambiental do Estado de Baden-Württemberg e atualizado pelo Departamento de Meio Ambiente e Saúde de Hamburgo, Alemanha, obtido através de comunicação pessoal com Christian Moldaenke (figura 5.1), um total de 65 equipamentos de biomonitoramento contínuo, entre os quais 14 toxímetros e 13 "Testes dinâmicos com *Daphnia*" estão instalados pelo país. Considerando a Europa como um todo, cerca de 30 desse último estão instalados em diversos pontos de rios na Alemanha, Áustria, Holanda e Bélgica (GUNATILAKA e col. 2000).

Evidencia-se aqui uma outra preocupação que tem gerado demanda por biomonitores: os ataques terroristas. Há atualmente, decorrente do ataque ao WTC de NY, em 11/09/2001, um temor por novos atentados. Devido ao fato de que a rede pública de abastecimento atinge uma grande quantidade de pessoas, essa é uma via a ser fortemente protegida contra o lançamento de produtos químicos altamente tóxicos, que em baixas concentrações podem causar graves problemas à saúde humana. Um exemplo prático de aplicação foi durante os Jogos Olímpicos de Inverno de 2002, em Salt Lake City, Utah, EUA. Naquele local, as quatro agências de abastecimento de água mais importantes decidiram instalar toxímetros de *Daphnia* e contam atualmente com seis desses equipamentos (MOLDAENKE, comunicação pessoal).

Relacionadas a esse uso, novas tecnologias baseadas em biossensores com especificidade para determinadas substâncias utilizadas em armas de destruição em massa vêm se somar à capacidade de detecção dos biomonitores (BUTTERWORTH e col. 2002).

Cabe ressaltar que a utilização de organismos aquáticos é pertinente, pois tais organismos são sensíveis e estão continuamente expostos, o que permite seu uso como indicador. Contudo, não há relação direta entre os efeitos sobre os organismos aquáticos e aqueles sobre os seres humanos.

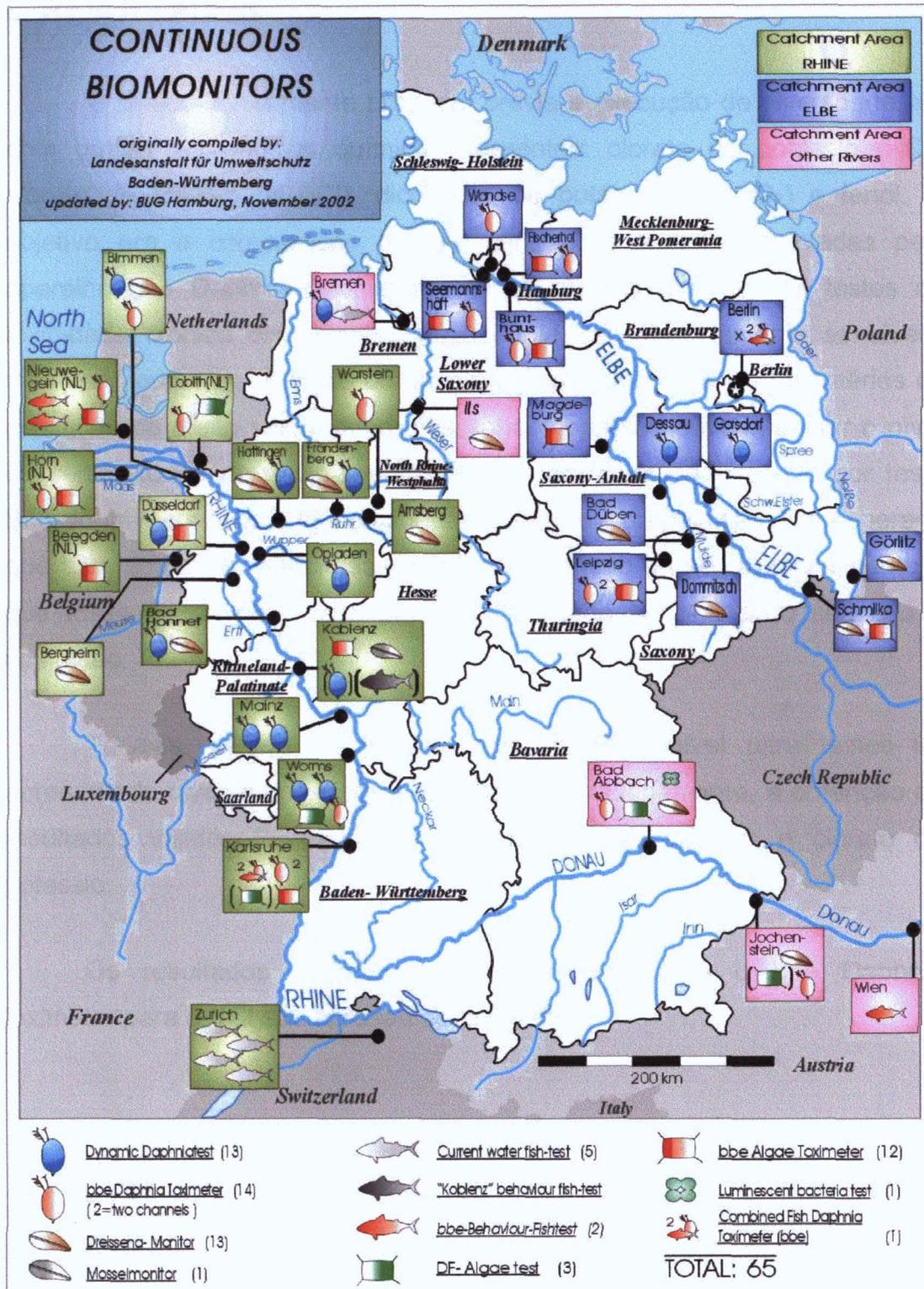


Figura 5.1 – Distribuição de biomonitores em uso na Alemanha, Áustria, Bélgica, Suíça e Holanda (Segundo Christian Moldaenke, comunicação pessoal).

