



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

CÍNTIA LEVITA LINS DO BONFIM

EFEITOS DO FENOL E 4-CLOROFENOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DE *ECHINOMETRA*
LUCUNTER (LINNAEUS, 1758):
AVALIAÇÃO DESSAS SUBSTÂNCIAS COMO REFERÊNCIA

Salvador
2005

CÍNTIA LEVITA LINS DO BONFIM

EFEITOS DO FENOL E 4-CLOROFENOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DE *ECHINOMETRA*
LUCUNTER (LINNAEUS, 1758):
AVALIAÇÃO DESSAS SUBSTÂNCIAS COMO REFERÊNCIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento, do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Biomonitoramento.

Orientadora: Dra. Solange Andrade Pereira

Co-orientadora: Dra. Iracema Andrade Nascimento

Salvador
2005

Biblioteca Central Reitor Macêdo Costa - UFBA

B713 Bonfim, Cíntia Levita Lins do.

Efeitos do Fenol e 4-Clorofenol sobre o desenvolvimento embrionário de *Echinometra Lucunter* (Linnaeus, 1758): Avaliação dessas substâncias como referência / Cíntia Levita Lins do Bonfim. - 2005.
69f. : il.

Orientadora : Prof^ª. Dr^ª. Solange Andrade Pereira.

Co-Orientadora : Prof^ª Dr^ª. Iracema Andrade Nascimento.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, 2005.

1. Toxicidade - Testes. 2. Ouriço-do-mar. 3. *Echinometra Lucunter*. 4. Monitoramento biológico. I. Pereira, Solange Andrade. II. Nascimento, Iracema Andrade. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDU - 504
CDD - 577

“Uma jornada de mil milhas
começa com um simples passo”

Lao-Tsu, 600 d.c.
Filósofo Taoísta

AGRADECIMENTOS

Dessa vez, são muitos.

Em primeiríssimo lugar, a Deus, pois sem ele nada disso que acontece sobre o planeta seria possível (apesar dos meus amigos evolucionistas tentarem me convencer do contrário!);

À FAPESB, pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Biomonitoramento da UFBA, especialmente na pessoa do ex-Coordenador, Prof. Dr. Pedro Luís Bernardo da Rocha, pelo apoio e compreensão que sempre dispensou a todos os alunos;

À toda equipe do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento em especial às minhas orientadoras Dra Solange e Dra Iracema por terem topado o desafio de me orientar nos 45 minutos do 2º tempo;

Às Doutoradas Valéria Aparecida Prósperi da CETESB e Sonia Lopes Rezende de Melo do LABTOX por disporem de seu valioso tempo na análise deste trabalho e pelas profundas contribuições que deram ao formato final da dissertação;

À secretária do Colegiado da Pós Graduação, Jussara, pelas palavras de incentivo e pelos inestimáveis préstimos na hora da burocracia;

À toda a minha família por ter suportado minhas crises de ansiedade e me apoiar incondicionalmente em absolutamente todos os meus sonhos. Nesse caso, minha mãe Roseli merece um capítulo à parte, além de exemplo de vida e perseverança, com ela aprendi na prática que nada nessa vida é impossível, e que não importa quão obscuras estejam as previsões, há sempre tempo bom pela frente.

Aos grandes e inesquecíveis amigos que esse mestrado me deu: Alessandra, Gilson, Giancarlo, Agustín, Samanta e Goia, que compartilharam das dificuldades, conquistas, e vibraram com cada avanço deste trabalho, vocês me deram força pra não desistir;

À Yonara, minha amiga de uma vida inteira de bióloga, que está tão distante de mim e que faz muita falta. Você sim me viu crescer como profissional, e esses agradecimentos vão além deste trabalho;

A uma grande e muito especial pessoa que tive o prazer e a sorte de conhecer nesta vida, Luiz Fernando. Agradeço por toda a paciência e carinho dispensados; seu apoio durante todo o decorrer deste curso foi essencial pra mim;

Ao meu marido Celso, por ter me incentivado desde o início a continuar na dura vida acadêmica, provendo o suporte emocional e logístico que tanto precisei. Sua companhia, experiência e atitude foram fundamentais pra formação da pessoa que sou hoje;

E por fim, não poderia faltar quem sempre, todos os dias, todos os momentos, nas madrugadas em claro, nas manhãs de mau-humor, nos finais de semana sem nem ver a cor do dia, esteve sempre ao meu lado literalmente, sabendo esperar o momento certo de ter qualquer atenção e me fazendo às vezes duvidar sobre os verdadeiros mecanismos que Ele utiliza para nos compensar a falta do que achamos ser essencial. Anita, a você eu dedico esta conquista.

RESUMO

Inúmeras substâncias químicas que compõem os produtos manufaturados e estão presentes nos efluentes de origem industrial, são corriqueiramente dispostas no meio ambiente através do carreamento para corpos d'água naturais. Os testes de toxicidade aquática são empregados com o intuito de avaliar o efeito destes agentes químicos nos organismos, fornecendo assim uma abordagem ecológica complementar às análises químicas normalmente empregadas. Para serem validados os testes ecotoxicológicos precisam ser realizados seguindo protocolos específicos e fazerem uso de substâncias de referência, que são químicas de efeito conhecido sobre os organismos de maneira a atestarem a confiabilidade dos resultados obtidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização das substâncias orgânicas Fenol e 4-Clorofenol, como alternativas para referência em testes ecotoxicológicos com embriões do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. Para isto, quinze testes crônicos de curta duração foram conduzidos para cada substância investigada, mais o Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), que foi utilizado como controle positivo. Os valores de CE_{50-36h} encontrados variaram de 125,88 a 143,84 mg/L para o Fenol e de 16,90 a 26,31 mg/L para o 4-Clorofenol. A concentração de efeito alternativo foi determinada com base na DMS crítica. O nível equivalente à concentração estimada de efeito crônico foi CE_{10} . A partir de tal concentração é possível observar efeitos deletérios significativos na população do organismo-teste. O valor médio de CE_{10-36h} encontrado para o Fenol foi de 36,63 mg/L e para o 4-Clorofenol foi de 4,58 mg/L. Os coeficientes de variação dos resultados obtidos indicaram que os valores encontrados para o Fenol no nível de efeito de 50% apresentam maior precisão analítica (4,04%), enquanto que no nível de efeito alternativo, o 4-Clorofenol apresentou maior precisão dentre as substâncias utilizadas (27,98%). A plotagem em carta-controle, dos resultados obtidos com os testes utilizando o DSS, que foram realizados em paralelo à outras substâncias, atestaram a saúde dos organismos utilizados e a obtenção de resultados confiáveis nos experimentos conduzidos. Embriões de *E. lucunter* são mais sensíveis ao 4-Clorofenol do que ao Fenol, uma vez que sob as mesmas concentrações, o valor de CE_{50-36h} obtido para o Fenol foi mais alto que o obtido para o 4-Clorofenol. Aliadas às características peculiares a cada substância, o 4-Clorofenol apresentou-se como mais indicado para a utilização como referência em testes ecotoxicológicos com embriões de *E. lucunter*.

Palavras-chave: ouriço-do-mar, toxicidade, Fenol, 4-Clorofenol, DSS, *Echinometra lucunter*.

ABSTRACT

Innumerable chemical substances that compose the manufactured products and are found in the industrial effluents of industrial complex are currently disposed in the environment. The aquatic toxicity tests are used to evaluate the effect of these chemical agents on the organisms, thus complementing the ecological survey based on chemicals analysis which are normally used for this purpose. To be validated the ecotoxicological tests need to be carried out following specific protocols and using a reference substance, that is a chemical of known effect on the organisms, to certify the trustworthiness of the results. The aim of this work was to evaluate the use of organic substances Phenol and 4-Chlorophenol, as an alternative for reference in ecotoxicological tests with embryos of the sea-urchin *Echinometra lucunter*. For this, fifteen chronic tests of short duration had been carried out for the two investigated substance, besides Dodecil Sodium Sulphate (SDS), that was used as positive control. The CE_{50-36h} values ranged from 125,88 to 143,84 mg/L for Phenol and from 26.31 to 16,90 mg/L for 4-Chlorophenol. The alternative level of effect was determined based on the critical DMS values. The equivalent level to estimated concentration of cronic effects was CE₁₀. From such concentration it would be possible to observe significant deleterious effect in the population of the test organism. The average value of CE_{10-36h} found for Phenol was of 36,63 mg/L and for 4-Chlorophenol was of 4,58 mg/L. The variation coefficients of the results indicated that the values found for Phenol in the level of 50% effect have greater analytical precision (4,04%), while that in the level of alternative effect, 4-Chlorophenol presented greater precision among the used substances (27,98%). The control chart to the results gotten with the DSS tests that had been carried out in parallel to other substances, certified the health of the used organisms and the attainment of trustworthy results in the led experiments. Embryos of *E. lucunter* presented more sensitivity to 4-Chlorophenol than to Phenol, therefore under the same concentrations, the value of CE_{50-36h} obtained for Phenol was higher than the one for 4-Chlorophenol. Allied the peculiar characteristics to each substance, 4-Chlorophenol was presented as more indicated for the use as reference in ecotoxicological tests with embryos of *E. lucunter*.

Key-words: sea-urchin, toxicity, Phenol, 4-Chlorophenol, DSS, *Echinometra lucunter*..

SUMÁRIO

RESUMO	li
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Ecotoxicologia.....	3
1.2. O ouriço do mar como organismo teste.....	7
2. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Geral.....	13
3.2. Específicos.....	13
4. METODOLOGIA.....	15
4.1. Água de diluição.....	15
4.2. Vidraria.....	16
4.3. Substâncias utilizadas.....	16
4.3.1. Dodecil Sulfato de Sódio - DSS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$).....	16
4.3.2. Fenol (C_6H_5OH).....	18
4.3.3. 4-Clorofenol (4-Cl C_6H_4OH).....	18
4.4. Determinação das concentrações-teste e preparo das soluções-estoque.....	19
4.4.1. Substância de referência - Dodecil Sulfato de Sódio - Controle Positivo.....	19
4.4.2. Fenol e 4-Clorofenol.....	20
4.5. Organismo-teste.....	22
4.5.1. Coleta.....	23
4.5.2. Tratamento em laboratório.....	24
4.5.3. Obtenção de gametas.....	24
4.5.4. Fecundação.....	25
4.6. Montagem do teste.....	26
4.6.1. Desenho Experimental.....	26
4.6.2. Determinação de parâmetros físico-químicos.....	27
4.6.3. Acondicionamento dos recipientes-teste.....	27
4.7. Encerramento do teste.....	27

4.8. Leitura e Aceitabilidade do teste.....	28
4.9. Expressão de resultados.....	29
4.10. Análise Estatística.....	29
4.10.1. Cálculo do CE ₅₀ -36h.....	29
4.10.2. DMS e DMS crítica.....	30
4.10.3. Concentração alternativa.....	30
4.10.4. Coeficiente de Variação.....	31
4.11. Estabelecimento de Cartas Controle de Sensibilidade.....	31
4.12. Resumo das Condições físico-químicas dos testes.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Variação de Parâmetros Físico-Químicos.....	33
5.2. Estabelecimento do Nível de Efeito Alternativo.....	33
5.3. Concentração Efetiva (CE ₅₀) e Concentração Alternativa (CE ₁₀) de efeito.....	34
5.3.1. DSS.....	34
5.3.2. Fenol.....	36
5.3.3. 4-Clorofenol.....	37
5.4. Precisão analítica dos resultados.....	39
5.5. Cartas-Control de Sensibilidade.....	40
6. DISCUSSÃO.....	44
6.1. Análise Comparativa da toxicidade das substâncias investigadas.....	44
6.1.1. Concentração efetiva - CE ₅₀	45
6.1.1.1. Fenol.....	45
6.1.1.2. DSS.....	48
6.1.1.3. 4-Clorofenol.....	49
6.2. Cartas Controle de sensibilidade.....	53
6.3. Nível de efeito alternativo em testes crônicos.....	54
6.4. Comparação do desempenho das substâncias de referência utilizadas nos testes de toxicidade com <i>Echinometra lucunter</i>	56
6.5. Constante de proporcionalidade.....	57
7. CONCLUSÕES.....	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Praia do Porto da Barra, Salvador-BA.....	23
Figura 02 - Área de localização dos ouriços.....	23
Figura 03 - Lavagem dos organismos com água do mar.....	24
Figura 04 - Disposição dos organismos em bandeja.....	24
Figura 05 - Coleta dos gametas	25
Figura 06 - Óvulos em condições satisfatórias para fecundação. Aumento: 100X....	25
Figura 07 - Distribuição das substâncias orgânicas Fenol e 4-Clorofenol nos recipientes-teste.....	26
Figura 08 - Disposição dos recipientes-testes em triplicata.....	26
Figura 09 - Larva pluteus de <i>Echinometra lucunter</i> normal (36h).....	28
Aumento: 200X.....	28
Figura 10 - Larvas de <i>Echinometra lucunter</i> com desenvolvimento	28
retardado (36h).....	28
Aumento: 200X.....	28
Figura 11 - Valores de CE ₅₀ -36h e CE ₁₀ -36h encontrados em testes ecotoxicológicos com embriões de <i>Echinometra lucunter</i> usando a substância DSS.	35
Figura 12 - Valores de CE ₅₀ -36h e CE ₁₀ -36h encontrados em testes ecotoxicológicos com embriões de <i>Echinometra lucunter</i> usando a substância Fenol.....	37
Figura 13 - Valores de CE ₅₀ -36h e CE ₁₀ -36h encontrados em testes ecotoxicológicos com embriões de <i>Echinometra lucunter</i> usando a substância 4-Clorofenol.	38
Figura 14 - Coeficientes de variação entre os testes toxicológicos realizados com embriões de <i>Echinometra lucunter</i> sob a ação de 3 diferentes substâncias de referência.	39
Figura 15 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i> com base nos valores de CE ₅₀ -36h utilizando a substância de referência DSS.....	40

Figura 16 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i> com base nos valores de CE ₁₀ -36h utilizando a substância de referência DSS.	41
Figura 17 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i> com base nos valores de CE ₅₀ -36h utilizando a substância de referência Fenol.	41
Figura 18 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i> com base nos valores de CE ₁₀ -36h utilizando a substância de referência Fenol.	42
Figura 19 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i> com base nos valores de CE ₅₀ -36h utilizando a substância de referência 4-Clorofenol.	42
Figura 20 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i> com base nos valores de CE ₁₀ -36h utilizando a substância de referência 4-Clorofenol.	43
Figura 21 - Comparação dos Valores de CE ₅₀ -36h e CE ₁₀ -36h encontrados em testes com embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i>	45
Figura 22 - Embrião de <i>Echinometra lucunter</i> submetido à ação de 25 ppm de 4-Clorofenol. Aumento 200X	52
Figura 23 - Embrião de <i>Echinometra lucunter</i> submetido à ação de 40 ppm de 4-Clorofenol. Aumento 200X	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Cálculo das Concentrações Teste para a substância Fenol.....	21
Tabela 02. Cálculo das Concentrações Teste para a substância 4-Clorofenol	21
Tabela 03 - Amplitude de Valores de pH e temperatura aferidos durante testes de toxicidade com as substâncias utilizadas.....	33
Tabela 04 - Estatística Descritiva para o DSS (Dodecil Sulfato de Sódio) (n=15)	35
Tabela 05 - Estatística Descritiva para o Fenol (n=15).....	36
Tabela 06 - Estatística Descritiva para o 4-Clorofenol (n=15).....	38
Tabela 06 - Coeficientes de Variação encontrados nos testes toxicológicos com embriões de <i>E. lucunter</i>	54
Tabela 07 - Relação entre a concentração do Analito e a Precisão analítica de resultados (AOAC, 1993)	55
Tabela 08 - Desempenho de substâncias de referência utilizadas em testes de toxicidade	56
Tabela 09 - Constantes de proporcionalidade para diversos organismos aquáticos calculadas com base no 75° percentil	58

1. INTRODUÇÃO

A explosão demográfica deixou de ser um problema local dos grandes centros urbanos para ser uma questão considerada globalmente no final do século XX. Além dos problemas corriqueiramente citados, tais como a crise no planejamento urbano, favelização, aumento da violência, etc, existe uma outra vertente de problemas advindos do aumento populacional no globo terrestre.

