

## VI-135 - ENSAIO DE SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS AQUÁTICOS EM RELAÇÃO A CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE AMOSTRAS E DE ENSAIO

**Sarah Sasaki Jurkevicz<sup>(1)</sup>**

Engenheira Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Mestranda em Engenharia de Edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina (UEL).

**Emily Giany Assunção<sup>(3)</sup>**

Engenheira Civil pela Universidade do Oeste Paulista. Mestra em Engenharia de Edificações e Saneamento pela UEL. Doutoranda em Engenharia Civil pela UEL.

**Cassia Reika Takabayashi Yamashita**

Farmacêutica pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Doutora em Ciência de Alimentos (UEL). Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UEL.

**Aline Domingues Batista<sup>(4)</sup>**

Química pela UEL. Mestra em Engenharia de Edificações e Saneamento pela UEL. Doutoranda em Físico-Química pelo programa multicêntrico UEL-UEPG-Unicento.

**Mariane Liborio Cardoso<sup>(2)</sup>**

Engenheira Ambiental pela UTFPR. Mestranda em Engenharia de Edificações e Saneamento pela UEL.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, s/n - Campus Universitário - Londrina - PR – CEP: 86057-970 - Brasil - Tel: (43) 3371-5826 - e-mail: [sarah.jurkevicz@hotmail.com](mailto:sarah.jurkevicz@hotmail.com)

### RESUMO

Ensaio com organismos aquáticos tem sido incluídos nas recentes atualizações das legislações relacionadas ao controle da qualidade do meio aquático e podem ser utilizados como instrumento para avaliar a toxicidade de substâncias químicas, presentes no ambiente. Alguns parâmetros físico-químicos da amostra, bem como determinadas condições de ensaio não são especificadas nas normas relacionadas aos ensaios e podem interferir na sensibilidade dos organismos-teste a uma amostra. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de fatores físicos e químicos: % de diluição da amostra, valores de pH, uso de tampão e substância referência (dicromato de potássio e cloreto de sódio), na sensibilidade dos organismos-teste, por meio de ensaios ecotoxicológicos agudos. Os organismos estudados foram a *Artemia salina*, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, os ensaios seguiram as diretrizes das respectivas normas. Os resultados indicaram apenas para *A. salina*, a necessidade de se manter 4% da água de cultivo na amostra-teste. Em relação aos ensaios com variação de pH, os organismos-teste mostraram ser sensíveis a valores de pH ácido (de 4,0 a 5,5). No entanto, a adição de tampão a 10% foi capaz de neutralizar os possíveis efeitos de imobilidade/letalidade e viabilizar os ensaios. As concentrações de referência para o dicromato de potássio resultaram em 0,625; 5,0 e 175,0 mg.L<sup>-1</sup> para os organismos *C. dubia*, *D. magna* e *A. salina*, respectivamente. Para o cloreto de potássio, a *A. salina* não foi sensível para as concentrações utilizadas (até 15 g.L<sup>-1</sup>) e a concentração de referência para *D. magna* foi de 8,0 g.L<sup>-1</sup>.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ecotoxicidade, microcústeos, parâmetros físico-químicos.

### INTRODUÇÃO

Os ensaios com organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados como instrumento para avaliação de toxicidade aguda e crônica de substâncias químicas, presentes em efluentes industriais e domésticos, lixiviados, águas superficiais e marinhas. Esses ensaios são utilizados em atividade de monitoramento de qualidade de águas e efluentes, como em estudos de avaliação de risco de substâncias químicas no meio ambiente (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006). A avaliação de toxicidade real ou potencial do efluente tratado aos organismos aquáticos do corpo receptor é um dos parâmetros prescritos no CONAMA 430 de 2011.

Dentre os organismos utilizados em ensaios de ecotoxicidade estão os crustáceos de água doce da ordem *Cladocera* e gênero *Daphnia* e *Ceriodaphnia*. Estes organismos são amplamente distribuídos nos corpos de água, possuem um ciclo de vida curto e são facilmente cultivados em laboratório. A *Daphnia magna* é um consumidor primário e se alimenta de fitoplâncton e de matéria orgânica. Este microcústeo exerce um

importante elo entre os níveis inferiores e superiores da cadeia alimentar, exercendo um papel fundamental na comunidade zooplanctônica (MENDES, 2004).

