

A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA NO BIOMONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

Danielly de Paiva Magalhães^{1} & Aloysio da Silva Ferrão Filho¹*

¹Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Pavilhão Lauro Travassos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, CEP: 21040-360. Rio de Janeiro, Brasil.

* E-mail: daniellypaiva@uol.com.br

RESUMO

A Ecotoxicologia Aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos. Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos, a partir da obtenção de curvas concentração-efeito e concentração-resposta, bem como na detecção de ecotoxicidade em ambientes impactados. A inserção dos ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes. Portanto, o objetivo desta revisão foi demonstrar a viabilidade de testes ecotoxicológicos tradicionais para o biomonitoramento de ambientes aquáticos dulcícolas, bem como apontar suas vantagens e limitações. Dentro deste contexto, foram abordadas as características dos organismos bioindicadores que devem ser consideradas para a aplicação em bioensaios e a melhor forma de analisar suas respostas frente a uma exposição tóxica. Este trabalho, além de descrever os métodos tradicionais, também discute uma metodologia relativamente nova, o Sistema de Biomonitoramento Automático em Tempo Real, que utiliza organismos sentinelas na detecção de alterações comportamentais ou fisiológicas durante a exposição ao contaminante ou fonte de poluição. Essa é uma metodologia bastante eficiente, pois os organismos são capazes de detectar concentrações subletais de agentes tóxicos, funcionando como verdadeiros 'biosensores' da qualidade da água. Embora a avaliação ecotoxicológica seja uma ferramenta de suma importância para a análise da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos, são poucas as exigências da legislação brasileira com relação à ecotoxicidade de despejos de fontes poluidoras. Apenas alguns estados brasileiros, como Santa Catarina e Paraná, possuem legislação específica determinando fatores de toxicidade permitidos para cada tipo de despejo. Em suma, a Ecotoxicologia dispõe de ferramentas bastante eficientes que devem ser aplicadas segundo critérios específicos de qualidade da água e tipo de contaminação a ser avaliada.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, testes ecotoxicológicos, toxicidade aguda, toxicidade crônica, biomonitoramento automático.

ABSTRACT

ECOTOXICOLOGY AS A TOOL TO MONITORING AQUATIC ECOSYSTEMS. Aquatic Ecotoxicology is a science created to solve problems with water contamination by toxic compounds. The analytical framework employed is capable of predicting biological responses to the toxicity of chemical compounds through concentration-effect and concentration-response curves, and also enables evaluating the ecotoxicity of disturbed environments. Employing ecotoxicological assays in environmental evaluations is germane, as some factors are not assessed through abiotic variables, e.g. the bioavailability and interactions between pollutants effects. The aim of this review was to demonstrate the suitability of traditional ecotoxicological tests for biomonitoring freshwater ecosystems, while listing the pros and cons of this approach. This way, we described desirable characteristics of bioindicators that should be considered for the application in ecotoxicological bioassays and the best way of analyzing their responses from exposure to toxics. Moreover, the present review also discusses a recent method known as Real-Time Automated Biomonitoring Systems, which makes use of sentinel organisms in trying to detect behavior or physiological alterations derived from exposure to

contaminants or pollutants. The method is efficient, because the sentinel organisms enable detecting sublethal concentrations of the toxic agents, thus working as true 'biosensors' of water quality. Although ecotoxicology evaluation is of prime importance in analysing the environmental health of aquatic ecosystems, Brazilian legislation cares little for the ecotoxicity of pollutant discharges. Only in some Brazilian States, like Santa Catarina and Paraná, present specific official rules stating accepted toxicity factors to each kind of discharge. In summary, ecotoxicology provides efficient analytical tools that should be used following specific criteria according with the water quality and kind of contamination to be evaluated.

Keywords: Ecotoxicology, ecotoxicological tests, acute toxicity, chronic toxicity, automated biomonitoring.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as respostas dos organismos vivos a diferentes tipos de estresse têm sido utilizadas para avaliar a qualidade do meio em que vivem. Há relatos de que Aristóteles (384-322 a.C.), considerado o pai da biologia, submeteu peixes de água doce à água do mar para estudar suas reações. O primeiro teste de toxicidade com organismos aquáticos que se tem notícia foi realizado em 1816 com insetos aquáticos (Buikema & Voshell 1993)

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut (Truhaut 1977). Segundo este autor, a Ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (Plaa 1982, Cairns & Niederlehner 1995 Apud. Zagatto & Bertolletti 2006). Ramade (1977) publicou o primeiro livro de Ecotoxicologia, definindo-a como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera. Deste modo, a Ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos. Portanto, é uma ciência com objetivo próprio de estudo (o fenômeno da intoxicação ambiental em todas as suas nuances e consequências), com finalidade (impedir e prevenir determinada intoxicação ou saber como interrompê-la,

revertê-la e remediá-la) e com método (Azevedo & Chasin 2003).