À medida que o homem moderno evolui e se agrega em cidades, aumenta sua necessidade por bens de consumo manufaturados, ou seja, dependentes da industrialização, e esta tem crescido exponencialmente para atender a esta demanda, trazendo consigo os problemas ambientais inerentes aos processos industriais.

Os efluentes industriais sejam eles sólidos, líquidos ou gasosos, quando não tratados devidamente, contaminam o solo, aquíferos subterrâneos e atmosfera, podendo ocasionar um comprometimento da qualidade ambiental quase que de forma total, considerando as cadeias tróficas e as propriedades físico-químicas que governam a vida no ambiente.

Toda e qualquer medida de controle tanto na geração quanto no gerenciamento e disposição final destes efluentes, é extremamente essencial, e atua como ferramenta principal na gestão do meio ambiente.

Os efluentes líquidos, por sofrerem disposição, na maioria das vezes, em corpos d'água naturais, seja em córregos para diluição ou no mar através dos emissários submarinos, devem ser cuidadosamente estudados quanto à sua composição e principalmente, quanto a seus efeitos no ambiente em que serão inseridos, uma vez que podem provocar danos aos organismos existentes, alterando assim a composição do meio ambiente local. A depender das substâncias que contenham, podem persistir no ambiente e terem seus efeitos transferidos ao longo da cadeia trófica (CRUZ, 2003; CETESB, 1990a; JONCZYK e outros, 2001; MASTROTI e outros, 2001).

Os métodos de avaliação dos efluentes líquidos industriais mais comuns envolvem a adoção de protocolos de análises químicas dos componentes dos mesmos, a fim de determinar sua concentração, para estabelecimento da forma de disposição final mais adequada. Tais análises também são utilizadas para valoração do comprometimento ambiental de áreas impactadas pela contaminação por efluentes ou outras atividades de origem antrópica. Porém, por si só, as análises químicas não refletem a real contaminação de um ecossistema, tampouco o poder de contaminação de um determinado efluente, pois elas são incapazes de nos dar informações acerca do efeito dos poluentes nos organismos que fazem parte do ecossistema (CRUZ, 2003; LOEZ e outros, 1995). Além disso, a quantidade de compostos químicos que são potencialmente poluidores e seus possíveis efeitos nos parâmetros físico-químicos de um ecossistema torna praticamente impossível o monitoramento ambiental baseado somente em análises químicas. Mesmo que existisse o conhecimento acerca de um determinado tipo de contaminante presente

em um ecossistema, a química analítica somente poderia inferir sobre o grau e a natureza da poluição e não sobre as conseqüências biológicas (BEIRAS e outros, 2001).

O risco que uma determinada substância pode causar a um ecossistema é uma avaliação que passa pelo julgamento científico que deve sempre ser baseado em dados empíricos obtidos com a probabilidade de danos que as concentrações ambientais de um agente químico, sejam conhecidas ou estimadas, podem causar aos organismos que compõem esse ecossistema. No processo de avaliação, o julgamento científico deve considerar dentre outras coisas, as características físico-químicas obtidas com as análises químicas corriqueiras e a toxicidade das substâncias envolvidas (PAIXÃO, 2002). Aliadas, as duas ferramentas têm poder suficiente para inferir seguramente sobre a qualidade ambiental que se está investigando.

1.1.A Ecotoxicologia

A Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos dos contaminantes nos organismos e os processos pelos quais atuam, através da utilização de testes de toxicidade. Para fazer isto, utiliza os conceitos da Toxicologia, uma ciência que apesar de reducionista apresenta grande capacidade preditiva e os agrega aos da Ecologia, ciência holística, mas com baixa capacidade de fornecer diagnósticos. Como ferramenta, é capaz de fornecer uma previsão do grau de comprometimento de um determinado ambiente exposto à poluição, uma vez que se analisa os efeitos ecológicos que esta provoca nos organismos que compõem o ecossistema.

Dentro da Ecotoxicologia, o ramo da toxicologia aquática investiga os efeitos de variantes ambientais, substâncias químicas e outros materiais (sejam eles de origem

antrópica ou natural) em organismos aquáticos. Os estudos envolvendo testes de toxicidade aquática iniciaram-se nas décadas de 40 e 50, com a investigação de testes de qualidade de água utilizando cladóceros e a partir daí inúmeros estudos foram sendo conduzidos, ampliando o rol de organismos utilizados e observando-se os efeitos de diversos tipos de contaminantes no ecossistema (SOUSA, 2002).

Os testes de toxicidade constituem outra ferramenta utilizada no controle da qualidade ambiental. São experimentos que utilizam organismos submetidos à diferentes concentrações de substâncias químicas, amostras ambientais (efluentes e sedimentos, por exemplo) ou variáveis ambientais, a fim de identificar o efeito destes no desenvolvimento dos organismos representativos do ecossistema e a partir daí inferir sobre o mesmo. Segundo a CETESB (1990a) quando utilizados a fim de subsidiar ações de controle da poluição, se utilizam preferencialmente reações biológicas consideradas adequadas para estimar os efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre uma determinada comunidade de seres vivos.

Os testes de toxicidade desempenham um papel crucial no estudo do impacto causado pelas substâncias químicas no ambiente natural. Ghirardini e outros (2001) determinaram que existem duas abordagens para os testes de toxicidade: a preditiva e o monitoramento. A preditiva seria no caso de serem utilizados para prever o impacto ecológico de agentes químicos potencialmente tóxicos antes da sua disposição no meio ambiente, e a abordagem do monitoramento, se aplicaria à investigação da extensão da perturbação de um ecossistema causada por poluentes.

Atualmente as principais agências de controle ambiental do mundo (USEPA; ENVIRONMENT CANADA, etc) não só adotam os ensaios toxicológicos no monitoramento da qualidade ambiental, como utilizam os mesmos como ferramenta de gestão do potencial impactante de atividades antrópicas que gerem efluentes líquidos. Tais agências criaram protocolos de realização dos principais testes de

toxicidade, que são adotados pela maioria dos laboratórios que conduzem experimentos toxicológicos no mundo. Isso levou a uma padronização de metodologias utilizadas pela comunidade científica e contribuiu para o amadurecimento da ciência como um todo.

Os protocolos referem-se tanto à metodologia, quanto à utilização de organismos-chave na condução dos experimentos e, nesse ponto, permanecem limitados, uma vez que existem diversos fatores que influenciam a escolha de um organismo para ser utilizado em testes de toxicidade. Organismos de três níveis tróficos do ambiente aquático são utilizados como teste: produtores primários, (algas em geral), consumidores primários (microcrustáceos e equinodermas) e consumidores secundários (peixes); embora não de forma concomitante. O ideal seria utilizar pelo menos um organismo de cada nível no mesmo teste, a fim de se obter um panorama mais claro sobre o efeito do contaminante ou da amostra ao longo da cadeia existente no ecossistema.

A não utilização de espécies autóctones da região sob impacto pode levar a uma considerável perda de informação sobre a ecologia local ou até mesmo ao subdimensionamento do efeito do contaminante estudado sobre o ecossistema em geral (PINTO, 2001).

No Brasil, os estudos de ecotoxicologia marinha têm avançado nas últimas duas décadas, o que possibilitou a determinação de protocolos com espécies locais (CETESB, 1992; LABIOMAR, 2005a). Tal prática é bastante louvável e deve incentivar outros estudos com diversas espécies, buscando-se a condição ideal de que se saiba cada vez mais sobre as espécies que compõem os ecossistemas aquáticos.

Além do campo da normatização, a Legislação ambiental brasileira também deu um salto ao contemplar as análises ecotoxicológicas como ferramentas de controle

da poluição, tal como a Resolução CONAMA 344/04 (CONAMA, 2004) que determina diretrizes gerais e procedimentos mínimos de avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras. O Grupo de Trabalho que reformulou tal instrumento considerou ser de importância fundamental para o processo de avaliação do material dragado, a caracterização química, física e ecotoxicológica do sedimento (LIMA e outros, 2004) e segundo Bertolotti (2004) a finalidade clássica dos ensaios ecotoxicológicos na referida Resolução passa pelo fato de ser uma ferramenta imprescindível na tomada de decisões.

Mais recentemente outro instrumento legal considerou as análises ecotoxicológicas. Trata-se da Resolução CONAMA 357/05 (CONAMA, 2005) que revisou os padrões de lançamento de efluentes inserindo as análises ecotoxicológicas como obrigatórias, por exemplo, nos casos de investigação da interação de substâncias e contaminantes.

Apesar de todas as vantagens, as estimativas de toxicidade obtidas a partir de testes laboratoriais vêm sendo debatidas quando se trata de tomada de decisões ambientais. Questiona-se a extrapolação dos dados para o ambiente natural, uma vez que em laboratório os organismos são expostos a condições controladas, que podem não representar precisamente o ambiente real do ecossistema estudado (SANTOS e outros, 2002), porém, o principal argumento usado nestes embates é que a avaliação de risco de contaminação ambiental requer técnicas rápidas e sensíveis para que se possa tomar decisões que evitem a exposição e os efeitos de contaminantes ambientais aos organismos e, nesse contexto, os testes de toxicidade crônica de curta duração são extremamente eficazes (PAIXÃO, 2002).

Por outro lado a análise química das substâncias que constituem os contaminantes ou da água dos ecossistemas, somente é capaz de determinar o grau e a natureza da contaminação, não podendo inferir sobre os efeitos biológicos. Os

testes de toxicidade por sua vez fornecem os dados a respeito dos efeitos ecológicos no ambiente, mas como são conduzidos em laboratório, levantando a questão da reprodutibilidade dos dados no ambiente, não devem ser utilizados isoladamente, sendo necessário, portanto a junção com estudos sobre a comunidade do ecossistema local (LONG e CHAPMAN, 1985).

Desta forma, o consenso atual é que se utilize a tríade: análises químicas, testes de toxicidade e detecção de alterações biológicas em populações, na avaliação da qualidade ambiental. Cada uma destas técnicas possui um poder de alcance e juntas atuam de forma sinérgica realçando o poder da outra, sendo possível a avaliação global dos efeitos causados pelos poluentes (CRUZ, 2001).

Na impossibilidade de se utilizar as três técnicas associadas, a Environment Canada (1999) aconselha o uso prioritário dos testes de toxicidade, por apresentarem as seguintes vantagens sobre as outras técnicas: medem a toxicidade mesmo quando o agente tóxico é desconhecido, tem caráter preditivo, são menos custosos, apresentam respostas em curto espaço de tempo, e espécies utilizadas são de fácil manutenção.

1.2. O Ouriço do mar como organismo teste

O ouriço do mar é um dos organismos utilizados com mais frequência devido às inúmeras vantagens que apresenta, tais como: tem ampla distribuição geográfica, é abundante, de fácil coleta e manuseio, pode ser mantido em laboratório e, principalmente, devido à facilidade de obtenção de gametas. A fecundação *in vitro* dos ouriços do mar também é um procedimento relativamente simples e o seu

desenvolvimento embrionário é bastante rápido, podendo-se obter larvas viáveis em laboratório em um curto período de tempo. Por essas razões os ouriços do mar são utilizados em testes ecotoxicológicos tanto de amostras ambientais (BEIRAS et al, 2001; NASCIMENTO, 2000; KOBAYASHI, 1980), quanto de contaminantes específicos (KOBAYASHI, 1992; MASTROTI, 2001; GHIRARDINI, 2000; BRIGHT e outros, 1995).

Órgãos de controle internacional desenvolveram protocolos de execução de testes de toxicidade utilizando gametas e embriões de ouriço (ENVIRONMENT CANADA, 1990, 1995, 1999; USEPA, 1991; ASTM, 1998), porém a maioria deles utiliza espécies que, no Brasil, são alóctones e não devem, dessa forma serem conduzidos no país. Buscando a adaptação das espécies locais à utilização em testes de toxicidade, a CETESB (1990b e 1992) foi pioneira no desenvolvimento de um protocolo com uma espécie encontrada no Brasil, a *Lytechinus variegatus* (PRÓSPERI, 2002). O órgão oficial de normatização do Governo Brasileiro, ABNT¹, possui um projeto de Norma Técnica com o mesmo organismo-teste, visando a padronização oficial do procedimento de desenvolvimento dos testes de toxicidade com esta espécie (ABNT, 2002).

Existem diversas aplicações para os testes de toxicidade utilizando o ouriço do mar como organismo-teste. Dentre elas, Mastroti (2002) destaca a avaliação da toxicidade de substâncias químicas, compostos químicos, efluentes ou despejos, avaliação da qualidade de amostras de águas marinhas (coluna d'água ou água intersticial), identificação da toxicidade em amostras compostas (cujo contaminante é desconhecido) e também para melhor compreender efeitos sinérgicos ou antagonísticos envolvendo contaminação ambiental.

¹ Associação Brasileira de Normas Técnicas

As fases embrionárias e larvais de ouriços do mar têm sido bastante utilizados em testes de toxicidade para avaliar a qualidade do ambiente marinho (MASTROTI, 2002). Segundo Cruz (2001) é preferível utilizar embriões em testes de toxicidade, pois trata-se da fase mais sensível do ciclo de vida dos organismos. Além disso, a maioria dos organismos aquáticos possui fecundação externa o que seria seriamente comprometido no caso de uma contaminação, uma vez que os gametas, dispersos no meio aquático, sofreriam a ação direta dos poluentes. Zamboni (1993) observou que embriões do ouriço *Lytechinus variegatus* são cerca de dez vezes mais sensíveis à amônia do que os gametas. Os testes embriolarvais recebem a sigla de ELSTs² e são considerados sub-crônicos, pois fornecem respostas sobre toda a fase embrionária do organismo (NASCIMENTO e outros, 2000; NASCIMENTO e outros, 2002; MCKIM, 1985).

A comunidade científica nacional tem realizado inúmeros trabalhos com diversas espécies de ouriço do mar, sendo a *Lytechinus variegatus* a mais utilizada tanto em experimentos com amostras ambientais (ZAMBONI, 1993; SOUSA e outros, 2004; CÉSAR e outros, 2004, ARRUDA e outros, 2004; ZARONI e outros, 2004) quanto com substâncias químicas (NIPPER e outros, 1993) como surfactantes aniônicos (MASTROTI, 1997), fluidos de perfuração de petróleo (SÁFADI, 2001; LUIZ e outros, 2004), água de produção de petróleo (BADARÓ-PEDROSO, 1999) e efluentes industriais e sanitários (PRÓSPERI, 1993; RACHID, 1996).

Outras espécies de ouriço que ocorrem no litoral brasileiro também são objeto de estudo, como o *Echinometra lucunter* (ARAÚJO e NASCIMENTO, 1999; OLIVEIRA e BADARÓ-PEDROSO, 2004), *Arbacia punctulata* (BADARÓ-PEDROSO, 1999),

² Do inglês “Early-life Stage Tests” e significa testes crônicos de curta duração.

Arbacia lixula (MÁXIMO e outros, 2004), sendo a sua frequência de utilização influenciada pela densidade da espécie em determinados locais.

2. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

As substâncias de referência são agentes químicos de grau analítico utilizados como controle positivo em testes ecotoxicológicos. Sua função está relacionada ao monitoramento da qualidade analítica dos testes, uma vez que, por terem atuação conhecida sobre o organismo-teste, padronizam o seu nível de sensibilidade, garantindo assim que os resultados obtidos sejam oriundos do efeito do poluente testado sobre o organismo utilizado (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

A variação nos resultados obtidos em testes ecotoxicológicos é comum e pode ser atribuída a diversos fatores, por exemplo: estresse nos organismos-teste devido à manipulação em laboratório, doenças inerentes à população testada, variação de parâmetros físico-químicos, condições climáticas que os organismos estavam submetidos quando da coleta. A padronização se faz imprescindível na condução de tais experimentos, a fim de eliminar ou, pelo menos, minimizar a influência de cada um destes fatores, e neste momento a utilização de uma substância de referência é um dos principais itens na adoção desta padronização.