6. RESULTADOS

O projeto inicialmente proposto previa a execução de diversos testes com quatro substâncias químicas diferentes: cloreto de potássio (KCl), cloreto de amônio (NH₄Cl), dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) e fenol. O objetivo era a comparação das concentrações tóxicas detectadas pelo aparelho bbe Daphnia toximeter com as obtidas através dos testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, reconhecidamente sensíveis, mas com tempo de duração de ensaio de sete dias. Embora os critérios de avaliação de efeito sejam diferentes, tal comparação deveria definir o nível de sensibilidade do equipamento em relação a um dado obtido por teste tradicional reconhecido mundialmente no controle da poluição. Era esperado que esta abordagem trouxesse uma compreensão do seu funcionamento e que fosse criada uma base de dados primária possibilitando seu uso e aceitação.

Todavia, devido ao fato do aparelho disponível para testes ter apresentado diversos problemas técnicos de funcionamento, a obtenção de resultados válidos foi restrita a apenas uma substância: o cloreto de potássio.

Os resultados obtidos experimentalmente com o bbe Daphnia toximeter para o KCl são apresentados a seguir:

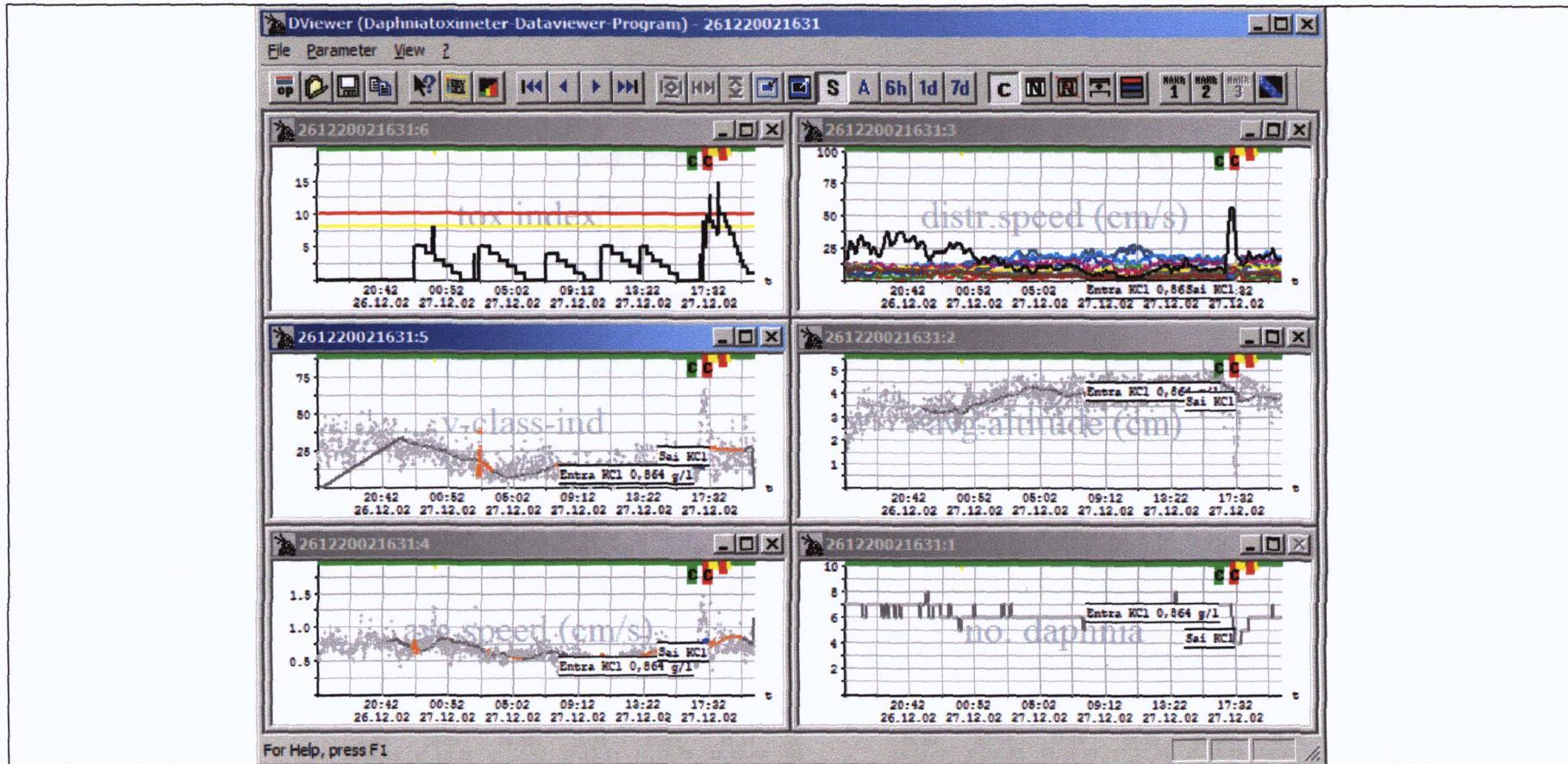


Figura 6.1. Teste realizado em 26/12/2002, apresentando efeito com KCl 0,864 g/l. Início de exposição às 16:31h e final às 17:29h.

Neste ensaio, é possível indicar a diferença na velocidade média como fator determinante do alarme obtido.