Dentro da classe de microcrustáceos de água salina, a *Artemia salina* é uma espécie bastante utilizada nos ensaios de ecotoxicidade. O uso dessa espécie nos ensaios de ecotoxicidade é interessante quando se pretende avaliar a toxicidade de efluentes que apresentam alta salinidade, porque este parâmetro é um fator crítico para as espécies de água doce (COSTA *et al.*, 2008).

Como em qualquer outro método de análise, os ensaios ecotoxicológicos apresentam variabilidade nos resultados obtidos. A variabilidade pode ser atribuída dentre outros fatores, à habilidade dos técnicos na execução dos ensaios, à possíveis variações das condições abióticas mantidas durante a realização do ensaio e à variabilidade intrínseca da sensibilidade do lote de organismos-testes (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006).

Os fatores bióticos que influenciam no resultado do ensaio ecotoxicológico são relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos. Já os principais fatores abióticos que podem interferir nos resultados e que devem ser monitorados durante o ensaio são pH, oxigênio dissolvido, temperatura e dureza da água (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006).

A qualidade do ensaio de ecotoxicidade é aferida pelo controle de sensibilidade dos organismos, através da realização periódica de ensaios com determinadas substância de referência (ENVIRONMENT CANADA, 1992). O uso de substâncias de referência em ensaios ecotoxicológicos é um procedimento rotineiro que garante a qualidade analítica dos ensaios de toxicidade aguda e crônica. As substâncias de referência são utilizadas para avaliar as condições de sensibilidade dos organismos-teste. São também utilizadas em pesquisas básicas com organismos aquáticos para definir condições essenciais de ensaio para cada espécie. Depois de estabelecidas as condições ótimas de ensaio, é possível obter resultados comparáveis, que apresentem boa repetibilidade e reprodutibilidade (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006).

Buratini-Mendes (2002) realizou teste de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia*, utilizando como substâncias de referência o dicromato de potássio. A autora identificou que um interferente do ensaio foi a água de diluição utilizada. Werner e Buratini (2002) também relataram a interferência da água de diluição no teste de sensibilidade aguda do microcrustáceo *D. similis* ao dicromato de potássio. No estudo foi analisado a variação das condições de cultivo, água de diluição e dieta diferenciada dos organismos. As autoras observaram que, independentemente do meio de cultivo, os organismos apresentaram sensibilidade semelhantes quando se utilizou o mesmo tipo de água de diluição. Este estudo confirmou que a água de diluição é um fator determinante na avaliação da toxicidade do dicromato de potássio.

O objetivo dos ensaios de ecotoxicidade é determinar a concentração do agente químico que causa ou não, efeito sobre os organismos-teste durante um intervalo de tempo determinado. Nos ensaios de ecotoxicidade aguda procura-se estimar a concentração da substância-teste que causa efeito a 50% da população exposta, durante um período de tempo que varia entre 0 a 92 horas. Tal concentração pode corresponder à concentração efetiva (CE50) ou concentração letal mediana (CL50), obtidas a partir de número de organismos-teste vivos e de mortos. Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo e normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a anteceda, como o estado de imobilidade em invertebrados (GELBER *et al.*, 1985).