Outro item que faz par com a substância de referência e também é imprescindível, é a utilização do controle negativo, que atua como monitor geral da qualidade do experimento. Este é capaz de detectar a maioria dos fatores acima, já

que consiste na reprodução da condição natural de desenvolvimento do organismo-teste sem a interferência do poluente.

Diversas substâncias, tanto de natureza orgânica quanto inorgânica, vem sendo propostas por diversos estudos como sendo de referência. O presente trabalho tratou da investigação sobre o uso das substâncias orgânicas Fenol e 4-Clorofenol como referência e utilizou como controle positivo, o Dodecil Sulfato de Sódio - DSS, químico largamente utilizado em testes ecotoxicológicos, para balizamento dos resultados obtidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver estudos com substâncias orgânicas que possam ser adotadas como referência em testes ecotoxicológicos com embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter*.

3.2. Específicos

- Avaliar a sensibilidade de embriões de *E. lucunter* às substâncias orgânicas Fenol e 4-Clorofenol, através do cálculo da CE₅₀-36h;
- Estabelecer uma concentração alternativa para a expressão de efeitos crônicos em testes ecotoxicológicos com *E lucunter*;
- Estabelecer cartas controle de sensibilidade de *E. lucunter* para as substâncias de referência utilizadas;

- Determinar possíveis substâncias que melhor se aplicariam à função de referência em testes ecotoxicológicos com *E. lucunter*.

4. METODOLOGIA

Os testes foram realizados no período de junho de 2004 a abril de 2005, no laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento do Instituto de Biologia da UFBA.

4.1. Água de diluição

A água do mar de boa qualidade foi coletada na praia de Ipitanga Salvador, considerada uma das praias com melhor condição de balneabilidade da região metropolitana de Salvador (BONFIM, 2003). Em laboratório, a água foi previamente filtrada em filtros Whatman® GF/C, com capacidade de retenção de partículas de 1,2 μm ; em seguida, foi esterilizada em autoclave (a 127°C e 1,5kg/cm² de pressão, por 20 minutos) visando a eliminação de possíveis bactérias, conforme protocolo operacional padrão do laboratório (LABIOMAR, 2005a). Após 48 horas foi utilizada para lavagem dos organismos teste, obtenção de gametas e montagem do teste. Apresentava as seguintes características:

- Salinidade: 35%;

- Temperatura: $26 \pm 1^\circ\text{C}$

- pH: 8,0 a 8,5

4.2. Vidraria

A vidraria utilizada nos testes ecotoxicológicos seguiu protocolo de descontaminação do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR, 2005b) que em linhas gerais consiste na lavagem do material com Extran a 5%, seguido de 5 enxágües em água corrente, permanência de 24h no ácido nítrico a 10%, 15 enxágües em água corrente, 1 enxágue com acetona P.A. e por fim 2 enxágües em água destilada.

4.3. Substâncias utilizadas

4.3.1. Dodecil Sulfato de Sódio -DSS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)

O Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), também conhecido como Lauril Sulfato de Sódio (LAS) é preparado pela sulfatação do lauril álcool, seguida de neutralização com carbonato de sódio. É um detergente aniônico muito utilizado na composição de produtos de limpeza doméstica e na indústria têxtil como amaciante de fibras. É apresentado comercialmente sob a forma de cristais, flocos, pó, de coloração branca e com leve odor de substâncias graxas. Tem como principais propriedades a

formação de reação neutra, baixa tensão superficial de soluções aquosas, emulsifica gorduras e possui peso molecular igual a 288,38.

O DSS entra em contato com o meio ambiente principalmente através da descarga de efluentes domésticos que contem grande quantidade de resíduos de produtos de limpeza ou mesmo indiretamente, através de drenagem de áreas interiores. As suas propriedades superfície-ativas são capazes de tornar as membranas celulares mais permeáveis, alterando assim os mecanismos de transporte de substâncias para a célula, podendo levar ao rompimento de membranas biológicas e organelas citoplasmáticas, o que ocasiona um efeito deletério nos organismos aquáticos (MAURIN, 1984; THORHAUG, 1992).

O DSS apresenta baixa toxicidade em relação ao risco que oferece ao Homem, sendo essa uma das razões da disseminação da sua utilização como substância de referência. A CETESB (2005a) considera apenas toxicidade de contato (irritação cutânea) a partir de valores de 25mg/dia, e alerta que, sob a forma mais utilizada para a realização dos testes, ou seja, em pó, a substância é irritante para o nariz, garganta e olhos e, se inalado, causa tosse.

Utilizado como substância de referência, tem como vantagem a ação rápida, não seletiva e toxicidade consistente em organismos marinhos (ARAÚJO e NASCIMENTO, 1999), agindo dentro de uma faixa estreita de concentrações. Entretanto, tem alta taxa de degradação, não podendo desta forma ser utilizado em testes de longa duração (ABEL, 1974; LEE, 1980).

4.3.2. Fenol (C_6H_5OH)

O Fenol é um químico relativamente bem utilizado como referência em testes de toxicidade. É naturalmente encontrado como resultado da decomposição da matéria orgânica, sendo comumente encontrado em efluentes de refinarias de derivados do petróleo (LEE, 1980).

É produzido sinteticamente a partir da sulfonação do benzeno com produção de ácido sulfônico, que, ao ser fundido com álcalis cáusticos, forma o Fenol. É utilizado na produção de resinas fenólicas e também na produção de componentes da fabricação do nylon e outras fibras sintéticas.

Segundo Lenthall (1999), é um poderoso desinfetante e bactericida, sendo assim bastante empregado na fabricação de produtos medicinais e em loções higiênicas.

4.3.3. 4-Clorofenol ($4-ClC_6H_4OH$)

O 4-Clorofenol, como composto aromático halogenado, possui a vantagem de ser mais resistente à degradação que os aromáticos não halogenados, como o Fenol. Desta forma é bastante recomendado como substância de referência, justamente pela estabilidade apresentada em solução, apesar de ser mais tóxico que o Fenol (LEE, 1980).

4.4. Determinação das concentrações-teste e preparo das soluções-estoque

A fim de se determinar o intervalo de concentrações necessário para obter um nível de efeito de 50% sobre os organismos, foram realizados testes exploratórios, *screenings*, utilizando-se de um intervalo de concentrações amplamente espaçadas. Para o teste com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) utilizou-se o intervalo 0,56; 1,0; 1,8; 3,2; 5,6 mg/L, concentrações corriqueiramente utilizadas em testes de toxicidade no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA. O intervalo utilizado para o teste screening do Fenol foi 14, 27, 52, 72 e 100 mg/L e o do 4-Clorofenol foi 6,8; 15; 32; 68 e 100 mg/L.

Após os testes preliminares, e com base nos valores de CE_{50-36h} obtidos, foram selecionadas as concentrações dos agentes tóxicos que seriam utilizadas, seguindo-se escala logarítmica (ENVIRONMENT CANADA, 1995).

4.4.1. Substância de Referência - Dodecil Sulfato de Sódio - Controle Positivo

Utilizou-se o DSS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) fabricado pela MERCK, de lote 8170341000, peso molecular igual a 288,36.

Inicialmente preparou-se uma solução-estoque que continha 10mg da substância em 100ml de água do mar em um balão volumétrico. Após a avolumação, a solução foi agitada por 30 minutos em placa magnética buscando-se a homogeneização completa da substância. A escala de concentrações utilizada foi: 1,0; 1,5; 2,2; 3,2 e 4,6 mg/L, escolhida com base nos resultados do teste screening.

O DSS foi utilizado com o intuito de validar os resultados obtidos com as duas outras substâncias investigadas, o Fenol e o 4-Clorofenol.

4.4.2. Fenol e 4-Clorofenol

O Fenol (C_6H_5OH) utilizado nos testes foi fabricado por VETEC Química Fina Ltda, Lote 010964, de peso molecular igual a 94,11. O 4-Clorofenol com peso molecular igual a 128,56 foi também fabricado por esta mesma empresa, constituindo parte do lote 972909.

As soluções-estoque foram preparadas para fornecer uma concentração de 10.000 mg/L dessas substâncias; para isso pesou-se 0,25g de cada uma delas em balança digital e, em seguida, foram utilizados 25ml de água destilada para diluição dos compostos em balão volumétrico e posterior agitação em placa magnética.

A distribuição da solução-estoque nos recipientes testes obedeceu ao cálculo constante em tabela específica (Tabela 1 e 2) para cada substância que indicava o volume necessário de cada solução para obter-se a concentração teste desejada em cada recipiente, conforme indicado a seguir.

Tabela 01. Cálculo das Concentrações Teste para a substância Fenol

SUBSTÂNCIA: FENOL		
SOLUÇÃO ESTOQUE		
Preparo da Solução Mãe		Concentração (mg/L)
Composto (mg)	Água Dest. (ml)	
250	25	10.000
USANDO A SOLUÇÃO ESTOQUE DIRETO NO EXPERIMENTO		
VOLUME (ml)	Quantidade composto (mg)	Conc Final desejada (mg/L) Em recipientes de 100 ml
0,72	7,2	72
1,00	10,0	100
1,40	14,0	140
1,90	19,0	190
2,70	27,0	270

Tabela 02. Cálculo das Concentrações Teste para a substância 4-Clorofenol

SUBSTÂNCIA: 4-CLOROFENOL		
SOLUÇÃO ESTOQUE		
Preparo da Solução Mãe		Concentração (mg/L)
Composto (mg)	Água Dest. (ml)	
250	25	10.000
USANDO A SOLUÇÃO ESTOQUE DIRETO NO EXPERIMENTO		
VOLUME (ml)	Quantidade composto (mg)	Concentração Final desejada (mg/L) Em recipientes de 100 ml
0,10	1,0	10
0,16	1,6	16
0,25	2,5	25
0,40	4,0	40
0,63	6,3	63

As concentrações-teste finais utilizadas para o fenol foram: 72; 100; 140; 190 e 270 mg/L e para o 4-clorofenol foram: 10; 16; 25; 40 e 63 mg/L.

Todo o procedimento de preparação das soluções-estoque das substâncias Fenol e 4-Clorofenol, bem como a distribuição das mesmas nos recipientes-teste, foram realizadas sob capela com sistema de exaustão ligado, seguindo as Boas Práticas de Laboratório (BPL) constante dos protocolos operacionais do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento.

4.5. Organismo-teste

O organismo-teste utilizado nos experimentos foi o ouriço do mar *Echinometra lucunter*.

Filo Echinodermata;

Subfilo Echinozoa;

Classe Echinoidea;

Subclasse Euechinoidea;

Infraclasse Acroechinoidea;

Superordem Camarodonta;

Ordem Echinoida;

Família Echinometridae;

Gênero Echinometra;

Espécie *Echinometra lucunter* - Linnaeus, 1758 (CEBIMAR, 2005; BDT, 2005)

E. lucunter possui uma morfologia bastante característica com espinhos grossos, bastante resistentes e coloração variando do marrom escuro ao negro. É

bastante abundante na costa brasileira sendo encontrado comumente sobre locas escavadas em rochas, em regiões de mar calmo ou batido. Alimenta-se basicamente de macroalgas e animais incrustantes. Ocorre desde a Flórida (EUA), até o sul do Brasil, bem como em regiões costeiras de ilhas tais como Antilhas, Bermudas, Ascensão, Santa Helena e Angola (TOMMASI, 1966 apud Prósperi e Araújo, 2002).

4.5.1. Coleta

Os exemplares foram coletados no dia da execução de cada teste, durante a maré baixa, na praia do Porto da Barra (Figuras 01 e 02), cuja excelente qualidade da água em relação à contaminação por esgotos domésticos é conferida por um monitoramento constante do órgão ambiental estadual (BONFIM, 2003). Após coleta manual, os organismos eram encaminhados ao laboratório, seguindo protocolo de teste com embriões de ouriço do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR, 2005a).



Figura 01 - Praia do Porto da Barra, Salvador-BA.



Figura 02 - Área de localização dos ouriços.

4.5.2. Tratamento em laboratório

No laboratório os indivíduos foram previamente lavados com água do mar para remoção de detritos e acondicionados em uma bandeja com a superfície aboral voltada para cima (Figura 03 e 04).



Figura 03 - Lavagem dos organismos com água do mar.



Figura 04 - Disposição dos organismos em bandeja.

4.5.3. Obtenção de gametas

Cada indivíduo recebeu, através de injeção intracelômica, 0,5ml de KCl 0,5M e, em seguida, o animal era colocado com a face aboral voltada para cima, por onde são eliminados os gametas. A sexagem era feita com base na coloração do material expelido (branco=esperma=machos; laranja=óvulos=fêmeas), uma vez que o organismo não apresenta dimorfismo sexual externo. Procedia-se à coleta do material contendo os gametas, através da utilização de pipetas de Pasteur e posterior transferência para recipientes distintos contendo água do mar (Figura 05).

A coleta dos gametas era interrompida passados 5 minutos da administração do KCl evitando-se assim a coleta de gametas imaturos.

Após decantação, a solução de óvulos era lavada através da retirada do sobrenadante e avolumação com água do mar, filtração em malha de 150 μ m para remoção de partículas; uma sub-amostra era retirada para observação ao microscópio, buscando-se identificar óvulos redondos, lisos, e homogêneos, ideais para a fecundação (Figura 06).



Figura 05 - Coleta dos gametas



Figura 06 - Óvulos em condições satisfatórias para fecundação.
Aumento: 100X

4.5.4. Fecundação

A fecundação foi realizada através da transferência de cerca de 2 ml da solução de espermatozóides para cerca de 400ml da suspensão de óvulos e breve agitação mecânica. Uma hora e meia depois, três sub-amostras de 1ml foram retiradas, procedendo-se a contagem dos ovos, identificados pelo aparecimento da membrana de fecundação, utilizando câmara de Sedgwich-Rafter. A média de

embriões das três contagens serviu de base para o cálculo da distribuição destes nos recipientes-teste, mantendo-se a densidade de 2000 embriões por 100 ml.

4.6. Montagem do teste

4.6.1. Desenho Experimental

Foram utilizados recipientes de vidro de boca larga com capacidade de 120ml. Distribuiu-se a quantidade pré-estabelecida de água de diluição e da substância tóxica, de modo a se obter a concentração desejada e, em seguida, inocularam-se os embriões, obtendo-se um volume final de 100 ml/recipiente-teste (Figura 07).

Cada teste contou com cinco concentrações e o controle, sempre em triplicata.



Figura 07 - Distribuição das substâncias orgânicas Fenol e 4-Clorofenol nos recipientes-teste.

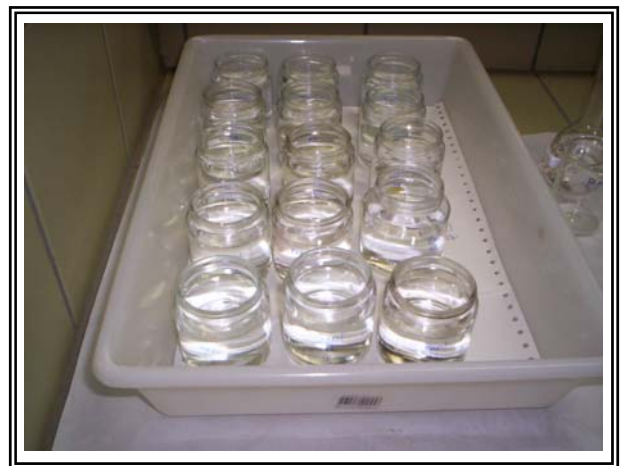


Figura 08 - Disposição dos recipientes-testes em triplicata.