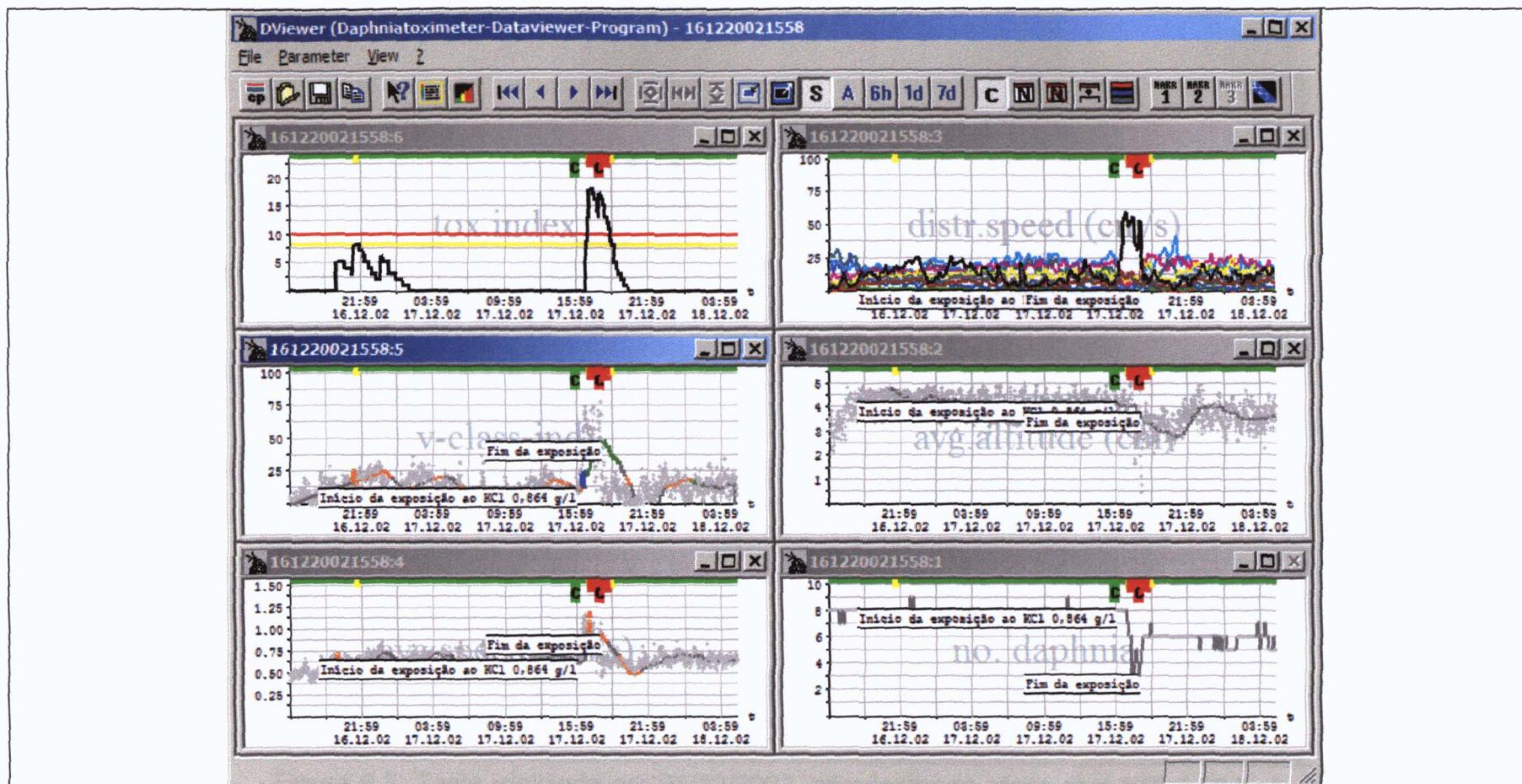


Figura 6.2. Teste realizado em 16/12/2002, apresentando efeito com KCl 0,864 g/l. Início de exposição às 15:58h e final às 17:58h.

Neste ensaio, as variáveis determinantes do alarme foram a velocidade e o número de organismos ativos.