Existem diferentes métodos estatísticos para estimar a CE50 ou CL50 e o intervalo de confiança associado. Dentre os métodos não paramétricos, tem-se o método Trimmed-Spearman-Karber. Nesse método o analista deve definir um valor ( $\alpha$ ) na faixa de  $0 \leq \alpha \leq 50$  para indicar a porcentagem de valores a serem eliminados em cada extremidade da distribuição da tolerância antes de efetuar o cálculo de CL50. Assim, os dados de concentração/efeito são ajustados e alguns eliminados, antes da realização do teste estatístico (USEPA, 2002). Os valores de sensibilidade CL50 encontrados para o dicromato de potássio para a *D. similis* e *D. magna* são semelhantes, sendo  $0,11 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente (CETESB, 1980). Segundo os ensaios de sensibilidade de Fraga e Brentano (2011) realizados com *D. magna*, a CL50 da substância de referência dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) foi de  $0,84 \text{ mg.L}^{-1}$  com um intervalo de  $0,4$  a  $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Por isso cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de sensibilidade CL50 porque eles podem variar de acordo com os procedimentos de manutenção dos organismos e realização dos ensaios ecotoxicológicos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência das condições físico-químicas de amostras como valores de pH e adoção do uso de tampão e de ensaio como % de diluição da amostra e uso de substâncias de referência para controle positivo (dicromato de potássio e cloreto de sódio), na sensibilidade dos organismos-teste, por meio de ensaios de ecotoxicidade aguda.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Ensaio de ecotoxicidade em relação à % de diluição das amostras

Estes ensaios de sensibilidade foram realizados para estimar a % máxima de diluição volumétrica das amostras ou % mínima de água de cultivo a ser mantida para sobrevivência dos organismos-teste durante os ensaios, uma vez que, as normas de referência não mencionam tais porcentagens. Para realização dos ensaios, a água de cultivo específica para cada organismo foi diluída com água ultrapura. Para os organismos-teste *C. dubia* e *A. salina*, a diluição variou de 80 a 100%, com 11 valores intermediários na razão de 1,025. Para a *D. magna* a diluição variou de 84% a 100%, com 5 valores intermediários na razão de 1,045.

### Ensaio de ecotoxicidade em relação ao valor de pH das amostras

Para cada organismo existe uma faixa de pH ótima de cultivo/ensaio estabelecida por suas respectivas normas: de 5,0 a 9,0 para *C. dubia* e *D. magna* e de  $8,0 \pm 0,5$  para *A. salina*. No entanto, amostras de efluentes industriais ou submetidos ao tratamento físico-químico comumente apresentam valores de pH que não se enquadram a estas faixas, o que requer a avaliação cuidadosa em relação a este parâmetro e a sobrevivência dos organismos a fim de garantir a correta interpretação dos resultados em relação à toxicidade real da amostra. Assim, foi realizado o ensaio de sensibilidade com variação do pH entre 4,0 a 9,0, utilizando a própria água de cultivo com adição de soluções de ajuste (0,2 M) de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl).

### Ensaio de ecotoxicidade com adição de tampão nas amostras

Considerando a diversidade dos valores de pH das amostras e a dificuldade de se realizar o ajuste do pH concorrendo para a diluição das mesmas em % excessivas e para inviabilização dos ensaios, optou-se pela avaliação da adição de tampão nas amostras.

Assim, foram preparadas amostras utilizando a própria água de cultivo com valores extremos de pH variando entre 3,0 e 10,0 para *C. dubia* e *A. salina* e entre 4,0 e 9,0 para *D. magna*, ajustados previamente com soluções (0,2 M) de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl). Em seguida, adicionou-se tampão fosfato de Sorensen (pH = 7,0) nas amostras e na água de cultivo (controle negativo) limitando-se a % volumétrica a 10%.

### Ensaio de ecotoxicidade às substâncias de referência para controle positivo

Para realização dos ensaios de sensibilidade foram utilizadas as substâncias de referência: dicromato de potássio, devido à ampla utilização e cloreto de sódio por ser considerada uma substância menos poluente ao ambiente. Desta forma foram empregadas diferentes faixas de concentração para cada organismo em função de dados da literatura e ensaios preliminares.

Para o organismo *C. dubia*, as concentrações de dicromato de potássio variaram de 0,0195 a 1,25 mg.L<sup>-1</sup>, com 6 valores intermediários. Para o organismo-teste *D. magna*, as concentrações de dicromato de potássio variaram de 0,625 a 10 mg.L<sup>-1</sup>, com 8 valores intermediários. Já para o organismo-teste *A. salina*, as concentrações de dicromato de potássio variaram de 25 a 200 mg.L<sup>-1</sup>, com 8 valores intermediários.