4.6.2. Determinação de parâmetros físico químicos

Determinações de temperatura e pH do controle (somente água de diluição) e das replicatas de cada concentração foram feitas no início e final de cada experimento, a fim de identificar possíveis alterações que pudessem comprometer a confiabilidade dos resultados encontrados.

A salinidade era ajustada quando do preparo da água de diluição, sendo fixada em 35.

4.6.3. Acondicionamento dos recipientes-teste

Após a montagem do experimento, os recipientes-teste eram mantidos em bandejas plásticas sobre a bancada do laboratório por 36 horas, respeitando-se o foto-período de 12h de luz e 12h de escuro, à temperatura ambiente do laboratório, +/- 26°C (Figura 08).

4.7. Encerramento do teste

Após 36 horas, removeu-se, de cada recipiente teste, através de pipetagem, duas amostras de 20ml que foram transferidas para tubos de ensaio previamente identificados, contendo 1,0 ml de formol tamponado com bórax, a 10%, com a finalidade de preservar as larvas e embriões, até o momento da contagem ao microscópio óptico.

4.8. Leitura e Aceitabilidade do Teste

Após a decantação o sobrenadante de cada tubo de ensaio era retirado, e cerca de 1 ml restante foi transferido para câmara de Sedgwich-Rafter para contagem em microscópio, das larvas normais e anormais encontradas.

Foram contados os primeiros 100 organismos que apareceram no campo do microscópio, verificando-se o desenvolvimento e a ocorrência de anomalias.

Segundo Prósperi e Araújo (2002) após 36 horas são consideradas normais as larvas em estágio pluteus com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo da larva.

Na leitura das amostras dos testes realizados, somente considerou-se como normais, as larvas que apresentavam tal característica (Figura 09), sendo considerados anormais, todos os estágios de desenvolvimento anteriores ao estágio pluteus (ovo, mórula, blástula, gástrula normais ou não), e larvas defeituosas em geral (Figura 10).



Figura 09 - Larva pluteus de *Echinometra lucunter* normal (36h)
Aumento: 200X

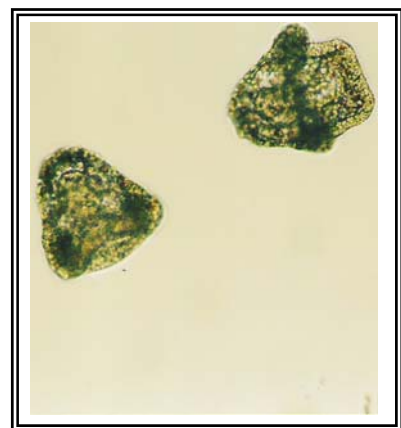


Figura 10 - Larvas de *Echinometra lucunter* com desenvolvimento retardado (36h)
Aumento: 200X

O teste somente foi aceito se apresentou menos de 20% de anormalidade no controle, e não apresentou variações das condições físico-químicas ótimas para o desenvolvimento dos embriões (NASCIMENTO e outros, 1989).

4.9. Expressão de resultados

Os resultados dos testes de toxicidade realizados foram expressos utilizando-se os critérios de avaliação do nível de efeito tóxico e métodos estatísticos rotineiramente empregados nesse tipo de pesquisa. A seguir veremos os procedimentos que foram adotados com tal finalidade.

4.10. Análise Estatística

4.10.1. Cálculo do CE₅₀-36h

Foi calculada a CE₅₀-36h (concentração da substância tóxica que causa efeito em 50% da população de organismos-teste utilizados, ao fim de 36h de duração do experimento) bem como o intervalo de confiança ($p=0,05$), de cada teste. Tal procedimento foi efetuado através do método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON e outros, 1977) utilizando o programa BANAL elaborado por Smith (1992).

4.10.2. DMS e DMS crítica

Calculou-se a Diferença Mínima Significativa dos testes executados, através do programa Toxtat 3.3 (GULLEY e outros, 1991). Tal cálculo é feito através do teste de hipóteses, como análise de variância seguido do teste de Dunnett, um teste que realiza múltiplas comparações entre as concentrações e o controle. A DMS crítica (Diferença Mínima Significativa) foi estabelecida com base no 75° percentil dos valores de DMS, obtidos utilizando-se o programa Excel do Office da Microsoft.

4.10.3. Concentração alternativa

A concentração alternativa é calculada com base no nível de efeito apontado pela DMS crítica. A partir desta concentração se começaria a observar efeitos deletérios significativos na população do organismo-teste.

As concentrações alternativas dos testes foram calculadas através do programa Inhibition Concentration (ICp versão 2.0) editado por NORBERG-KING (1993).

4.10.4. Coeficiente de Variação

Os coeficientes de variação entre os resultados dos testes realizados com cada substância, foram calculados visando-se avaliar a precisão analítica dos resultados. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C.V. = (\delta/X) * 100 \quad \text{onde;}$$

δ = desvio padrão

X = Média dos resultados

O desvio padrão e a média foram obtidos através do programa Excel.

4.11. Estabelecimento de Cartas Controle de Sensibilidade

A carta-controle é a representação gráfica da avaliação periódica dos resultados do ensaio com uma determinada substância de referência (CRUZ, 2003).

Neste trabalho, as cartas-controle de sensibilidade foram traçadas com o intuito de analisar as variações esperadas nas concentrações efetivas do organismo-teste utilizado. Elas foram elaboradas projetando-se a média ± 2 desvios-padrão como delimitação da variação aceitável a ser encontrada entre os testes.

4.12. Resumo das Condições físico-químicas dos testes

TIPO DE TESTE:	Estático
ÁGUA DE DILUIÇÃO:	Água do mar natural, filtrada, esterilizada
ORGANISMO-TESTE:	Embriões do ouriço do mar <i>Echinometra lucunter</i>

RÉPLICAS:	03
RECIPIENTES TESTE:	Frascos de vidro com capacidade de 120ml
CONCENTRAÇÕES:	DSS: 1,0; 1,5; 2,2; 3,2 e 4,6 mg/L Fenol: 72; 100; 140; 190 e 270 mg/L 4-Clorofenol: 10; 16; 25; 40 e 63 mg/L
N/ DE ORGANISMOS/RECIPIENTE-TESTE:	±2000 embriões
TEMPERATURA:	26±1°C
FILTRAÇÃO:	Filtros Whatman® G/FC
ALIMENTAÇÃO:	Sem alimentação
AERAÇÃO:	Sem aeração
PH:	7,5 - 8,5
SALINIDADE:	35
LUZ:	Usual em Laboratório
FOTOPERÍODO:	12h luz e 12h escuro
DURAÇÃO DOS TESTES:	36 horas
<i>ENDPOINTS:</i>	Anormalidade/Normalidade das larvas pluteus
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS:	CE ₅₀ e CE ₁₀

5. RESULTADOS

5.1. Variação de Parâmetros Físico-Químicos

A medida dos parâmetros pH e temperatura foram efetuados no início e ao fim de cada teste e não apresentaram variação expressiva entre as substâncias, permanecendo dentro da faixa aceitável para realização de testes de toxicidade com embriões de ouriço (Tabela 3).

Tabela 03 - Amplitude de Valores de pH e temperatura aferidos durante testes de toxicidade com as substâncias utilizadas.

Substâncias	Amplitude	
	pH (mol/L)	T°C
DSS	7,91 - 8,50	26,0 - 27,2
Fenol	7,72 - 8,48	25,8 - 27,0
4-Clorofenol	7,94 - 8,47	25,5 - 27,5

5.2. Estabelecimento do Nível de Efeito Alternativo

Para expressão de efeitos crônicos em testes de toxicidade com embriões do ouriço *Echinometra lucunter*, foi estabelecida neste trabalho a concentração de efeito alternativo. O nível de efeito estabelecido através de métodos estatísticos descritos

na metodologia foi de 10%, uma vez que a DMS crítica encontrada para cada substância foi próxima a esse valor (DSS 7,099; Fenol 7,782; 4-Clorofenol 7,070).

Desta forma para as três substâncias utilizadas neste trabalho foi indicada a CE_{10} que é a concentração efetiva que causa efeito crônico (anormalidades) em 10% dos organismos-teste.

A partir do estabelecimento deste nível de efeito alternativo, os resultados foram tratados fazendo-se comparações ao nível de efeito alternativo (10%) e aquele comumente utilizado em testes de toxicidade (50%).

5.3. Concentração Efetiva (CE_{50}) e Concentração Alternativa (CE_{10}) de efeito

5.3.1. DSS

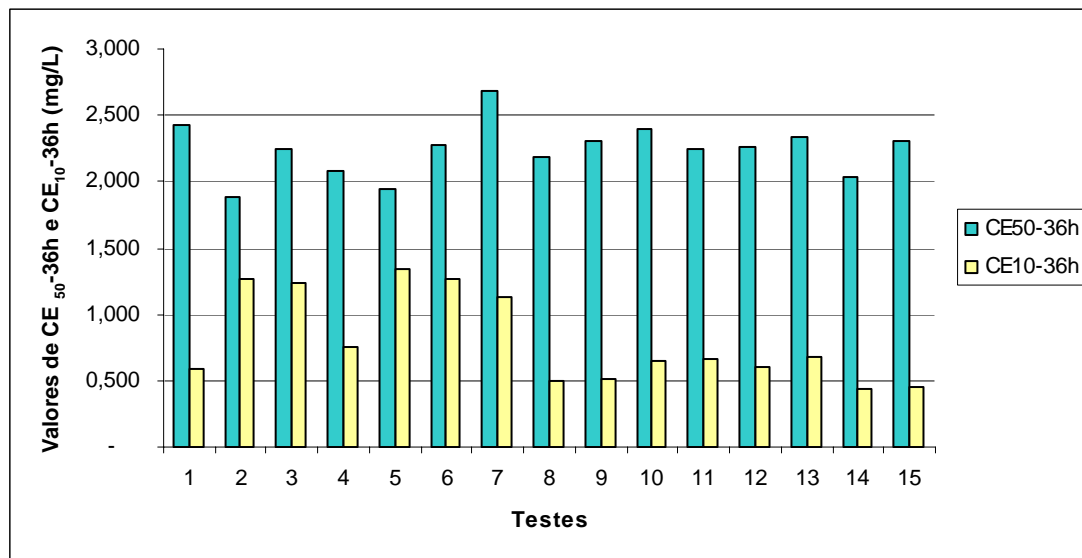
A média das CE_{50-36h} encontrada para o teste utilizando a substância DSS foi de 2,23 mg/L, sendo o desvio padrão de 0,20, resultando num coeficiente de variação de 9,01%. Para o nível de efeito alternativo (CE_{10-36h}) os valores obtidos foram CE média de 0,82 mg/L, desvio padrão de 0,35 com coeficiente de variação igual a 41,96%. (Tabela 4 e Figura 11).

Os testes realizados demonstraram que os embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* utilizados apresentam uma faixa de sensibilidade ao DSS variando de 1,89 a 2,69 mg/L para a CE_{50-36h} e de 0,44 a 1,34 mg/L para a CE_{10-36h} (Tabela 4).

Tabela 04 - Estatística Descritiva para o DSS (Dodecil Sulfato de Sódio) (n=15)

CE ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confiança (p=0,05)	CE ₅₀ médio (mg/L)	DESVIO PADRÃO	C.V. (%)	CE ₁₀ (mg/L)	CE ₁₀ médio (mg/L)	DESVIO PADRÃO	C.V. (%)
2,430	2,24 – 2,64	2,227	0,20	9,01	0,5832	0,823	0,35	41,96
1,890	1,80 – 1,98				1,2723			
2,240	2,11 – 2,39				1,2422			
2,080	1,93 – 2,23				0,7541			
1,950	1,86 – 2,04				1,3385			
2,280	2,15 – 2,43				1,2705			
2,690	2,48 – 2,92				1,1350			
2,180	1,97 – 2,41				0,5012			
2,310	2,10 – 2,54				0,5078			
2,390	2,18 – 2,62				0,6415			
2,240	2,05 – 2,45				0,6651			
2,260	2,08 – 2,45				0,6097			
2,340	2,16 – 2,54				0,6787			
2,030	1,81 – 2,27				0,4433			
2,300	2,03 – 2,61				0,4587			

*C.V. - Coeficiente de variação

Figura 11 - Valores de CE₅₀-36h e CE₁₀-36h encontrados em testes ecotoxicológicos com embriões de *Echinometra lucunter* usando a substância DSS.

5.3.2. Fenol

Utilizando a substância Fenol, a média das CE₅₀-36h encontrada foi de 135,22 mg/L, sendo o desvio padrão de 5,46; resultando num coeficiente de variação de 4,04%. Para o nível de efeito alternativo (CE₁₀-36h) os valores obtidos foram CE média de 36,63 mg/L, desvio padrão de 14,96 e coeficiente de variação igual a 40,85% (Tabela 5 e Figura 12).

Em relação ao Fenol, os embriões de *Echinometra lucunter* utilizados apresentaram uma faixa de sensibilidade compreendida entre 125,88 a 143,84 mg/L para a CE₅₀-36h e de 24,26 a 68,78 mg/L para a CE₁₀-36h (Tabela 5).

Tabela 05 - Estatística Descritiva para o Fenol (n=15)

CE ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confiança (p=0,05)	CE ₅₀ médio (mg/L)	DESVIO PADRÃO	C.V. (%)	CE ₁₀ (mg/L)	CE ₁₀ médio (mg/L)	DESVIO PADRÃO	C.V. (%)
140,99	132,07 – 150,52	135,22	5,46	4,040	60,32	36,63	14,96	40,85
142,30	133,23 – 151,99				67,32			
138,87	127,84 – 150,86				36,63			
134,96	124,86 – 145,87				38,14			
138,52	130,14 – 147,45				68,78			
139,24	128,08 – 151,37				37,23			
132,53	120,56 – 145,70				31,37			
132,24	123,65 – 141,43				51,99			
126,15	111,08 – 143,27				24,26			
125,88	112,45 – 140,91				25,11			
136,08	126,59 – 146,27				43,45			
133,84	122,27 – 146,51				30,68			
143,84	130,34 – 158,73				30,30			
132,52	120,31 – 145,97				33,45			
130,32	115,30 – 147,30				25,74			

*C.V. - Coeficiente de variação

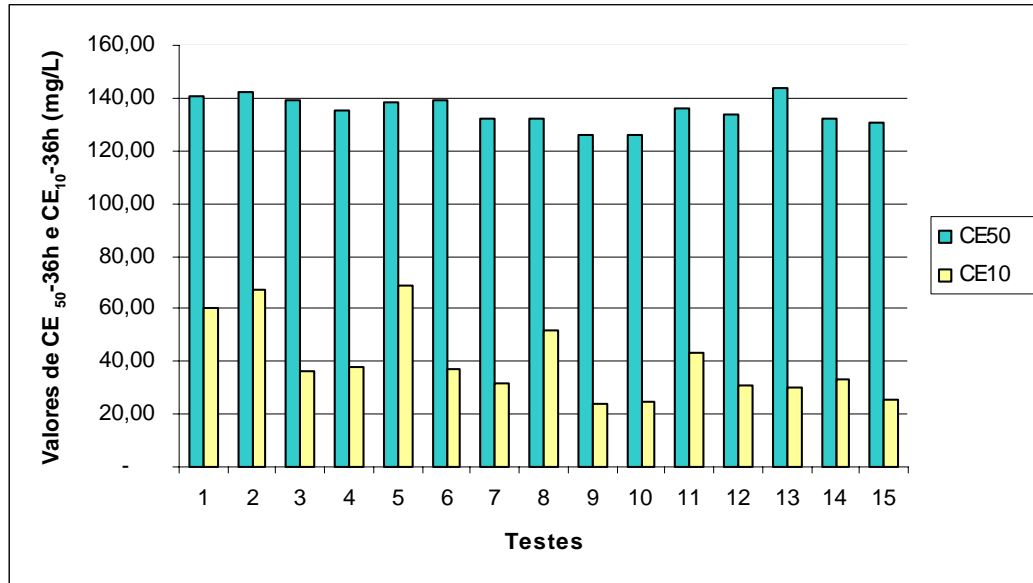


Figura 12 - Valores de CE_{50-36h} e CE_{10-36h} encontrados em testes ecotoxicológicos com embriões de *Echinometra lucunter* usando a substância Fenol.