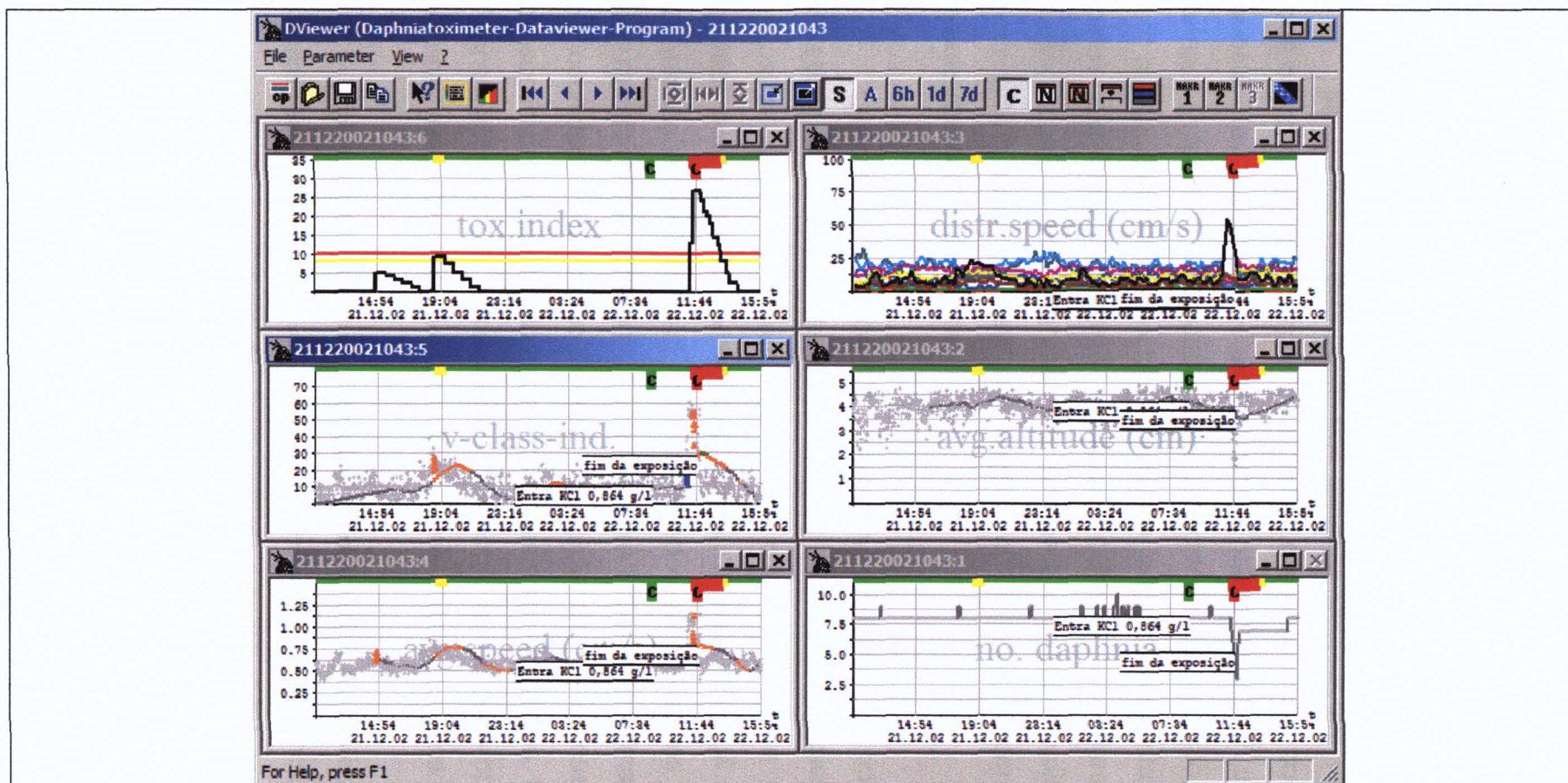


Figura 6.3. Teste realizado em 21/12/2002, apresentando efeito com KCl 0,864 g/l. Início de exposição às 8:53h e final às 11:51h.

Neste ensaio tem-se novamente a velocidade e o número de organismos ativos como causadores do alarme.

7. DISCUSSÃO

7.1. Sensibilidade

Os dados apresentados nas diversas publicações obtidas mostram que os equipamentos disponíveis podem detectar baixas concentrações de substâncias químicas das mais diversas naturezas e num curto espaço de tempo. Entretanto, a ampliação da capacidade de predição de efeito deve ser buscada através do conhecimento do leque de respostas apresentadas pelos experimentos, como variância, número de testes realizados e metodologia utilizada. Nenhum dos autores dos trabalhos cuja publicação foi acessada apresentou tais informações e, portanto, a confiabilidade dos resultados fica prejudicada.

Embora a comparação entre os resultados obtidos nos testes *estáticos*, tradicionalmente utilizados para se detectar a toxicidade aguda de amostras de água, efluente ou substâncias químicas, e nos *dinâmicos*, obtidos por meio dos biomonitores contínuos, seja difícil, já que os critérios de avaliação de efeito, bem como as metodologias utilizadas para expressão dos resultados são diferentes, elas são uma importante forma de se avaliar a aplicabilidade dos biomonitores, sua eficiência e representatividade na detecção de efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Poucos autores fizeram este tipo de comparação, mas como forma de propaganda esta é sempre o ponto chave de se mostrar a sensibilidade dos aparelhos.

As comparações mencionadas acima, entre os testes estáticos e os dinâmicos, mostram que, para determinadas substâncias e espécies utilizadas, a sensibilidade dos biomonitores é muito alta. Exemplos disso são apresentados por HENDRICKS e STOUTEN (1993). Comparando os testes estáticos e dinâmicos com peixe (*Leuciscus idus*, Cyprinidae), estes autores relatam uma diferença para a amônia de cerca de 23 vezes e para a 3,4 dicloroanilina de 40 vezes (Tabela 7.1). Entretanto, estes autores concluíram

que as respostas obtidas pelo biomonitor utilizado com peixes estão próximas à concentração letal para estes organismos. No caso da comparação dos testes com *Daphnia*, os estáticos demonstraram ser mais sensíveis que os dinâmicos. Contudo, os tempos de detecção foram geralmente mais baixos que os dos testes estáticos (Tabela 7.2), o que traz um grande avanço quando se trata de se tomar providências relativas ao gerenciamento de bacias ou corpos hídricos afetados por lançamentos indesejados de poluentes. Ainda, é esperado que os testes dinâmicos com cladóceros sejam especialmente úteis para compostos que têm efeito sobre artrópodes em baixas concentrações, tais como os inseticidas organofosforados (HENDRICKS e STOUTEN 1993).

Tabela 7.1. Comparações de resultados obtidos por diversos autores entre testes estáticos e dinâmicos com o ciprinídeo *Leuciscus idus*, segundo HENDRICKS e STOUTEN (1993). Diferenças de sensibilidade acima de 1 mostram que os testes dinâmicos são mais sensíveis que os estáticos. ⊕ (dia) = tempo de detecção em dias.

Substância	Estático LC50; 1 dia (mg/L)	Dinâmico (mg/L)	⊕ (dia)	Diferença de sensibilidade (Estático/dinâmico)
3,4 Dicloroanilina	20	0,5	0,8	40
Amônia	28	1,2	0,1	23,3
Cádmio	0,68	0,3	0,8	2,7
Disulfoton	10	7	0,8	1,4
Endosulfan	0,006	0,005	1	1,2
Endrin	0,012	0,015	1	0,8
LAS	7,5	5,4	3,2	1,4

Tabela 7.2. Comparações de resultados obtidos por diversos autores entre testes estáticos e dinâmicos com o cladóceros *Daphnia magna*, segundo HENDRICS e STOUTEN (1993). Diferenças de sensibilidade acima de 1 mostram que os testes dinâmicos são mais sensíveis que os estáticos. ☉ (dia) = tempo de detecção em dias

Substância	Estático LC50; 1 dia (mg/L)	Dinâmico (mg/L)	☉ (dia)	Diferença de sensibilidade (Estático/dinâmico)
3,4 Dicloroanilina	0,7	3,6	1,1	0,2
Cádmio	0,13	0,36	0,4	0,36
Clorofenol	0,002	0,008	0,3	0,25
Diazinon	0,002	0,008	0,3	0,25
Disulfoton	<0,060	0,1	0,5	~0,6
Endosulfan	0,51	0,4	0,5	1,3
Paraquat	4,8	>7,4	0,5	~0,6
LAS	7,8	0,48	0,1	16,25
Paration-etil	0,002	0,005	0,1	0,4
Paration-metil	0,004	0,005	0,2	0,8
Pentaclorofenol	1,1	0,28	0,6	3,9
Thiomethon	8,2	0,4	0,5	20,5

GERHARDT (2000) estudou diversas espécies para utilização em seu "Multi Freshwater Biomonitor". Algumas delas apresentaram reação a concentrações cerca de 100 vezes mais baixas no teste dinâmico que no teste estático, ambos avaliando padrão de comportamento (Tabela 7.3). Deve ser feita a ressalva de que apenas metais foram testados por esta autora.