Para o organismo-teste *C. dubia*, as concentrações de NaCl variaram de 1,0 a 3,0 g.L<sup>-1</sup>, com 9 valores intermediários. Para o organismo-teste *D. magna*, as concentrações de NaCl variaram de 1,75 a 8,0 g.L<sup>-1</sup>, com 8 valores intermediários. As concentrações de NaCl para o organismo *A. salina* variaram de 2,5 a 15,0 g.L<sup>-1</sup>, com 6 valores intermediários.

### Ensaio de ecotoxicidade com organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*

Os indivíduos da espécie *C. dubia* utilizados nos ensaios de sensibilidade foram obtidos, conforme diretrizes da norma ABNT (2010), a partir de cepas mantidas no Laboratório de Saneamento da UEL. A dieta fornecida

aos organismos era composta pela suspensão algácea de *P. subcapitata* com concentração de  $3 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup> org.L<sup>-1</sup> e alimento composto constituído de levedura (fermento biológico seco dissolvido em água deionizada) e ração de peixe Tetramim fermentada (na proporção de 1:1) para uma concentração de 1 mL.L<sup>-1</sup>.

Para o ensaio foram utilizadas neonatas entre 6 a 24 horas de vida, obtidas de fêmeas com idade entre 7 e 21 dias. Para controle negativo utilizou-se a água de cultivo e com exceção dos ensaios realizados com as substâncias de referência, foi utilizado o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) como controle positivo na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup>. Para cada amostra e controle foram utilizados 20 organismos, distribuídos em 4 replicatas ou poços com volume de 10 mL e 5 organismos cada, em placa de cultivo celular de polipropileno.

Durante os ensaios os organismos foram mantidos na temperatura de 23°C ± 1 por 24 horas ao abrigo de luz e sem alimento. Após o período de exposição de 24 horas foi registrado o número de organismos mortos e imóveis em estereoscópio (Motic-SMZ140 FBLED). Os resultados foram expressos como concentração efetiva mediana da amostra que causa efeito a 50% da população exposta após 24 horas – CE50<sub>24h</sub> obtidas por cálculo estatístico utilizando o programa Trimmed-Spearman-Karber com intervalo de confiança de 95% (HAMILTON *et al.*, 1977). O ensaio foi considerado validado quando a porcentagem de organismos imóveis ou mortos no controle negativo resultou inferior a 20% (ABNT, 2009).

### **Ensaio de ecotoxicidade com organismo-teste *Daphnia magna***

Os indivíduos da espécie *D. magna* utilizados nos ensaios de sensibilidade foram obtidos, conforme diretrizes da norma ABNT (2009), a partir de cepas mantidas no Laboratório de Saneamento da Universidade Estadual de Londrina. A dieta fornecida aos organismos era composta pela suspensão algácea de *P. subcapitata* na concentração de  $3 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup> org.L<sup>-1</sup>, alimento composto constituído de levedura (fermento biológico seco dissolvido em água deionizada) e ração de peixe Tetramim fermentada (na proporção de 1:1) para uma concentração de 1 mL.L<sup>-1</sup>.

Foram utilizados organismos jovens de 2 a 26 horas de idade, obtidos por partenogênese de fêmeas com idade entre 10 e 60 dias. Para controle negativo utilizou-se a água de cultivo e com exceção dos ensaios realizados com as substâncias de referência, foi utilizado o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) como controle positivo na concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>. Para cada amostra e controle foram utilizados 20 organismos, distribuídos em 4 replicatas ou poços com volume de 10 mL e 5 organismos cada, em placa de cultivo celular de polipropileno.

Durante os ensaios os organismos foram mantidos na temperatura de 23°C ± 1 por 24 horas ao abrigo de luz e após o período de exposição de 24 horas foi registrado o número de organismos mortos e imóveis. Os resultados foram expressos como concentração efetiva mediana da amostra que causa efeito a 50% da população exposta após 24 horas – CE50<sub>24h</sub> obtidas por cálculo estatístico utilizando o programa Trimmed-Spearman-Karber com intervalo de confiança de 95% (HAMILTON *et al.*, 1977). O ensaio foi considerado validado quando a porcentagem de organismos imóveis ou mortos no controle negativo resultou inferior a 10% (ABNT, 2009).