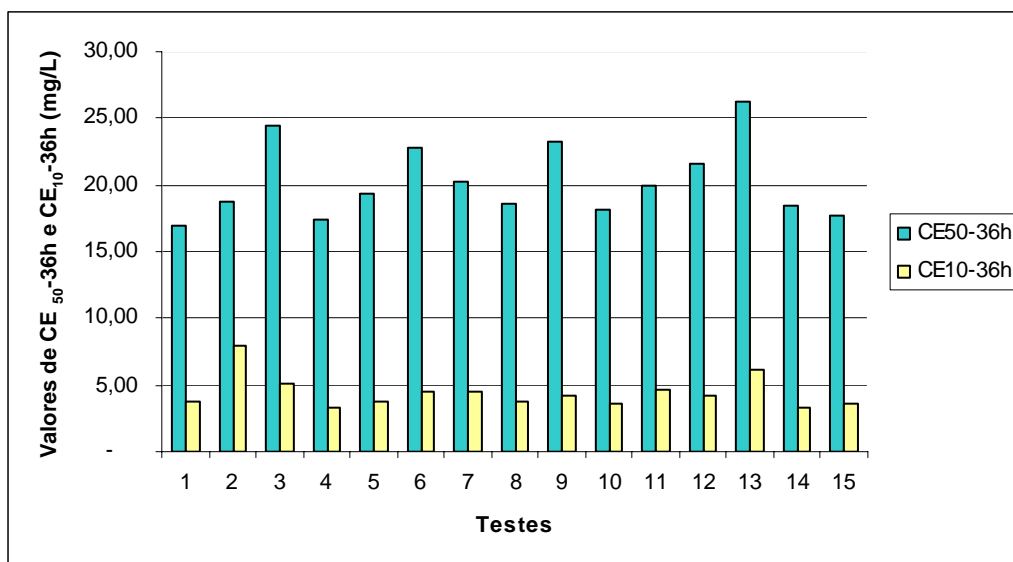
5.3.3. 4-Clorofenol

Para a substância 4-Clorofenol, a média das CE_{50-36h} encontrada foi de 20,69 mg/L, sendo o desvio padrão de 3,19, resultando num coeficiente de variação de 15,40%. Para o nível de efeito alternativo (CE_{10-36h}) os valores obtidos foram CE média de 4,58 mg/L, desvio padrão de 1,35 e coeficiente de variação igual a 29,53% (Tabela 6 e Figura 13).

Utilizando o 4-Clorofenol, os testes realizados demonstraram que os embriões de *E. lucunter* apresentam uma faixa de sensibilidade variando de 16,90 a 26,31 mg/L para a CE_{50-36h} e de 3,27 a 7,95 mg/L para a CE_{10-36h} (Tabela 6).

Tabela 06 - Estatística Descritiva para o 4-Clorofenol (n=15)

CE ₅₀ (ppm)	intervalo de confiança (p=0,05)	CE ₅₀ médio (ppm)	DESVIO PADRÃO	C.V. (%)	CE ₁₀ (ppm)	CE ₁₀ médio (ppm)	DESVIO PADRÃO	C.V. (%)
16,90	14,77 - 19,35	20,69	3,19	15,40	3,74	4,58	1,35	29,53
18,81	17,20 - 20,57				7,95			
24,48	21,96 - 27,28				5,06			
17,35	14,95 - 20,14				3,27			
19,30	16,85 - 22,11				3,82			
22,85	20,16 - 25,89				4,51			
20,22	17,82 - 22,93				4,44			
18,66	16,18 - 21,52				3,74			
23,18	20,21 - 26,59				4,26			
18,13	15,58 - 21,08				3,61			
19,97	17,73 - 22,50				4,65			
21,67	18,99 - 24,72				4,14			
26,31	23,51 - 29,45				6,21			
18,49	15,68 - 21,79				3,35			
17,74	15,26 - 20,63				3,55			

Figura 13 - Valores de CE₅₀-36h e CE₁₀-36h encontrados em testes ecotoxicológicos com embriões de *Echinometra lucunter* usando a substância 4-Clorofenol.

5.4. Precisão analítica dos resultados

Os coeficientes de variação entre os testes realizados para os diferentes níveis de efeito (CE_{50} e CE_{10}) foram calculados e podem ser visualizados na Figura 14.

Os menores coeficientes foram encontrados para o nível de efeito de 50%, cujo menor valor foi encontrado entre os testes realizados com a substância Fenol (4,04%) seguido dos testes com DSS (9,94%) e finalmente o 4-Clorofenol com 13,90%.

No nível de efeito de 10% ocorreu uma inversão e o 4-Clorofenol apresentou o menor coeficiente encontrado (27,96%) seguido do Fenol (40,85%) e por fim o DSS, com 41,96%.

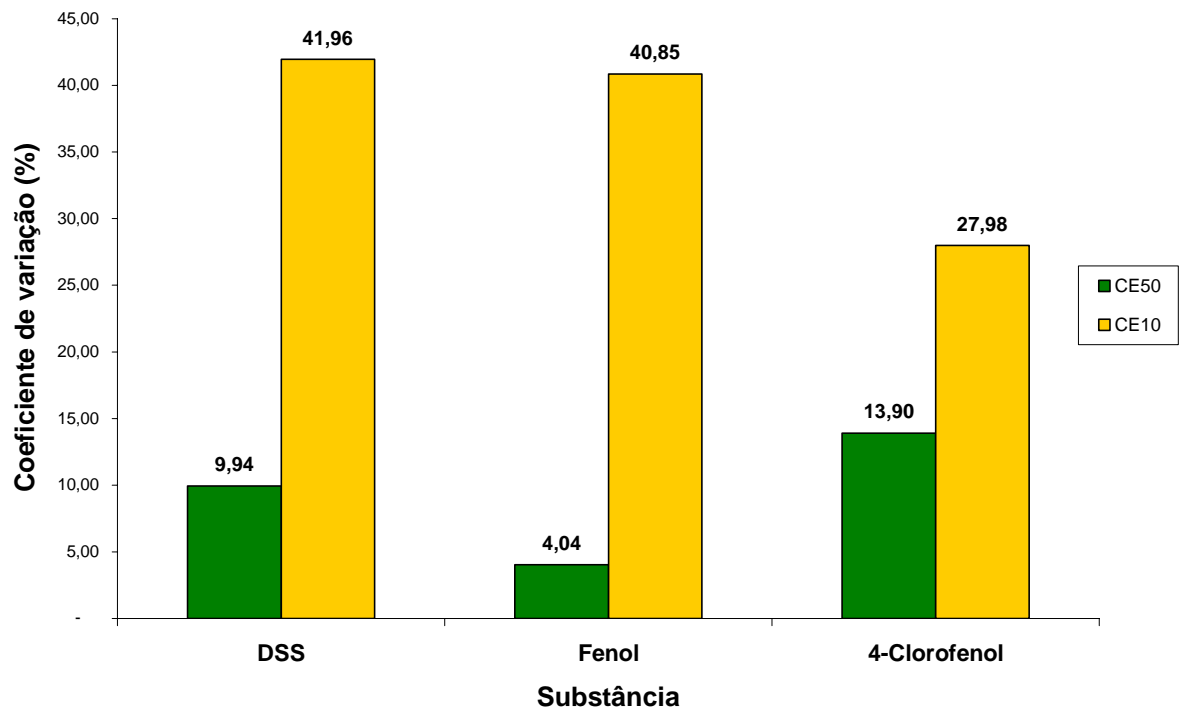


Figura 14 - Coeficientes de variação entre os testes toxicológicos realizados com embriões de *Echinometra lucunter* sob a ação de 3 diferentes substâncias de referência.

5.5. Cartas-Controle de Sensibilidade

Os testes utilizando substâncias de referência são utilizados para atestar a saúde e a sensibilidade dos organismos teste e também a boa performance do laboratório. Uma das técnicas desenvolvidas para efetuar essa verificação é o estabelecimento de cartas-controle (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

Nas cartas-controle são plotados os resultados de uma série consecutiva de testes realizados com substâncias de referência, sendo estes expressos em CL_{50} ou CE_{50} .

No presente trabalho foram elaboradas cartas-controle de sensibilidade para embriões de *Echinometra lucunter* em relação a cada substância investigada, sendo os resultados do CE_{50} -36h da substância de referência utilizada, DSS, comparados com a carta-controle existente para essa substância e espécie no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

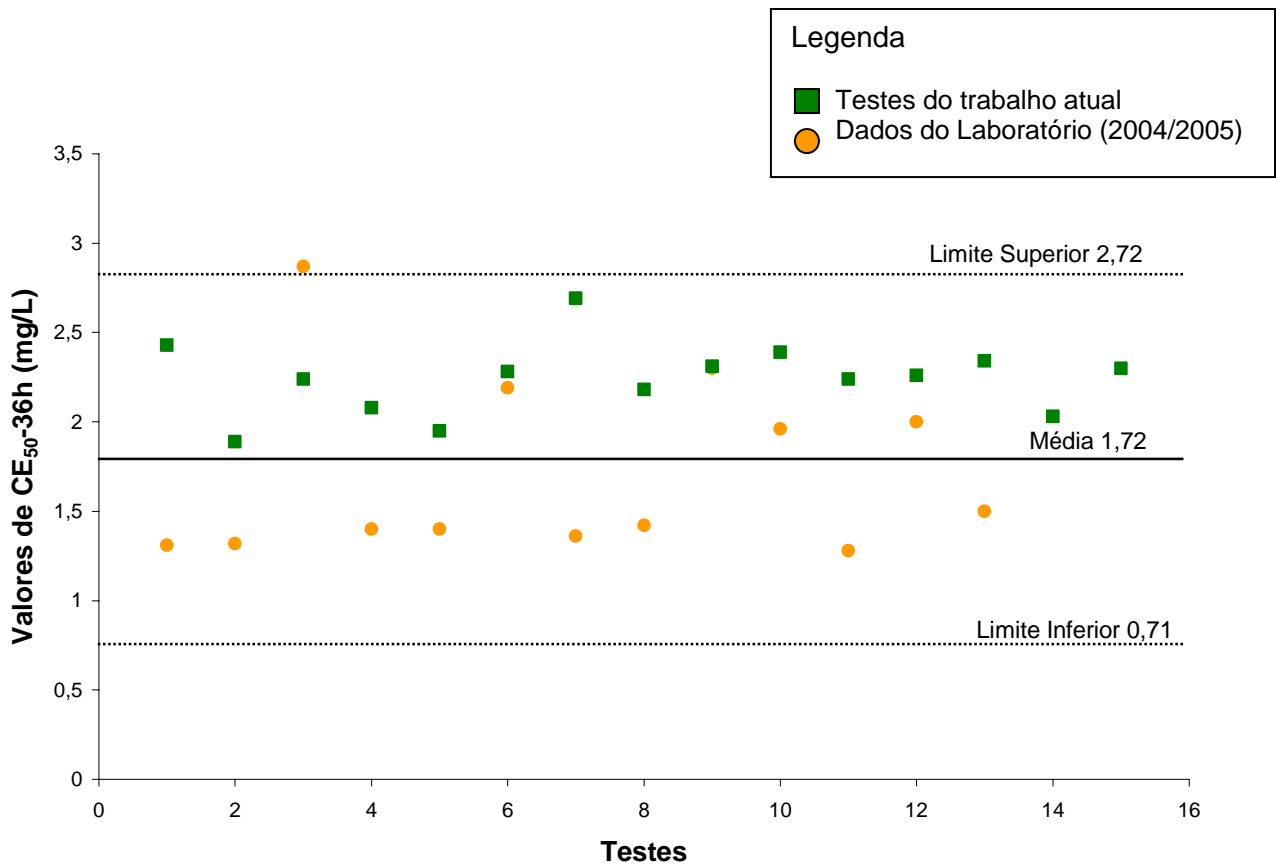


Figura 15 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* com base nos valores de CE_{50} -36h utilizando a substância de referência DSS.

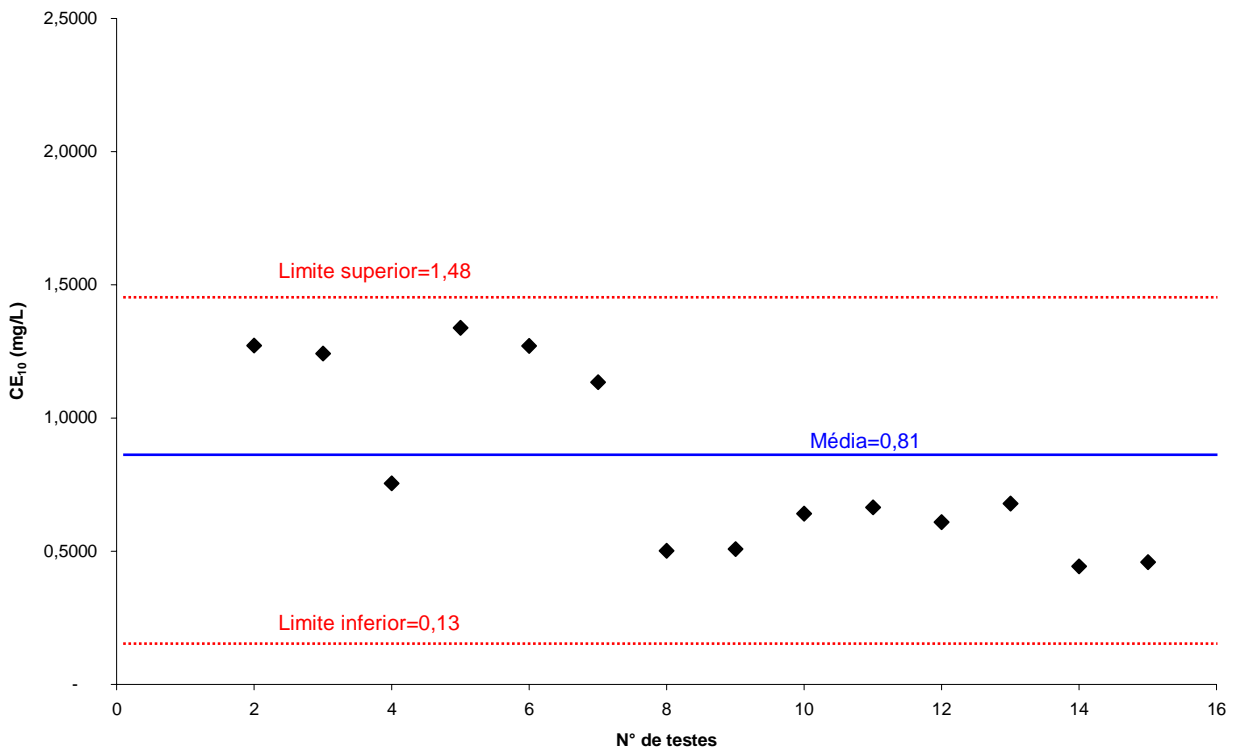


Figura 16 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* com base nos valores de CE_{10-36h} utilizando a substância de referência DSS.