Tabela 7.3. Comparação dos dados obtidos para diferentes espécies de artrópodes e gastrópodes avaliando padrão de comportamento em testes estático e dinâmico. Diferenças de sensibilidade acima de 1 mostram que os testes dinâmicos são mais sensíveis que os estáticos (GERHARDT 2000).

Substância	Espécie	Estático (120h) mg/l	Dinâmico (120h) mg/l	Diferença de sensibilidade (Estático/dinâmico)
Cádmio	<i>L. marginata</i> (Ephemeroptera)	5	≥0,05	100
	<i>P. flavomaculatus</i> (Trichoptera)	>2500	≥100	25
Chumbo	<i>B. niger</i> (Ephemeroptera)	1	0,01 (72h)	100
	<i>L. marginata</i> (Ephemeroptera)	1,3	≥0,5	2,6
	<i>G. pulex</i> (Crustacea)	>0,5	≥0,01 (1h)	50
Cobre	<i>A. auriculata</i> (Ephemeroptera)	0,18 (96 h)	0,046	3,9
	<i>B. stenochorias</i> (Gastropoda)	0,07 (96h)	≥0,06	1,2
Ferro	<i>L. marginata</i> (Ephemeroptera)	63,5 (pH 4,5)	40,2	1,6
		98 (pH 7,0)	70,0	1,4

Além destes trabalhos, o de LITTLE e col. (1985) apresentou avaliações comportamentais em toxicologia aquática, numa abordagem não relacionada a biomonitorios. Os dados foram obtidos para diversas espécies de peixes e diferentes variáveis comportamentais tais como atividade locomotora, alimentar, reprodutiva etc. Alguns exemplos de resultados obtidos para alterações na atividade locomotora são apresentados na Tabela 7.4 e mostram que, para algumas substâncias, há diferença no tempo de percepção de efeito, enquanto que, para outras, há diferença na concentração detectada.

Tabela 7.4. Resultados apresentados em revisão de LITTLE e col. (1985).

Diferenças de sensibilidade acima de 1 mostram que os testes que avaliam o comportamento são mais sensíveis que os estáticos. ⊕ (h) = tempo de detecção em horas

Composto	Espécie	Conc. letal (mg/l) (A)	⊕ (h)	Conc. que afeta o comportamento (mg/l) (B)	⊕ (h)	Diferença de sensibilidade (A / B)
Amônia	<i>M. salmoides</i>	10	23	0,5	16	20
Cobre	<i>M. salmoides</i>	1,0	18	0,1	6	10
Diquat	<i>S. gairdneri</i>	90	24	0,5	24	180
Fenitrotion	<i>O. kisutch</i>	1,3	96	0,46	2	2,8
Fenol	<i>M. salmoides</i>	10	7	1	5	10
Lindane	<i>S. gairdneri</i>	0,060	4-8	0,060	0,75	1
Simazine	<i>S. gairdneri</i>	>200	24	1	24	200

Outros trabalhos disponíveis que avaliaram biomonitorios não apresentam dados de comparação da mesma forma como o fizeram os elencados anteriormente. Porém, podem ser apresentados como forma de comparação de sensibilidade entre aparelhos e diferentes sistemas (Tabela 7.5).

Tabela 7.5. Comparação entre dados disponíveis de diversos biomonitorios.

⊕ (min) = tempo de detecção em minutos.

Substância	Gymnotox ⁰¹		Bio-Sensor ⁰²		bbe Daph tox ³		Ecotox ⁴	
	Conc. (µg/l)	⊕ (min)	Conc. (µg/l)	⊕ (min)	Conc. (µg/l)	⊕ (min)	Conc. (µg/l)	⊕ (min)
Cianeto	35	24	-	-	<10	-	41000	8,5
Cobre	-	-	50	15	<0,25	-	-	-
Fenol	1000	35	500	17	-	-	-	-
Formaldeído	-	-	500	20	-	-	27100	8,5
PCP	-	-	140	33	-	-	3000	8,5
Prata	-	-	-	-	1	-	540	8,5
Tricloroetileno	600	104	5	<60	-	-	-	-
Zinco	-	-	100	15	-	-	164000	8,5

1 - [<http://pro.wanadoo.fr/er.ingenierie/gymnotox2.htm>] (acessado em 15/04/2004)

2 - GRUBER e RASNAKE 1999

3 - CHRISTIAN MOLDAENKE (comunicação pessoal)

4 - TAHEDL e HÄDER 2001

Como podem ser observados nas tabelas anteriores, os dados são poucos e dificilmente comparáveis, sendo necessária uma padronização que possibilite um confronto mais adequado das metodologias aplicáveis atualmente no biomonitoramento automático. Contudo, é notória a tendência de detecção de efeitos tóxicos mais rapidamente quando se utilizam variáveis comportamentais, o que está de acordo com as afirmações de WARNER (1967) e BLAXTER & HALLERS-TJABBES (1992), citados por GERHARDT (1996).

Os resultados obtidos nos poucos ensaios válidos do presente estudo mostram que a concentração detectada está na faixa de letalidade obtidas por BAER e col (1999) para *Daphnia*. Isto pode ter ocorrido pela característica da substância que atua no equilíbrio osmótico celular de forma bastante rápida. Estes dados entram em concordância com aqueles apresentados para o biomonitor com peixes por HENDRICKS e STOUTEN (1993).