### **Ensaio de ecotoxicidade com organismo-teste *Artemia salina***

Para o ensaio de ecotoxicidade os ovos de *A. salina* foram incubados conforme a norma PETROBRAS N-2588 de 1996. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 10 mL, em triplicata, para cada uma das concentrações das amostras, com volume total de 5 mL de amostra por tubo. O controle negativo foi realizado com solução salina artificial e o controle positivo com a solução de dicromato de potássio em meio salino com concentração de 0,2 g.L<sup>-1</sup>.

Para cada diluição das soluções-teste foram adicionados 10 náuplios de *A. salina* por tubo e foram mantidos sob iluminação e temperatura entre 25°C a 30°C por 24 horas. Após a exposição de 24 horas, o número de organismos vivos e mortos em cada tubo foi quantificado para determinação da concentração da amostra que causou mortalidade de 50% dos organismos – CL50<sub>24h</sub>, obtida por cálculo estatístico utilizando o programa Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON *et al.*, 1977) com intervalo de confiança de 95%.

O teste foi considerado validado quando não evidenciado percentual de mortalidade superior a 10% dos organismos no controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio de ecotoxicidade em relação à % de diluição das amostras

Os ensaios de ecotoxicidade, demonstraram que para os organismos *C. dubia* e *D. magna*, o uso de volume correspondente a 100% da amostra (água ultrapura sem adição de água de cultivo) não influenciou significativamente na sobrevivência dos mesmos. Os ensaios de diluição para o organismo *A. salina* mostraram a necessidade de se manter no mínimo uma porcentagem da solução salina nos ensaios, embora a norma Petrobras N-2588 (PETROBRAS, 1996) fale em preparos de soluções-teste nas concentrações de 1% a 100% V.V<sup>-1</sup>. No ensaio realizado, a concentração de 96% de água ultrapura resultou na mortalidade de 10% dos organismos e a concentração de 100% de água ultrapura, na mortalidade de todos os organismos-teste.

Conforme a Figura 1, a concentração letal mediana - CL50, que expressa a concentração do agente tóxico que causa letalidade em 50% dos organismos-teste, foi de 98,6% de água ultrapura para a *A. salina*. Embora nenhuma menção seja feita em relação à necessidade de manutenção de porcentagem volumétrica mínima de água de cultivo para garantir a sobrevivência dos organismos, os resultados indicaram que apenas para a *A. salina*, há necessidade de se manter no mínimo 4% da água de cultivo.