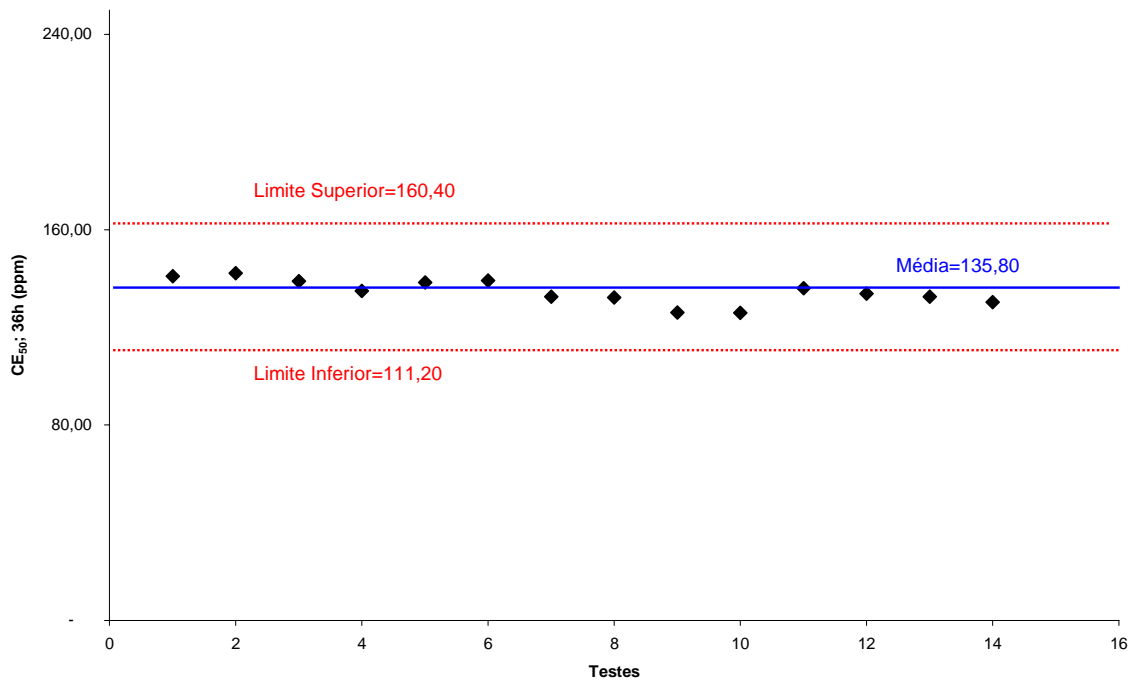


Figura 17 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* com base nos valores de CE_{50-36h} utilizando a substância de referência Fenol.

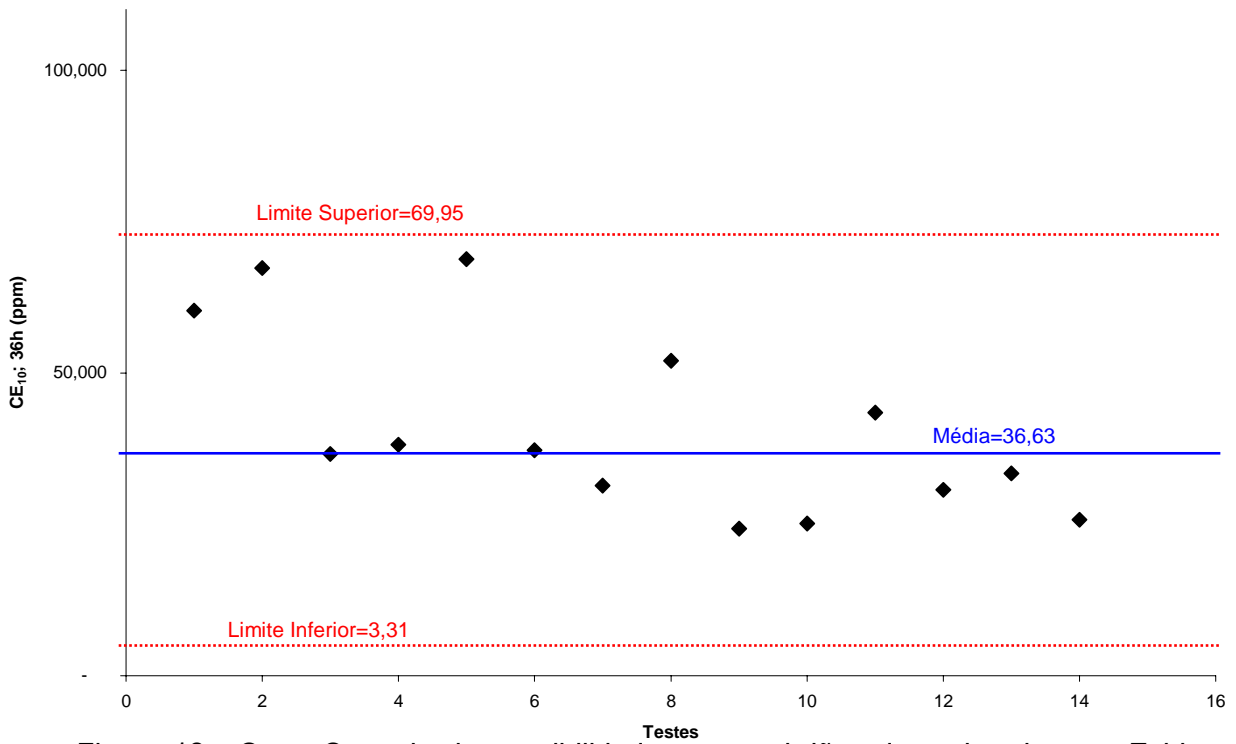


Figura 18 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* com base nos valores de CE_{10}^{36h} utilizando a substância de referência Fenol.

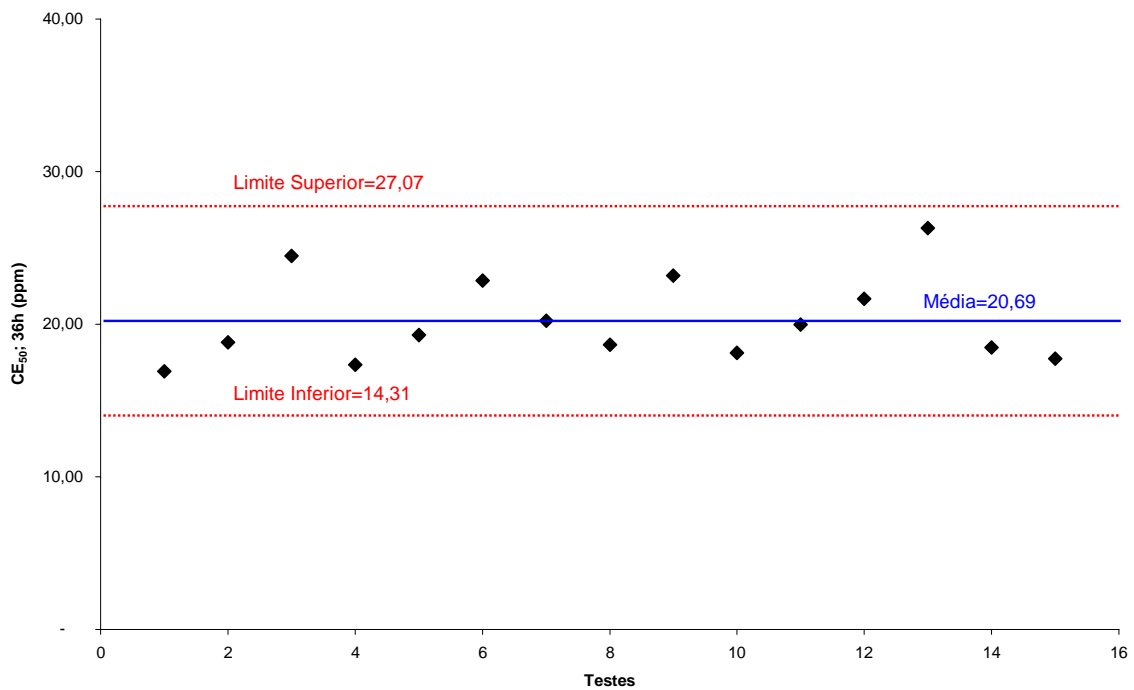


Figura 19 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* com base nos valores de CE_{50}^{36h} utilizando a substância de referência 4-Clorofenol.

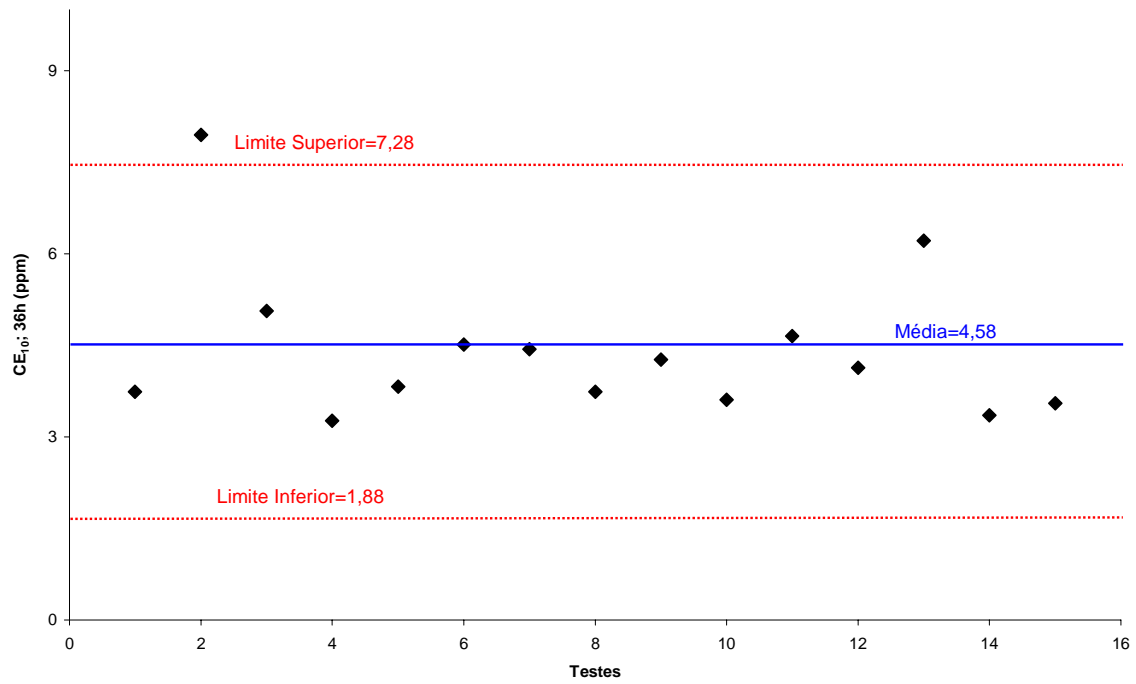


Figura 20 - Carta Controle de sensibilidade para embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* com base nos valores de CE_{10-36h} utilizando a substância de referência 4-Clorofenol.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise Comparativa da toxicidade das substâncias investigadas

É possível observar na figura 21 que dentre as substâncias utilizadas neste trabalho, o 4-Clorofenol mostrou-se a mais tóxica, não levando-se em consideração os resultados obtidos com o DSS, uma vez que o mesmo somente foi utilizado para balizamento dos resultados das demais substâncias. A CE_{50} média dos embriões de *E. lucunter* é atingida em uma concentração de apenas 20,27 mg/L de 4-Clorofenol, em detrimento dos 135,22 mg/L de Fenol que são necessários para atingir tal nível de efeito, indicando assim ser este último menos tóxico que o 4-Clorofenol, corroborando o que foi observado por Lee (1980).

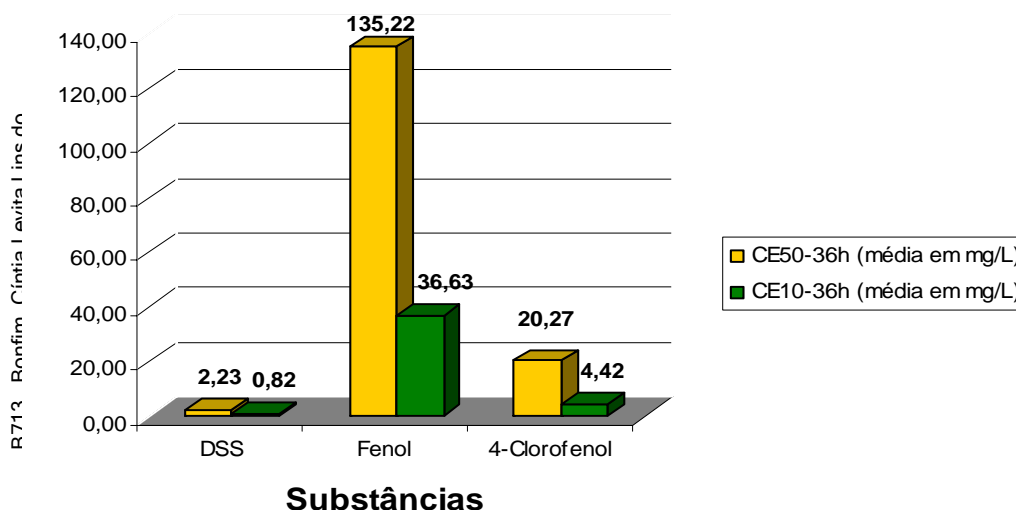


Figura 21 - Comparação dos Valores de CE₅₀-36h e CE₁₀-36h encontrados em testes com embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter*.

6.1.1. Concentração efetiva - CE₅₀

6.1.1.1. Fenol

O Fenol não ocorre naturalmente em corpos d'água, sendo a principal causa de sua contaminação os despejos de refinarias de petróleo e outras indústrias.

É considerado extremamente tóxico aos organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito baixas (CETESB, 2005b), agindo principalmente na paralisia do sistema nervoso (ALABASTER e LLOYD, 1980).

Em relação à concentração efetiva investigada (CE₅₀-36h), os testes que apresentaram maior precisão analítica foram os executados com a substância Fenol (4,04%) o que indicaria uma maior confiabilidade nos dados obtidos e conseqüentemente a eleição dessa substância como mais apropriada para execução dos testes ecotoxicológicos com *E. lucunter*. Porém, tanto o DSS quanto o 4-Clorofenol também apresentaram baixos coeficientes de variação de resultados de

CE₅₀ (9,94 e 13,90%, respectivamente), demonstrando que também podem ser utilizados como substâncias de referência, uma vez que o uso do Fenol apresenta desvantagens como apresentar alta toxicidade à humanos.

É corrosivo e irritante das membranas mucosas. Potencialmente fatal se ingerido, inalado ou absorvido pela pele. Causa queimaduras severas e afeta o sistema nervoso central, fígado e rins. Se inalado provoca dispnéia e tosse. A absorção sistêmica provoca danos ao fígado, rins e sistema nervoso central. Caso ingerido provoca queimaduras intensas da boca e da garganta, dor abdominal acentuada, cianose, fraqueza muscular e coma. Podem ser observados tremores e contrações musculares. A morte pode advir por parada respiratória. O contato com a pele pode provocar desde um eritema até necrose e gangrena dos tecidos, dependendo do tempo de contato e da concentração das soluções. Em contato com os olhos pode provocar inchaço da conjuntiva; a córnea torna-se branca e muito dolorida, podendo ocorrer perda de visão (WIKIPEDIA, 2005).

O maior perigo do Fenol é a habilidade de penetrar rapidamente na pele, causando severas lesões, que podem ser fatais. Seu manuseio em laboratório, portanto, requer extremo cuidado, incluindo a adoção de protocolos de execução dos testes e uso rigoroso dos equipamentos de segurança (Equipamentos de Proteção Individual - EPI's e Equipamentos de Proteção Coletiva - EPC's) (CETESB, 2005).

Os dados disponíveis na literatura a respeito da utilização do Fenol como substância de referência em testes de toxicidade acusam uma discrepância de valores nos coeficientes de variação encontrados.

Para testes utilizando o Fenol e como organismos-teste *Daphnia magna* e *Daphnia pulex* encontramos na literatura coeficientes de variação de 4,9 e 6,5%, respectivamente (USEPA, 1980). A Environment Canada (1990) obteve um

coeficiente de variação de 28% para doze testes agudos realizados também com *Daphnia magna* expostas ao Fenol e Walker (1988), trabalhando com peixes observou coeficientes de variação de 38% e 39% para testes de toxicidade envolvendo o Fenol.