Para ampliar a discussão acerca do padrão geral de resposta do toxímetro é necessária a realização de ensaios com outras substâncias, inclusive de grupos diferentes. Ressalta-se que GERHARDT (2000) também utilizou apenas dados dos efeitos de metais para divulgação do *Multi Freshwater Biomonitor* e seria importante, para um melhor esclarecimento acerca das propriedades deste equipamento, que a autora também fornecesse dados com substâncias de diferentes grupos.

Apesar da primariedade dos dados, evidencia-se que a "ultra-sensibilidade" do *bbe Daphnia toximeter*, termo utilizado no título do estudo de LEHELDT e col. (2000), não reside na concentração detectada, mas na velocidade de detecção do agente químico na água, já que é possível obter resultados em menos de duas horas de exposição. Ressalta-se que estes autores também não apresentaram dados para a avaliação da sensibilidade do aparelho, dando apenas dois exemplos de resposta a pesticidas, triclorfon e pendimetalin.

7.2. Relevância ecológica

Um ponto a ser considerado na escolha do tipo de equipamento ou mesmo na escolha da espécie e abordagens é o mito da espécie mais sensível como o melhor indicador ambiental (CAIRNS 1986). Segundo este autor, a sensibilidade de uma espécie é função de diversos fatores inter-relacionados, como condições ambientais, estado de saúde, interações competitivas. Portanto, a capacidade de predição e não a sensibilidade deve ser o assunto primordial a ser considerado quando se analisa a utilidade final de qualquer método ecotoxicológico (CAIRNS 1986).

Essa discussão não é recente e não são muitos os que defendem esta abordagem. A razão para a busca de espécies sensíveis é a facilitação e o barateamento do processo de avaliação, já que a implementação rotineira de biomonitoramento requer o atendimento de certos requisitos práticos que tornem factível sua execução. Além disso, o uso de espécies mais sensíveis garantiria a proteção das demais espécies do corpo hídrico receptor dos lançamentos.

Nesse caso, o uso de espécies locais, sensíveis e pertencentes a diferentes níveis tróficos, poderia dar informação mais significativa (GERHARDT 1999b). Porém, afirma CAIRNS (1981), há pouco ganho em relação ao uso de apenas uma ou duas espécies padronizadas, já que há que se pensar que um organismo vive em uma biocenose e, portanto, interage com outros elementos desta esfera mesmo sob efeito de um agente estressor, e que estas inter-relações interferem na forma como cada indivíduo reage.

Para reduzir esta “falta de realismo ecológico”, apresentam-se disponíveis trabalhos como os de MORGAN e col. (1987) e GERHARDT (1999b), que estudaram o uso de mais de uma espécie, concomitantemente, na medição contínua de toxicidade e concluíram que tal ação é indispensável para um monitoramento adequado e abrangente. Uma outra possibilidade seria trabalhar não apenas com um, mas uma bateria de

biomonitores, utilizando, como sensores, espécies de diferentes grupos ecológicos. Esta situação é bastante freqüente nos países europeus e norte-americanos, que fazem uso de biomonitores com cladóceros, peixes e algas, simultaneamente, nos pontos de monitoramento. Como exemplo, pode ser citado o trabalho de PENDERS e STOKS (1999) da WRK Water Works, Países Baixos.

7.3. Controle de qualidade analítica

Em nenhum dos trabalhos de apresentação e aplicação do biomonitoramento automático é fornecida indicação de como se fazer um controle do funcionamento dos biomonitores instalados nos pontos de monitoramento. A verificação periódica da sensibilidade do equipamento deve ser realizada para se ter certeza acerca do seu funcionamento. Uma forma de verificação e apresentação destes resultados pode ser a elaboração de uma carta-controle, utilizando-se uma substância de referência conhecida e plotando-se o tempo de deflagração do alarme em função da concentração definida que causa efeito. Com isso, uma base de dados seria criada e o aparelho, testado periodicamente, o que aumentaria a confiabilidade das respostas obtidas nos eventos detectados durante o monitoramento contínuo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não haver muitos dados disponíveis acerca da sensibilidade dos equipamentos comercializados, um grande movimento na área de biomonitoramento contínuo pode ser percebido pela frequência dos seminários, congressos e reuniões onde se discute o tema. Com isso, espera-se que num futuro próximo não só haja uma maior afirmação no mercado de tal tecnologia como também sejam executados trabalhos de avaliação crítica com rigor científico do funcionamento dos equipamentos para que sejam estabelecidas uma base sólida de conhecimento e a confiabilidade necessárias para um uso difundido. Desse modo, garantir-se-á uma rede de monitoramento capaz de prover, efetivamente, os órgãos responsáveis pela proteção do patrimônio natural de ferramentas eficientes na detecção de substâncias tóxicas que colocam em perigo a presença de vida aquática em determinados corpos hídricos.

8.1. Necessidades

Devido ao fato de os equipamentos atualmente disponíveis no mercado serem importados, há a necessidade de se estabelecer contratos de manutenção para a assistência técnica especializada já que, como todos os equipamentos computadorizados, estão sujeitos a falhas e ajustes que demandam um grande conhecimento acerca do seu funcionamento, o que nem sempre é conseguido facilmente do fabricante; mas, o mais importante é criar um canal local direto para a obtenção de peças de reposição e serviços, agilizando e facilitando o processo de suporte.

Outro aspecto importante é o estabelecimento de uma política de tomada de decisões baseadas nos resultados produzidos pelos biomonitores. Devido ao fato de que os tomadores de decisão ainda não têm a confiança necessária na capacidade de predição de impactos dos testes biológicos, é preciso mostrar, com eficiência, a capacidade que os biomonitores têm de indicar a presença de substâncias químicas no meio

hídrico. Com isso, evita-se o embate nos momentos críticos acerca da veracidade dos efeitos demonstrados.

Um detalhe que deve ser considerado é o estabelecimento da sensibilidade e operação do biomonitor adequada ao corpo receptor em avaliação. Sensibilidade elevada para corpos receptores poluídos significa a constante deflagração de alarmes ou operação inadequada. Além disso, é preciso considerar se a espécie escolhida suporta em algum nível a carga tóxica já existente no local para que se possam obter resultados relevantes e utilizáveis.