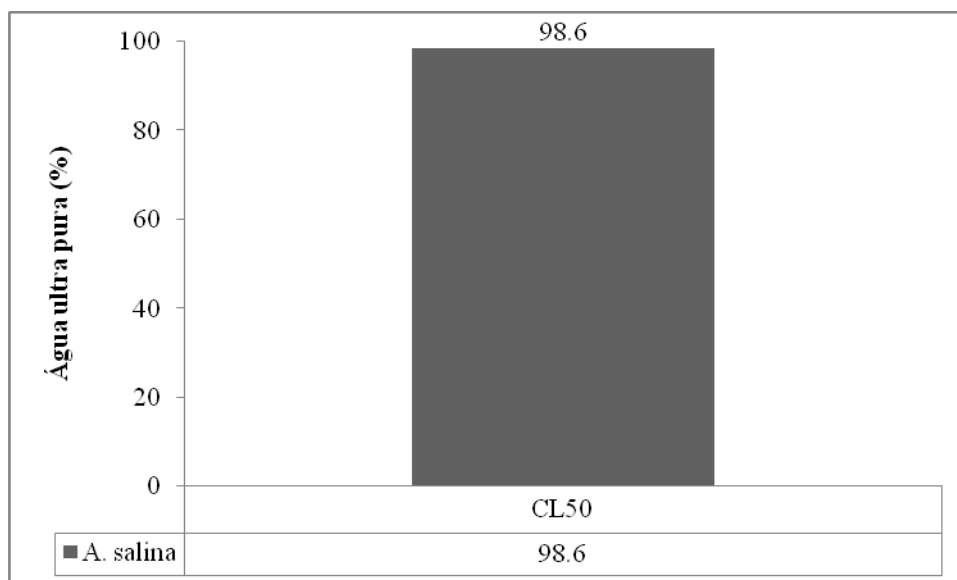


Figura 1. Valor de CL50<sub>24h</sub> (% v v<sup>-1</sup>) obtido no ensaio de ecotoxicidade com o organismo-teste *A. salina* em relação à % de diluição das amostras

### Ensaio de ecotoxicidade em relação ao valor de pH das amostras

Em relação aos ensaios com variação de pH (entre 4,0 e 9,0), todos os organismos-teste mostraram ser sensíveis a valores de pH ácidos. Os ensaios de variação de pH da amostra para o organismo *C. dubia* na faixa de 4,5 a 9,0 não apresentaram mortalidade dos organismos-teste, comprovando que valores correspondentes à faixa estabelecida pela norma ABNT (2010) (5,0 a 9,0) não interferem no resultado do ensaio. Para a amostra de pH 4,0 a mortalidade dos organismos-teste foi de 100%, evidenciando, neste caso, a necessidade de ajuste de pH para a realização de ensaios. Para o organismo *D. magna*, observou-se que apenas o pH 4,0 apresentou mortalidade significativa em 60% dos organismos teste, comprovando assim a faixa recomendada pela norma (5,0 a 9,0) para eliminar interferências no resultado do ensaio. Para *A. salina* valores compreendidos na faixa de pH entre 6,0 e 9,0 não apresentaram mortalidade dos organismos-teste, sendo que na faixa entre 4,0 e 5,5 resultaram em mortalidade superior a 10%.

### Ensaio de ecotoxicidade com adição de tampão nas amostras

Para todas as amostras, a adição de tampão fosfato de Sorensen (pH = 7,0) a 10% foi capaz de ajustar os valores de pH das amostras para 7,0±1,0.

Nos ensaios realizados com o organismo-teste *D. magna* observou-se que para as faixas de pH inicial entre 4,0 e 9,0 com adição de tampão a 10%, não houve mortalidade significativa superior a 10% dos organismos-teste. Já para os organismos *C. dubia* e *A. salina*, os ensaios de variação do pH na faixa de 3,0 a 10,0, com adição de tampão na proporção de 10% do volume da amostra, não apresentaram mortalidade acima de 20 e 10%, respectivamente. Portanto, pôde-se constatar que para as amostras com pH não enquadradas na faixa recomendada de 5,0 a 9,0 para *C. dubia* e de 6,0 a 9,0 obtida para *A. salina*, a adição de tampão a 10% (v v<sup>-1</sup>) foi capaz de neutralizar os efeitos de imobilidade/letalidade, viabilizando desta forma os ensaios.

### Ensaio de ecotoxicidade às substâncias de referência para controle positivo

Os ensaios de sensibilidade ao dicromato de potássio realizados com *C. dubia* evidenciaram que este organismo-teste é muito mais sensível às substâncias tóxicas, uma vez que o valor de CE50<sub>24h</sub> resultaram bem inferiores comparados aos obtidos para os demais organismos-teste. Os ensaios foram realizados na faixa de 0,0195 a 1,25 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que os organismos apresentaram efeito agudo significativo somente a partir da concentração de 0,3125 mg.L<sup>-1</sup> e mortalidade total para a concentração de 0,625 mg.L<sup>-1</sup>. Conforme ilustra a Figura 2, o valor de CE50<sub>24h</sub> para o dicromato de potássio foi de 0,38 mg.L<sup>-1</sup>.

Os ensaios de sensibilidade ao dicromato de potássio para o organismo *D. magna* foram realizados nas concentrações de 0,625 a 10 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que a partir da concentração de 1,25 mg.L<sup>-1</sup> houve mortalidade significativa dos organismos-teste. Através do programa Trimmed Spearman-Kärber obteve-se o valor CE50<sub>24h</sub> de 2,82, conforme a Figura 2.