O Fenol tem sido citado por alguns autores como substância que sofre alta degradação microbiana oxidativa (LEE, 1980) e também através da luz (PAIXÃO, 2002), tornando-se complicado controlar as concentrações ao longo do tempo de execução do experimento. A Environment Canada (1990) reforça que, tanto a fotodegradação quanto a volatilização são mecanismos que atuam na remoção do Fenol de uma solução e recomenda que testes conduzidos com essa substância devem ser realizados em recipientes fechados e submetidos à baixos índices de iluminação.

Nos experimentos aqui conduzidos, tais preocupações não puderam ser levadas em conta, considerando que iluminação, temperatura, composição, salinidade, pH, aeração, dentre outros fatores, influenciam majoritariamente o desenvolvimento de embriões de ouriço do mar, logo, apesar dos testes terem apresentado resultados favoráveis à utilização do fenol como substância de referência, a literatura demonstra as implicações desfavoráveis que limitam o seu uso, principalmente em testes de longa duração.

Outro item que contraria a lista de propriedades que um tóxico deve apresentar para ser adotado como referência em testes ecotoxicológicos (ENVIRONMENT CANADA, 1990) é que o Fenol não apresenta toxicidade em baixas concentrações, sendo o CE_{50-36h} encontrado para *Echinometra lucunter* dentro de uma faixa a partir dos 120 mg/L. Já para a truta, a literatura dispõe de dados referentes a um CL_{50-24h} de 5 mg/L (ALBERSMEYER e VON ERICHSON,

1979), indicando que seguindo o mesmo critério, o Fenol serviria para substância de referência em testes com este peixe. Outros estudos conduzidos com peixes indicam uma CL₅₀-96h média de 177,9; 102,6 e 46,6 mg/L para embriões, larvas e juvenis, respectivamente (BERTOLETTI, 2000).

Utilizando a ostra *Crassostrea rhizophorae*, Cruz (2003) encontrou um CE₅₀-24h de 55,38 mg/L e Davis e Hindu (1969) confirmaram uma diminuição na viabilidade de ovos de *Crassostrea virginica* quando submetidos à ação de apenas 2 mg/L de Fenol.

Au e outros (2003) trabalhando com uma espécie de ouriço abundante na região do Indopacífico e Mar da China, encontrou evidências que a exposição de apenas 0,1mg/L⁻¹ de Fenol pode baixar a qualidade do esperma e com isso influenciar no sucesso reprodutivo dos ouriços do mar. No seu estudo, ele ressalta ainda que tal efeito provavelmente ocorre sobre a espermatogênese de outras espécies de invertebrados, o que comprometeria as relações ecológicas no ambiente marinho.

6.1.1.2. DSS

O DSS foi utilizado nestes experimentos com o único propósito de avaliar a saúde dos organismos-teste, uma vez que a sua utilização como substância de referência já é vastamente documentada na literatura específica (ARAÚJO e NASCIMENTO, 1999; LEE, 1980; ABEL, 1974). A sua utilização serviu para atestar a performance dos testes realizados com os outros tóxicos investigados, contribuindo para o aperfeiçoamento dos procedimentos, agregando precisão aos resultados.

Os valores de CE_{50-36h} encontrados para o DSS estão aproximados dos citados na literatura, tendo como causa da sua variação a sensibilidade distinta entre espécies e, até mesmo intra-específica, uma vez que os organismos utilizados pertencem à populações de diferentes locais. Mastroti e outros (2001) encontraram valores de CE_{50-36h} numa faixa de 1,52 a 2,70 mg/L para testes de toxicidade de curta duração com *Lytechinus variegatus* coletados em São Paulo, valores bastante aproximados da faixa de 1,89 a 2,69 mg/L encontrados nos experimentos aqui conduzidos com *E. lucunter*. Araújo e Nascimento (1999) também utilizando *E. lucunter* encontraram um CE_{50-24h} de 3,03 mg/L para 4 testes utilizando o DSS, valor acima do encontrado no presente trabalho.

Comparando com outros organismos utilizados em testes de toxicidade podemos citar os valores encontrados para *Artemia salina*, CE_{50-24h} de 31,61 mg/L (ARAÚJO e NASCIMENTO, 1999); e 1,30 mg/L para a CE_{50-24h} encontrada para embriões de *Crassostrea rhizophorae* (CRUZ, 2003).

6.1.1.3. 4-Clorofenol

Lee (1980) considera o 4-Clorofenol totalmente tóxico, sendo muito mais tóxico que o Fenol.

Os clorofenóis são considerados fenóis substituídos e são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos. Junto com os nitrofenóis são os principais produtos de degradação de pesticidas organofosforados e fenoxi-ácidos clorados.

Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), os compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes. Muitos destes compostos

causam efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese (ROSATTO e outros, 2001).

O 4-Clorofenol, apesar de ser uma substância considerada ainda mais tóxica que o Fenol, tem o seu uso como substância de referência bastante recomendado, devido à sua baixa taxa de degradação, principalmente quando comparado ao Fenol (LEE, 1980).

Existem poucos dados disponíveis na literatura sobre a utilização do 4-Clorofenol como substância de referência. Cruz (2003) utilizando embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* como organismo-teste e investigando a eficiência do 4-Clorofenol como tóxico de referência, concluiu que entre este, o Fenol, e o DSS, o 4-Clorofenol apresentou melhor performance como substância de referência.

Os resultados de CE_{50-36h} obtidos com a utilização do 4-Clorofenol foram bastante consistentes, sendo validados com o coeficiente de variação de 13,90%, bem abaixo do limite de 40% estabelecido como aceitável pela Environment Canada (1999).

Cruz em 2003, trabalhando com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* obteve um coeficiente de variação de 19,21% para os resultados de CE_{50-24h} encontrados e para treze testes agudos realizados com *Daphnia magna* a Environment Canada (1990) obteve um coeficiente de variação de 25%.

A toxicidade do 4-Clorofenol apresentou-se logo em baixas concentrações, tendo o CE_{50-36h} dos testes realizados com essa substância variado de 16,90 a

26,31 mg/L. Este é mais um indício da sua adequabilidade como tóxico de referência.

Não foi encontrada referência na literatura de testes ecotoxicológicos conduzidos com a utilização do 4-Clorofenol e *Echinometra lucunter*, o que tornou difícil a comparação dos resultados obtidos, porém, a precisão analítica encontrada e o traçado das cartas-controle de sensibilidade validam os resultados sendo possível inferir sobre a utilização deste composto como substância de referência.

As diversas substâncias de referência podem produzir os mais variados efeitos no desenvolvimento dos organismos-teste. Em alguns casos esse efeito pode ser exclusivo de alguma substância, ou até mesmo do grupo químico a que esta pertença (CRUZ, 2003).

Das diversas anormalidades observadas nos testes conduzidos com *E. lucunter*, apenas os embriões submetidos à ação tóxica do 4-Clorofenol apresentaram anormalidades distintas das já documentadas como retardamento do crescimento da larva, não evolução do ovo, etc.

Conforme as figuras 22 e 23, a configuração de divisão do embrião somente foi encontrada nos organismos submetidos à ação tóxica do 4-Clorofenol, mais precisamente, a partir da concentração de 25 ppm (a 3ª na escala ascendente de concentração utilizada) já era possível encontrar embriões sob esta conformação.



Figura 22 - Embrião de *Echinometra lucunter* submetido à ação de 25 ppm de 4-Clorofenol. Aumento 200X



Figura 23 - Embrião de *Echinometra lucunter* submetido à ação de 40 ppm de 4-Clorofenol. Aumento 200X

Diante de todas as características favoráveis à utilização do 4-clorofenol como referência, a saber, apresentar boa performance na análise da precisão analítica dos testes executados, toxicidade em baixas concentrações, não seletividade a organismos aquáticos, fácil detecção da anormalidade nas amostras analisadas e estabilidade em solução (ENVIRONMENT CANADA, 1990), fica somente a precaução da utilização de equipamentos de segurança no manuseio desta substância, uma vez que a mesma é altamente tóxica ao Homem. Caso esteja sob a forma de pó, é irritante para os olhos, nariz e garganta. Se inalado, causará tosse ou dificuldade respiratória e, estando sob a forma sólida, queimará a pele e olhos, sendo venenoso se ingerido (CETESB, 2005c).

As instalações laboratoriais também devem estar equipadas para dar suporte à utilização da substância, principalmente em relação à exaustão dos vapores formados quando da preparação das matrizes tóxicas, distribuição da substância nos recipientes-teste e também em relação à destinação final dos resíduos gerados na condução do experimento, que deve ser extremamente cuidadosa e seguir o disposto na legislação ambiental competente.

6.2. Cartas Controle de sensibilidade

As cartas controle traçadas para os testes de toxicidade conduzidos com embriões de *E. lucunter* e utilizando as substâncias DSS, Fenol e 4-Clorofenol, serviram para avaliar as oscilações dos valores da concentração efetiva (CE_{50}) e da alternativa (CE_{10}) obtidas a partir dos testes.

Dentre as cartas elaboradas, encontramos valores que caíram fora do limite estabelecido (± 2 desvios padrões) para o DSS (1 ocorrência no CE_{50-36h}), para o Fenol (1 ocorrência no CE_{10-36h}), e para o 4-Clorofenol (1 ocorrência no CE_{10-36h}). À esse evento a literatura dá o nome de “outlier” e pode ocorrer ao acaso, servindo apenas de alerta para a verificação dos procedimentos técnicos adotados na condução do experimento, cujo valor se encontre fora dos limites estabelecidos. Por esta razão as cartas-controle servem de medição tanto da padronização do experimento conduzido, quanto da saúde de organismos que podem estar debilitados e não responderem satisfatoriamente ao teste (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

Comparando os resultados obtidos com os esperados, presentes em uma carta-controle, é possível acompanhar a evolução dos testes que são realizados, e verificar a coerência dos mesmos.

Os resultados dos testes desenvolvidos com o DSS estiveram todos dentro da faixa pré-estabelecida na carta-controle do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA, garantindo assim a qualidade dos resultados obtidos com as outras substâncias testadas (Figura 14).

6.3. Nível de efeito alternativo em testes crônicos

O estabelecimento de níveis de efeito alternativo foi proposto inicialmente no Workshop de Pellston em 1995 (GROTHER e outros, 1996) e objetivava tornar os métodos ecotoxicológicos mais fidedignos para estimar o impacto de efluentes líquidos em corpos hídricos receptores. Através do cálculo da DMS (Diferença Mínima Significativa) entre um tratamento e o controle experimental de um ensaio, Chapman e outros (1996) concluíram que seria possível estabelecer o nível de efeito biológico apropriado para cada método utilizado.

O presente trabalho calculou o nível de efeito biológico mais adequado para cada substância, conforme descrito na metodologia (CE₁₀), porém, os coeficientes de variação encontrados foram bastante altos quando comparados com os encontrados ao nível de 50% de efeito (Tabela 06).

Tabela 06 - Coeficientes de Variação encontrados nos testes toxicológicos com embriões de *E. lucunter*

Substância	Coeficiente de Variação (%) CE ₅₀ -36h	Coeficiente de Variação (%) CE ₁₀ -36h
DSS	9,94	41,96
Fenol	4,04	40,85
4-Clorofenol	13,90	27,98

A tendência do coeficiente de variação aumentar, quando se diminui o nível de efeito biológico, já foi demonstrado por diversos autores, uma vez que existe uma maior variabilidade em níveis de efeito menores (BERTOLETTI, 2000; CRUZ, 2003).

A precisão é definida pelo coeficiente de variação, ou desvio padrão relativo, e é o termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios. Os limites de precisão aceitáveis podem ser designados através da fórmula empírica de Horwitz, onde:

$$RSDr < 2^{(1-0,5 \log c)} \cdot 0,67 \quad \text{sendo: } c = \text{concentração que se está analisando}$$

Na tabela 07, que foi publicada pela AOAC International (1993), podemos verificar que quanto maior a concentração do analito maior a imprecisão do sistema de análise, o que corrobora os resultados obtidos com o aumento da variação nos dados da concentração alternativa (CE_{10}), uma vez que este nível de efeito é menor do que a concentração efetiva (CE_{50}).

Tabela 07 - Relação entre a concentração do Analito e a Precisão analítica de resultados (AOAC, 1993)

Analito (%)	Horwitz	Calculado RSDr (%)
100	2	1,3
10	2,8	1,9
1	4	2,7
0,1	5,6	3,7
0,01	8	5,3
0,001 (1ppm)	11	7,3
0,0001	16	11
0,00001	23	15
0,000001	32	21
0,0000001 (1ppb)	35	30

Os resultados de coeficientes de variação obtidos ao nível de efeito alternativo corroboram a eleição do 4-Clorofenol como substância de referência mais indicada à ser utilizada em testes ecotoxicológicos com *E. lucunter*, pois somente o valor encontrado para esta substância (27,98%) encontrou-se abaixo do considerado pela Environment Canada (1999) como aceitável em testes de toxicidade, que é de 40%.

Entretanto, os valores obtidos para o DSS e para o Fenol, ainda que aproximados do limite estabelecido, confirmam que a concentração efetiva de 10% é apropriada para avaliar a toxicidade crônica de *E. lucunter*. A adoção deste nível de efeito mais restritivo serviria para assegurar uma maior proteção às comunidades aquáticas,

pois indicam efeitos adversos em uma porcentagem menor de indivíduos, a partir da qual se começa a observar efeitos deletérios em toda a população.

6.4. Comparação do desempenho das substâncias de referência utilizadas nos testes de toxicidade com *Echinometra lucunter*

Na tabela 8 podemos visualizar um resumo das características apresentadas por cada substância utilizada neste trabalho com critérios de pontuação positiva ou negativa a depender de cada performance.

O 4-Clorofenol apresentou melhor precisão analítica dos resultados e obteve pontuação positiva na maioria dos critérios listados como pontos de corte na adoção de uma substância de referência. Porém, existe uma tendência em se utilizar como referência, substâncias menos tóxicas ao Homem, considerando-se o seu manuseio constante, a economia na utilização de Equipamentos de Proteção Individual e também o seu lançamento no meio ambiente (BERTOLETTI, 2005).

Desta forma, uma vez que ocorreu empate entre o 4-Clorofenol e o DSS, deve-se priorizar o uso deste, pela baixa toxicidade que apresenta ao Homem.

Tabela 08 - Desempenho de substâncias de referência utilizadas em testes de toxicidade

CRITÉRIOS	DSS	Fenol	4-Clorofenol
Disponibilidade de dados sobre a substância	+	+	-
Estabilidade em solução	-	-	+
Manejo	+	+	+
Toxicidade em baixas concentrações	+	-	+
Baixa toxicidade ao Homem	+	-	-
Efeito tóxico definido	-	-	+
Precisão analítica dos resultados obtidos	+	+	+
TOTAL	+3	-1	+3

6.5. Constante de proporcionalidade

A constante de proporcionalidade é utilizada em testes de hipóteses por bioequivalência, visando avaliar a existência de efeitos tóxicos significativos nos testes realizados. Ela evita o aparecimento da interpretação dos resultados tanto dos efeitos estatisticamente significativos, mas não relevantes do ponto de vista biológico, quanto da existência de efeitos adversos porém não detectados (BURATINI e outros, 2002).

O cálculo da DMS crítica, além de ter fornecido a concentração de efeito alternativo, permitiu o cálculo da constante de proporcionalidade (r) para o ouriço *Echinometra lucunter*. Foram utilizados valores de DMS obtidos nos cálculos de testes de hipóteses dos ensaios de toxicidade com efluentes e substâncias químicas realizados no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA, totalizando 55 dados para *E. lucunter*. Tais dados foram ordenados para identificação da DMS crítica, baseada no 75° percentil, o que significa que 75% dos dados de DMS fornecidos são iguais ou inferiores a este valor. Posteriormente, subtraindo-se o valor da DMS crítica de 100, encontramos o r .

O valor da DMS crítica encontrado para os 55 dados fornecidos foi de 7,45%, quando subtraído de 100, obtivemos 92,55% , e portanto, o valor de r para testes de toxicidade com *E. lucunter* foi de 0,93.