8.2. Questões a serem respondidas sobre o bbe *Daphnia toximeter*

Por ser uma metodologia de análise nova, uma série de questões precisam ser respondidas para que haja aceitação e confiabilidade dos resultados através dela obtidos. Apesar do funcionamento do bbe *Daphnia toximeter* mostrar sensibilidade adequada, algumas dúvidas são levantadas quanto a aspectos biológicos que podem ter influência nos resultados e, portanto, na deflagração de alarmes, quais sejam:

- Por estarem sob iluminação contínua os organismos ficam em atividade durante todo o período de exposição. Existe influência significativa deste aspecto na sensibilidade dos organismos ao longo do período de exposição?
- Nos testes de toxicidade tradicionais foi padronizada uma idade para a execução de ensaios. Os diversos autores que avaliaram a idade adequada para a exposição nos toxímetros recomendam o uso de organismos com cerca de 48h de idade. Ao longo da exposição à amostra, a sensibilidade no sétimo dia é similar àquela do primeiro dia de exposição?

- Há a recomendação por parte do fabricante de que os organismos sejam expostos ao meio a ser analisado antes de serem colocados nas câmaras de exposição. E que, em laboratório, deve-se aguardar pelo menos 24 horas antes da exposição ao agente tóxico. No caso de testes *in situ*, tal procedimento não deveria também ser realizado através do uso de uma segunda câmara de exposição que permanecesse em avaliação mas fora de foco até que estivesse estabelecido o padrão normal de natação para a água naquelas condições naturais?

Por fim, é preciso dizer que há mais de 30 anos já se falava de problemas e soluções relacionados com o monitoramento da qualidade da água. Muitos problemas foram solucionados, mas a complexidade dos impactos da produção humana na natureza têm sido cada vez maiores. Entretanto, como disse Jay Forrester em 1971, a quantidade de conhecimento acumulado é suficiente para um adequado gerenciamento e desenvolvimento ambiental e social. Só nos resta voltar nossos olhos para ele e colocar em prática aquilo que foi estudado.

9. REFERÊNCIAS

- Albert LA & Garcia AM. Contaminación y ecosistemas. In: Albert LA (Ed.). **Curso Básico de Toxicología Ambiental**. México, DF: ECO; 1985. p. 7-15.
- Baer KN, Ziegenfuss MC, Banks D & Ling Z. Suitability of high-hardness COMBO Medium for ecotoxicity testing using algae, daphnids and fish. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 1999; 63: 289-296.
- Baganz D, Staaks G, Spieser OH & Steinberg EW. How to use fish behavior analysis to sensitively assess the hazard potentials of environmental chemicals. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change Vol. 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 113-122.
- Bbe Moldaenke. **Manual for the bbe Daphnia Toximeter. Version 1.50.8.E2.**[CD ROM] Kiel-Kronshagen: bbe Moldaenke; 2001. 118p.
- BEO (Projektträger Biologie, Energie, Ökologie des Bundesministeriums für Forschung und Technologie). **Biomonitore zur kontinuierlichen Überwachung von Wasser und Abwasser**. Berlin: BMFT, 1993. 48p
- Blübaum-Gronau E, Hoffmann M, Spieser OH & Scholz W. Continuous water monitoring – Changes of behavior patterns as indicators of pollutants. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change Vol. 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 123-141.
- Buikema AL, Niederlehner BR & Cairns Jr. J. Biological Monitoring Part IV – Toxicity Testing. **Water Res.** 1982; 16: 239-262.

Butterworth FM, Gunatilaka A & Diehl P. The Rhine/Danube Monitoring Paradigm: applications in sensor technologies. **Proceedings of the International Symposium 'Automation in water quality monitoring – AutoMoNet 2002'**, Viena, Austria, May 2002, p. 299-235. Acesso via arquivo eletrônico [http://www.verbundplan.at/upload/2/download/pub_rhine_danube_paradigm.pdf], acessado em 10/02/2004.

Cairns Jr. J. Critical species, including man, within the biosphere. **Naturwissenschaften**. 1975; 62: 193-199.

Cairns Jr. J. Biological Monitoring Part VI – Future needs. **Water Res.** 1981; 15: 941-952.

Cairns Jr. J. The myth of the most sensitive species – Multispecies testing can provide valuable evidence for protecting the environment. **Bioscience**. 1986; 36 (10): 670-672.

Cairns Jr. J & van der Schalie WH. Biological monitoring Part I: Early warning systems. Review Paper. **Water Res.** 1980; 14: 1179-1196.

Cairns Jr. J, Dickson KL & Westlake GF. Continuous biological monitoring to establish parameters for water pollution control. **Prog. Water Technol.** 1975; 7(5/6): 829-841.

Cairns Jr. J, Dickson KL, Sparks RE & Waller WT. A preliminary report on rapid biological information systems for water pollution control. **JWPCF**. 1970; 42 (5): 685-703.

Cairns Jr. J, Lanza GR, Sparks RE & Waller WT. Developing biological information systems for water quality management. **Water Res. Bull.** 1973; 9: 81-99.

Carvalho MC. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios no Estado de São Paulo**. São Paulo; 2003. [Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo – 2002. [CD ROM]. CETESB. São Paulo 2003. 273p.

CONAMA. Resolução nº 20 de 18.06.86. Estabelece a classificação das águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de julho de 1986. p. 11356.

Cooney JD. Freshwater tests. In: Rand GM (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2nd ed. Washington, DC: Taylor & Francis; 1995. p. 71-102.

Cowell DC, Abass AK, Dowan AA, Hart JP, Pemberton RM & Young SJ. Screen-printed disposable biosensors for environmental pollution monitoring. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change Vol 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 157-174.

Gerhardt A. Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. **Environ. Sci. Poll. Cont.** 1995; 2 (1): 15-23.

Gerhardt A. Behavioural Early Warning Responses to Polluted Water – Performance of *Gammarus pulex* L. (Crustacea) and *Hydropsyche angustipennis* (Curtis) (Insecta) to a complex industrial effluent. **Environ. Sci. & Pollut. Res.** 1996; 3 (2): 63-70.