Os ensaios de sensibilidade ao dicromato de potássio com o organismo-teste *A. salina* foram realizados na faixa de 25 a 200 mg.L<sup>-1</sup>. A partir da concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu mortalidade superior a 10% dos organismos-teste. A concentração letal a 100% dos organismos foi de 175 mg.L<sup>-1</sup>. Conforme a Figura 2, o valor CL50<sub>24h</sub> foi 76,94 mg.L<sup>-1</sup>, evidenciando que *A. salina* é muito mais resistente a essa substância de referência se comparada com os demais organismos.

Os ensaios de sensibilidade, utilizando como substância de referência o cloreto de sódio, com o organismo-teste *C. dubia* foram realizados para concentrações de 1,0 a 3,0 g.L<sup>-1</sup>. A concentração inicial que causou mortalidade significativa (superior a 20%) aos organismos-teste foi de 2,1 g.L<sup>-1</sup>, sendo que a concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup> causou mortalidade a 84,2% dos organismos-teste, por isso, novos ensaios deverão ser realizados com concentrações de cloreto de sódio superiores à máxima utilizada no presente ensaio. Mesmo sem a concentração de cloreto de sódio que causa 100% de letalidade aos organismos-teste – CL100<sub>24h</sub>, foi possível obter a CE50<sub>24h</sub> 2,23 g.L<sup>-1</sup>, conforme a Figura 2.

Para o organismo *D. magna*, as concentrações utilizadas nos ensaios de sensibilidade da substância cloreto de sódio variaram de 1,75 a 8,0 g.L<sup>-1</sup>. A partir da concentração de 6,0 g.L<sup>-1</sup> houve mortalidade significativa (superior a 10%) dos organismos-teste, sendo que a concentração de 8,0 g.L<sup>-1</sup> resultou na mortalidade de 100% dos organismos. O valor calculado de CE50<sub>24h</sub> foi de 6,83 g.L<sup>-1</sup>, conforme ilustra a Figura 2.

Os ensaios de sensibilidade ao cloreto de sódio realizados com os organismos *A. salina* não tiveram resultados conclusivos na faixa de concentrações utilizadas de 2,5 a 15 g.L<sup>-1</sup>, pois não houve mortalidade em 100% dos organismos-teste mesmo para a máxima concentração. Por serem organismos de ambiente salino, estes possuem maior resistência à presença de sais no meio, como era esperado. Portanto, o cloreto de sódio não é indicado como uma substância de referência a ser utilizado como controle positivo em ensaios de ecotoxicidade para a *A. salina*.