Os valores das constantes de proporcionalidade só devem ser comparados quando calculados a partir da seleção do mesmo percentil amostral. Para o 75° percentil foram encontradas as seguintes constantes de proporcionalidades (Tabela 9).

Comparando-se as duas espécies de ouriço *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*, observamos um valor de r bastante aproximado, o que indica que provavelmente as espécies funcionam de forma parecida em relação aos testes de toxicidade.

Tabela 09 - Constantes de proporcionalidade para diversos organismos aquáticos calculadas com base no 75° percentil

Organismo-teste	Tipo de teste	Constante de proporcionalidade (r)	Autores
<i>Daphnia similis</i>	Teste agudo	0,73	BURATINI e outros, 2002
<i>Danio rerio</i>	Teste crônico larval	0,84	BURATINI e outros, 2002
<i>Danio rerio</i>	Teste crônico embriolarval	0,83	BURATINI e outros, 2002
<i>Pimephales promelas</i>	Teste crônico	0,84	DENTON & NORBERG-KING. 1996
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Teste crônico	0,72	BURATINI e outros, 2002
<i>Mytilus spp.</i>	Teste crônico larval	0,71	DENTON & NORBERG-KING. 1996
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Teste crônico de curta duração	0,85	CRUZ, 2003
<i>Lytechinus variegatus</i>	Teste crônico de curta duração	0,88	BURATINI e outros, 2002
<i>Echinometra lucunter</i>	Teste crônico de curta duração	0,93	presente trabalho

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nos testes de toxicidade realizados com os embriões do ouriço do mar *Echinometra lucunter* utilizando as substâncias DSS, Fenol e 4-Clorofenol, concluímos que:

- ◆ Embriões de *E. lucunter* são mais sensíveis à substância 4-Clorofenol do que ao Fenol, uma vez que, sob as mesmas concentrações, o valor de CE_{50-36h} obtido para o Fenol foi mais alto que o obtido para o 4-Clorofenol;
- ◆ O cálculo da CE_{10} pode ser utilizado como concentração alternativa para a expressão de efeitos crônicos em testes ecotoxicológicos com *E. lucunter*, uma vez que o nível de efeito biológico de 10% mostrou-se apropriado para indicar a toxicidade crônica;
- ◆ As cartas-controle de sensibilidade obtidas com as substâncias testadas validam os resultados obtidos com os testes de toxicidade conduzidos com *Echinometra lucunter*

- ◆ Entre as substâncias testadas o 4-Clorofenol apresentou melhor performance como substância de referência nos testes de toxicidade com *Echinometra lucunter*, porém, seguindo a tendência atual da não utilização de substâncias tóxicas ao Homem, a sua utilização não é recomendada, devendo-se priorizar assim, quando possível, outras substâncias menos agressivas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Projeto 00:001.44-044 - Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Crônica de Curta Duração - Método de Ensaio com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) - Água Superficial e Sedimento.** Rio de Janeiro. 2002.

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

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

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Peer Verified Methods Programs. Manual on Policies and Procedures.** Aprovado em 16/11/93.

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

ARRUDA, C. M.; GLUDICE, P. M. & VAROLI, F. M. F. **Análise de amostras de água utilizando-se testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata).** Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. B6-33. p. 62. 2004.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos**. E 1563:98. Philadelphia, PA. 1998.

AU, D. W. T; YURCHENKO, O. V.& REUNOV, A. A. **Sublethal effects of phenol on spermatogenesis in sea urchin (*Anthocidaris crassispina*)**. Environmental Research. V.93. pp. 92-98. 2003.

BADARÓ-PEDROSO, C. **Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas**. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 249p. 1999.

BDT - Base de Dados Tropicais. **Echinodermata Recentes e Fósseis do Brasil**. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/zoologia/echinodermata/echnoideaclass>. Acesso em 12/03/05 às 19:00h.

BEIRAS, R.; VÁZQUEZ, E.; BELLAS, J.; LORENZO, J. I.; FERNÁNDEZ, N.; MACHO, G.; MARIÑO, J. C. & CASAS, L. **Sea-urchin Embryo Bioassay for *in situ* Evaluation of the Biological Quality of Coastal Seawater**. Estuarine, Coastal and Shelf Science. Vol. 52. pp. 29-32. 2001.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae)**. Teste de Doutorado em Saúde Ambiental. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. 117 p. 2000.

BERTOLETTI, E. **Interpretação dos Dados Ecotoxicológicos em Atendimento à Resolução CONAMA 344/04**. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. M7-1. p. 10. 2004.

BERTOLETTI, E. **Aspectos relativos ao controle da sensibilidade de organismos utilizados em ensaios ecotoxicológicos**. Arquivo do WORD. Disponível em: <http://delmonio.ecologia.ufrgs.br/alex/abnt/> Acesso em 03/02/05 às 12:08h.

BONFIM, C. L. L. **Influência do Programa Bahia Azul na Balneabilidade das praias de Salvador-Bahia - 1997 a 2001**. Monografia de Bacharelado. Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia. 2003.

BRIGTH, D. A.; DUSHENKO, W. T.; GRUNDY, S. L & REIMER, K. J. **Effects of local and distant contaminant sources: polychlorinated biphenyls and other organochlorines in bottom-dwelling animals from an Arctic estuary**. The Science of the Total Environment 160/161. pp. 265-283. 1995.

BURATINI, S. V.; PRÓSPERI, V. A. & BERTOLETTI, E. **Levantamento da diferença mínima significativa e sua aplicação ao teste de hipóteses por bioequivalência.** In Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Vol. 7, Resumos, Vitória. P. 376, ref. 71. 2002.

CEBIMAR - Centro de Biologia Marinha. *Echinometra lucunter*. Disponível em: <http://www.usp.br/cbm/artigos/galeria/echinoidea/echinometra.html>. Acesso em 12/04/2005 às 18:15h.

CÉSAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; MYAMOTO, M. K.; ALEGRE, G. F.; PUSCEDDU, F. H. & FEITOSA, M. S. S. **Avaliação ecotoxicológica em sedimentos do sistema estuarino e portuário de Santos e São Vicente - SP.** Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. B5-32. p. 51. 2004.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos.** São Paulo.p. 1-16. 1990a.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Projeto: Desenvolvimento de implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Relatório Anual 1989.** São Paulo.40p. 1990b.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Água do Mar - teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea) Norma Técnica L5.250.** São Paulo. 20p. 1992.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Ficha de Informação de Produto Químico - Dodecil Sulfato de Sódio.** Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=DODECILSULFATO%20DE%20SÓDIO Acesso em 28/06/2005 às 14:12h. 2005a

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Ficha de Informação de Produto Químico - Fenol Soluções.** Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=FEENOL%20SOLUÇÕES Acesso em 28/06/2005 às 10:00h. 2005b

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Ficha de Informação de Produto Químico - Pentaclorofenol.** Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=PEENTAFLOROFENOL Acesso em 28/06/2005 às 10:25h. 2005c

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

CHAPMAN, P. M.; CALDWELL, R. S. & CHAPMAN, P.F. **A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use**. Environ. Toxicol. Chem. Vol 15. pp 77-79. 1996.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA 344/04**. Diário Oficial da União. 2004.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA 357/05**. Diário Oficial da União. 2005.

CRUZ, A. C. **Seleção de Substâncias Orgânicas como Referência em Testes de Toxicidade com Embriões da Ostra *Crassostrea rhizophorae*, GUILDING, 1828: Controle da Qualidade Analítica de Testes Ecotoxicológicos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. 2003.

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

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

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

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

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

GHIRARDINI, A. V.; NOVELLI, A. A.; LIKAR, B.; POJANA, G.; GUETTI, P. F. & MARCOMINI, A. **Sperm Cell Toxicity Test using Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea): Sensitivity and Discriminatory Ability Toward Anionic and Nonionic Surfactants**. Environ. Toxicology and Chemistry. Vol. 20. No.3. pp. 644-651. 2001.

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

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

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

JONCZYK, E.; GILRON, G.& ZAJDLIK, B. **Sea Urchin Fertilization Assay: An Evaluation of Assumptions Related to Sample Salinity Adjustment and Use of Natural and Synthetic Marine Waters for Testing.** Environ. Toxicology and Chemistry. Vol. 20. No.4. pp. 804-809. 2001.

KOBAYASHI, N. **Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals.** Mar. Biol. V.58, pp.163-171. 1980.

KOBAYASHI, N. **Bioassay data for marine pollution using sea urchin eggs, 1984-1989.** Publs Seto Mar. Biol. Lab., v.35, n.6, p.387-415. 1992.

LABIOMAR - Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento. **Protocolo Operacional Padrão nº 019 - Teste de Toxicidade Crônica de Curta Duração - Método de Ensaio com *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea).** Universidade Federal da Bahia. 2005a.

LABIOMAR - Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento. **Protocolo Operacional Padrão nº 012 - Limpeza e Descontaminação de Vidrarias.** Universidade Federal da Bahia. 2005b.

LEE. D. R. **Reference Toxicants in Quality Control of Aquatic Bioassays.** Aquatic Invertebrate Bioassays. ASTM STP 715. A. L. Buikema, Jr., & John Cairns, J., Eds., American Society for Testing and Materials. P. 188-199.1980.

LENTHALL, J. **Phenol.** Disponível em:
http://www.chem.ox.ac.uk/mom/Air_fresh/Phenol.htm Acesso em: 01/06/05 às 14:15h

LIMA, S. N. P.; SANTOS, R. C. A.; SARTI, M. S. & POMPÉIA, S. L. **Processo de Elaboração da Resolução CONAMA 344/04.** Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. F2-5. p. 205. 2004.

LOEZ, C. R.; TOPALIAN, M. L; SALIBIAN, A. **Effects of zinco n the structure and growth dynamics of a natural freshwater phytoplankton assemblage reared in the laboratory.** Environ. Pollut. Vol. 88. p. 275-281. 1995.

LONG, E. R. & CHAPMAN, P. M. **A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound.** Mar. Pollut. Bull. 16 (10): 405-415.1985.

LUIZ, V. E.; KRAUS, L. A. S. & FALKENSTEIN, D. **Avaliação da toxicidade de três fluidos de perfuração, utilizando-se gametas e embriões do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.** Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. B6-122. p. 92. 2004.

MASTROTI, R. R.; De SOUSA, E. C. P. M.& ABESSA, D. M.S. **Toxicidade de Tensoativos Aniônicos sobre Embriões de Ouriço do Mar *Lytechinus variegatus*.** In Moraes, R. et al (eds) Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos. São Paulo: Arte & Ciência Villipress. pp. 207-216. 2001.

MASTROTI, R. R. **Toxicidade e biodegradabilidade de surfactantes anionicos em água do mar.** Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 112 pp. 1997.

MASTROTI, R. R. **Testes de Toxicidade com Gametas de Ouriço-do-mar (Fertilização).** In Nascimento, I. A.; de Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M (eds) Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo: Edt. Artes Gráficas e Industria Ltda. pp. 91-97. 2002.

MAURIN, C. **Aciidental Oil Spill: Biological and Ecological consequences of accidents in French Waters on commercially exploitable living resources.** In: Sheehan, P. J.; Miller, D. R.; Butler, G. C. & Bourdeau, P. H. (eds) Effects of Pollutants at the Ecosystem Level. SCOPE, John Wiley and Sons. p. 311-363. 1984

MÁXIMO, M. V.; SILVEIRA, R. M. & RESGALLA-JUNIOR, C. **Sensibilidade de organismos teste marinhos ao amônio.** Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. B5-20. p. 47. 2004.

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

NASCIMENTO, I. A.; SMITH, D. H.; PEREIRA, S. A & LEITE, M. B. N. L. **Standardization, application and validation biassays methods with embryos of *Crassostrea rhizophorae*, the mangrove oyster for evaluation of tropical estuarine**

and marine waters. International Workshop / Salvador-Bahia-Brasil. Mark (UK) & UFBA. P. 15. 1989.

NASCIMENTO, I. A.; De SOUSA, E. C. P. M. & NIPPER, M. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil.** São Paulo: Edt. Artes Gráficas e Industria Ltda. pp. 99-110. 2002.

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

NIPPER, M. G.; PRÓSPERI, V. A.; ZAMBONI, A. J. **Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos.** Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 50. N.5. p. 646-652. 1993.

NJDHSS - New Jersey Department of Health and Senior Service - **Hoja Informativa sobre Substâncias Peligrosas - 4-Clorofenol.** Trenton, NJ. 1999.

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

OLIVEIRA, L. M. C & BADARÓ-PEDROSO, C. **Aplicação da fase I do estudo de avaliação e identificação da toxicidade (TIE) de um efluente industrial utilizando o teste embriolarval com *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea).** Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. B6-96. p. 83. 2004.

PAIXAO, J. F. **Avaliação da Toxicidade do Fenol e 4-Clorofenol para a microalga *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae, Tetraselmidaceae).** Monografia de Bacharelado. Universidade Federal da Bahia. 2002.

PINTO, R. F. **Determinação da Sensibilidade de *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan, 1912) (Cyprinodontiformes, Rivulidae) para o Sulfato de Cobre, Cloreto de Sódio e Dodecil Sulfato de Sódio através de Testes de Toxicidade.** Dissertação de Bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.

PRÓSPERI, V. A. **Aplicação de estes de toxicidade com organismos marinhos para análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas.** Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 120p. 1993.

PRÓSPERI, V.A. & ARAÚJO, M. M. S. **Teste de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus*, Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea)**. In Nascimento, I. A.; de Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M (eds) **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo: Edt. Artes Gráficas e Indústria Ltda. pp. 99-110. 2002.

PRÓSPERI, V. A. **Avaliação Ecotoxicológica de Sedimentos Marinhos e Estuarinos através da interface sedimento/água**. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2002.

RACHID, B. R. F. **Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos**. Dissertação de mestrado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 110p. 1996.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DÚRAN, N & KUBOTA, L. T. **Biossensores Amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental**. Química Nova. V.24. n.1 pp. 77-86. 2001.

SÁFADI, R. S. **Avaliação da toxicidade de fluidos de perfuração de poços de petróleo e gás para os organismos marinhos *Nysidopsis juniae* (Crustácea, Mysidacea) e *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)**. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 89p. 2001.

SANTOS, M. M. et al. **An *in situ* bioassay for estuarine environments using the microalgae *Phaeodactylum tricorutum***. Environ. Toxicol. Chem. Vol. 21. N.3. pp. 567-574. 2002.

SMITH. D. H. **Banal**. Programa de Computador. 1992.

SOUSA, E.C. P. M. **Toxicologia Marinha: Histórico**. In: Nascimento, I. A.; de Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M (eds) **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo: Edt. Artes Gráficas e Industria Ltda. pp. 9-14. 2002.

SOUSA, E.C. P. M.; ZARONI, L. P.; ABESSA, D. M. S. & GASPARRO, M. R. **Avaliação Ecotoxicológica do sedimento da baía de Todos os Santos, Salvador, Bahia**. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. B5-3. p. 42. 2004.

THORHAUG, A. **Oil Spills in the Tropics and Subtropics**. In Pollution in Tropical Aquatic Systems. Ed. D. W. Connell and D. Hawker. P. 99-127. 1992.

TOMMASI, L.R. **Lista dos Equinóides Recentes do Brasil**. Cont. Inst. Oceanogr. N.11. Universidade de São Paulo. pp. 1-50. 1966

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency. **EPA/440/5-80-066. - Ambient Quality Criteria for phenol**. Cincinnati. 1980.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. **EPA/600/4-91/003 - Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. Cincinnati. 579p. 1991.

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

WIKIPEDIA. **Fenol**.

Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Fenois> Acesso em 21/06/05 20h

ZAMBONI, A. J. **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. 1993.

ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; SOUSA, E. C. P. M.; BICEGO, M. C.; MASTINS, C. C.; SILVA, D. A. M. & RACHID, B. R. **Avaliação ecotoxicológica e de bioacumulação de uma área afetada por derramamento de petróleo no canal de São Sebastião - SP**. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis, SC. Ref. E12/8. p. 193. 2004.