- Gerhardt A. Biomonitoring for the 21st Century. In: **Biomonitoring of polluted water – reviews on actual topics**. Gerhardt A (Ed.). Switzerland: Transtech Publications Ltda.; 1999a. p. 1-10.
- Gerhardt A. Recent trends in online biomonitoring for water quality control. In: **Biomonitoring of polluted water – reviews on actual topics**. Gerhardt A (Ed.). Switzerland: Transtech Publications Ltda.; 1999b. p. 95-118.
- Gerhardt A. *A new multispecies freshwater biomonitor for ecologically relevant supervision of surface waters* In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change Vol 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 301-316.
- Gerhardt A, Svensson E, Clostermann M & Fridlund B. Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique. **Environ Int.** 1994; 20 (2): 209-219.
- Gruber D, Cairns Jr. J, Dickson EL & Hendricks AC. A cinematographic investigation into the fish's bioelectric breathing signal. **J Fish Biol.** 1979; 14:429-436.
- Gruber D & Rasnake WJ. Automated Biological Monitors as Bio-Markers. [Apresentado no 9th International Symposium of Toxicity Assessment; 1999 oct. 1st; Pretoria, South Africa]
- Gunatilaka A & Diehl P. A brief review of chemical and biological continuous monitoring of rivers in Europe and Asia. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change Vol 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 9-28.

Gunatilaka A, Diehl P & Puzicha H. The evaluation of "Dynamic Daphnia Test" after a decade of use: Benefits and Constraints. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change Vol 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 29-58.

Hendricks AJ & Stouten MDA. Monitoring the response of microcontaminants by dynamic *Daphnia magna* and *Leuciscus idus* assays in the Rhine delta biological early warning as useful supplement. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 1993; 26: 265-279.

Jones BF, Warren CE, Bond CE & Doudoroff P. Avoidance reactions of salmonid fishes to pulp mill effluents. **Sew Ind Wastes**. 1956; 28:1403-1413.

Knie J. Der Dynamischer Daphnientest – ein automatischer Biomonitor zur Überwachung von Gewässern und Abwässern. **Wasser und Boden**. 1978; 12, 310-312.

Kramer KJM, Foekema EM. The "Musselmonitor®" as biological early warning system: The first decade. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change Vol 2: a handbook**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 59-87.

Lechelt M; Blohm W; Kirschneit B; Pfeiffer M; Gresens E; Liley J e col. Monitoring of surface water by ultra-sensitive Daphnia Toximeter. **Environ. Toxicol**. 2000; 15:390-400.

Little EE, Flerov BA & Ruzhinskaya NN. Behavioral approaches in aquatic toxicity investigations: A review. In: Mehrle Jr PM, Gray RH, Kendall L (eds.) **Toxic substances in the aquatic environment: an**

international aspect. Bethesda: American Fisheries Society, Water Quality Section; 1985. p. 72-98

Morgan WSG. Fishing for toxicity: biological automonitor for continuous water quality control. **Effluent and Water Treatment Journal.** September 1976. p. 471-475.

Morgan EL, Young RC, Crane CN & Armigate BJ. Developing automated multispecies biosensing for contaminant detection. **Wat. Sci. Tech.** 1987; 19 (11): 73-84.

Penders EJ & Stoks PG. Biological early warning systems in drinking water production. [Apresentado no 9th International Symposium of Toxicity Assessment; 1999 sept. 26th; Pretoria, South Africa]

Pitot III HC & Dragan YP. Chemical carcinogenesis. In: Kloassen CD, Amdur MO, Doull. CASARETT AND DOULL'S J (Eds.). **Toxicology – The basic science of poisons.** New York: McGraw Hill; 1996. p. 201-268.

Rand GM, Wells PG, McCarty LS. Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand, GM (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.** 2nd. ed. Washington: Taylor & Francis; 1995. p. 3-67.

São Paulo (Estado) RESOLUÇÃO SMA n. 65, DE 13.08.98: Cria o Índice de Qualidade de Água para fins de Abastecimento Público – IAP, altera a denominação do IPMCA, entre outras providências. **Diário Oficial do Estado de São Paulo,** São Paulo, 13 de ago. 1998. p. 27.

São Paulo (Estado) RESOLUÇÃO SMA n. 3, DE 22.02.00: Dispõe sobre o controle ecotoxicológico de efluentes industriais. **Diário Oficial do Estado de São Paulo,** São Paulo, 25 de fev. 2000. p. 24.

- Shirer HW, Cairns Jr J & Taller WT. A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. **Water Res. Bull.** 1968; 4 (3): 27-43. p. 27-43.
- Spieser OH, Schwaiger J, Ferling H & Negele R-D. An introduction to behavioral monitoring – effects of nonylphenol and ethinylestradiol on swimming behavior of juvenile carp. In: Butterworth FM; Gunatilaka A; Gonsebatt MA (Eds.). **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change Vol 2: a handbook.** New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000. p. 93-112.
- Tahedl H & Häder D-P. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 2001; 48: 161-169.
- Thomas M, Florion A & Chrétien D. A new biomonitor using a weakly electric fish, *Apteronotus albifrons* (Gymnotiformes), and the effect of temperature on the bioelectric responses. **Environ. Monitoring and Assessment.** 1998; 51: 605-620.
- Thomas M, Florion A, Chrétien D & Terver D. Real-time biomonitoring of water contamination by cyanide based on analysis of the continuous electric signal emitted by a tropical fish: *Apteronotus albifrons*. **Water Res.** 1996; 30 (12): 3083-3091.
- Waller WT & Cairns Jr J. The use of fish movement patterns to monitor zinc in water. **Water Res.** 1972; 6: 257-269.
- Zagatto P, Lorenzetti ML, Lamparelli MC, Salvador MEP, Menegon Jr N & Bertoletti E. Aperfeiçoamento de um índice de qualidade de águas. **Acta Limnologica Brasiliensia.** 1999; 11 (2): 111-126.