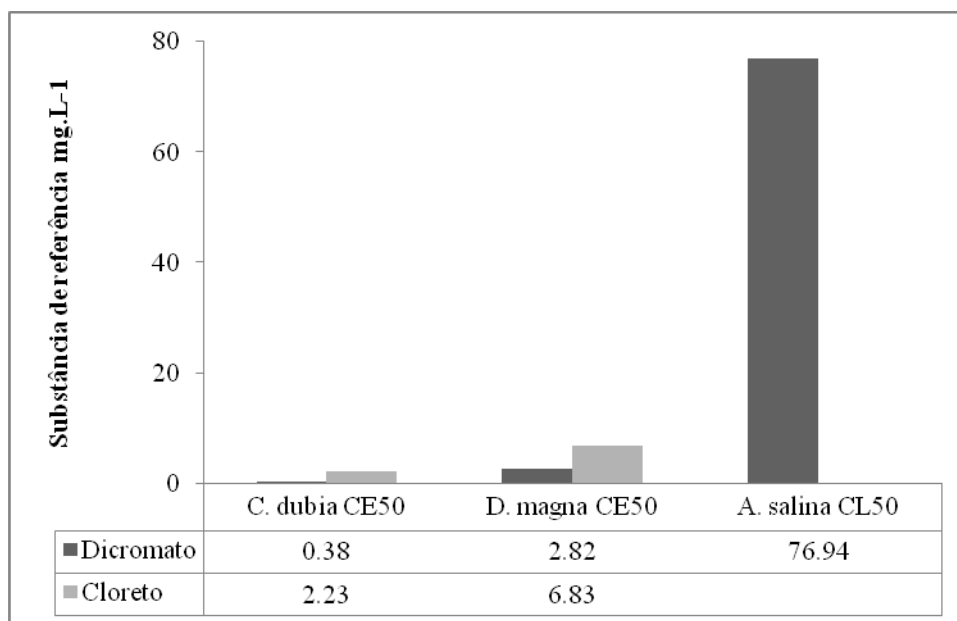


Figura 2. Ensaio de sensibilidade com a substância de referência dicromato de potássio ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e cloreto de sódio ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

## CONCLUSÕES

A partir dos ensaios de ecotoxicidade concluiu-se que:

- As condições físico-químicas da amostra e do ensaio podem interferir nos resultados de toxicidade de outras substâncias, o que requer a avaliação criteriosa a fim de garantir a correta interpretação dos resultados em relação à toxicidade real da amostra;
- Os resultados indicaram que apenas *A. salina* requer a manutenção de 4% da água de cultivo na amostras-teste;
- Em relação aos ensaios com variação de pH, os organismos-teste mostraram ser sensíveis a valores de pH ácido (de 4,0 a 5,5) e que a adição de tampão a 10% foi capaz de neutralizar os possíveis efeitos de imobilidade/letalidade e viabilizar os ensaios.
- As concentrações de referência CE e CL100<sub>24h</sub> para o dicromato de potássio resultaram em 0,625; 5,0 e 175,0  $\text{mg.L}^{-1}$  para os organismos *C. dubia*, *D. magna* e *A. salina*, respectivamente. Para o cloreto de sódio, a *A. salina* não foi sensível às concentrações utilizadas (até 15  $\text{g.L}^{-1}$ ) e a CL100<sub>24h</sub> para *D. magna* foi de 8,0  $\text{g.L}^{-1}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). NBR 12648. Rio de Janeiro, 2011.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphniaspp (Crustacea, Cladocera). NBR 13373. Rio de Janeiro, 2010.
3. BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução no 430 de 13 de maio de 2011. Complementa e altera a Resolução nº 357 de 2005, Brasília, 2011.
4. BURATINI-MENDES, S.V. Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de Ceriodaphnia dubia. Dissertação apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos, USP. 88P. 2002.
5. CETESB. Programa Bioensaios. Relatórios de Atividades 1980. CETESB, São Paulo, Relatório Técnico, 55p e anexos. 1980.
6. COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química. Nova, v.31, n.07, 2008.

7. ENVIRONMENT CANADA. Biological test methods: test of reproduction and survival using thaecladoceran Ceriodaphniadubia. Report EPS 1/RM/21. Environment Canada, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario. 72 p. 1992.
8. GELBER, R.D.; LAVIN, P.T.; MEHTA, C.R.; SCHOENFELD, D.A. Statistical Analysis. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology. G.M. Rand and S.R.Petrocelli Eds. 110-123 p. 1985.
9. HAMILTON, M., A., 1986. Statistical analysis the cladoceranreprodutivity test. Environmenttoxicologyandchemistry. 5:205-212
10. MENDES, J.C. Caracterização dos efluentes líquidos, em termo de ecotoxicidade, gerados na disposição de RSU nos aterros do entorno de Criciúma – SC. Monografia (Graduação em curso de Engenharia Ambiental). Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2004.
11. PETROBRÁS N-2588: Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à Artemiasp. CONTEC - Comissão de normastécnicas, 1996.
12. USEPA. Short-term methods for estimating the toxicity of affluent and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5th Ed. EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. 2002.
13. WERNER, L.I.; BURATINI, S.V. Sensibilidade de Daphniasimilis: efeitos da dieta e da água de cultivo/diluição. Resumos VIII ECOTOXI, Vitória, ES. 2002.
14. ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações. Editora Rima,Sao Carlos. 2006. 464p.