Na década de 80, as agências ambientais no mundo todo, principalmente nos EUA e na Europa, começaram a desenvolver protocolos padronizados de testes de toxicidade utilizando organismos aquáticos (USEPA 1996, 2002, OECD 1984-2004). O chamado "*Clean Water Act*" foi uma espécie de marco regulatório que deu a Agência de Proteção Ambiental Americana a autoridade para implantar programas de controle da poluição, incluindo padrões de qualidade de efluentes industriais assim como requerimentos para a fixação de padrões de qualidade da água para todos os contaminantes de águas superficiais. Em 1984, a USEPA estabeleceu o uso de organismos para fins de monitoramento da qualidade da água, o chamado 'Monitoramento Biológico' ou, simplesmente, 'Biomonitoramento' (USEPA 1984). Ao mesmo tempo, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), na Europa, lançava uma série de protocolos de testes com organismos aquáticos como algas, microcrustáceos e peixes (OECD Guidelines 201, 202, 203, respectivamente).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água, têm se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil. A primeira iniciativa em termos metodológicos se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization (ISO)*, com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (Zagatto & Bertolletti 2006). A partir de 1975, foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração,

utilizando alguns grupos e espécies de organismos, dentre os quais se destacam as algas (ABNT 1992, CETESB 1994), microcrustáceos (ABNT 1993, CETESB 1994) e peixes (CETESB 1990, ABNT 2004) de águas continentais e marinhas e testes com sedimentos (Zagatto & Bertoletti 2006).

Cabe ressaltar que o objetivo principal da Ecotoxicologia foi sempre a análise custo-benefício no processo de produção de bens de consumo, onde o problema é minimizar os custos da produção tanto quanto os efeitos da poluição química causada por esta produção nos seres humanos. Para isto, foram desenvolvidos protocolos padrão para avaliar os efeitos de substâncias químicas e misturas tóxicas sobre os organismos. A pressão da opinião pública, principalmente durante a década de 70, foi a mola propulsora dos avanços na área da Toxicologia Ambiental e da Ecotoxicologia. A pressão sobre as indústrias potencialmente poluidoras para resolver problemas práticos rapidamente norteou, de certo modo, a pesquisa nesta área, levando a uma abordagem mais pragmática. Atendendo esta demanda das indústrias em satisfazer a opinião pública, as agências de proteção ambiental, principalmente nos EUA e Europa, começaram então a desenvolver os primeiros protocolos padronizados de testes de toxicidade, utilizando espécies nativas daqueles países. Como veremos adiante, embora a padronização implique na vantagem de se tornar os resultados comparáveis, a utilização destes testes rotineiramente fornece bons exemplos para ilustrar que a padronização de experimentos, sem uma base científica sólida, na realidade, impede o desenvolvimento desta base. Portanto, os aspectos aplicados (*i.e.* avaliação de risco, análise de custo), muito mais do que os aspectos científicos, controlaram a pesquisa experimental e, conseqüentemente, os métodos da Ecotoxicologia (Kooijman & Bedaux 1996).

Embora o conceito de Ecotoxicologia seja amplo, abrangendo a totalidade do ecossistema, muito mais atenção tem sido dada aos efeitos em organismos (*i.e.* espécies) individuais e poucos são os estudos com enfoque sistêmico. A visão ecossistêmica tem sido enfatizada ultimamente em uma nova abordagem que vem sendo denominada de Ecologia do Estresse (*Stress Ecology*, Van Straalen 2003). Nesta visão, o conceito de nicho ecológico assume grande importância, à medida que os agentes tóxicos frequente-

mente interagem com fatores de estresse naturais, como temperatura, pH, pressão osmótica e nutrição, principalmente quando os organismos estão nas bordas de sua amplitude ecológica – que é a faixa de condições ambientais na qual o organismo pode sobreviver e reproduzir – e os efeitos dos toxicantes tornam-se mais severos. Uma situação de estresse surge quando algum fator ambiental muda ou quando um organismo encontra-se fora de seu nicho ecológico. Por definição, um organismo não pode crescer e reproduzir fora de seu nicho, mas pode sobreviver temporariamente. Portanto, a Ecologia do Estresse traz uma proposta inovadora na Ecotoxicologia, analisando o organismo num contexto mais amplo e mais próximo da realidade do ambiente natural. Segundo Van Straalen (2003), para que haja um avanço na área de Ecotoxicologia, há que se fazer um esforço para diminuir o ‘enfoque de testagem’ (*testing approach*) e trazer a Ecotoxicologia mais próxima da Ecologia.

A Figura 1 ilustra as faixas de tolerância e os níveis requeridos para manter as atividades biológicas. Pode-se deduzir que, à medida que o organismo é exposto a algum estresse ambiental, seja uma condição extrema ou um agente tóxico, que o leva para fora de sua faixa ótima, algum processo biológico é comprometido. Além disso, a sensibilidade dos organismos a determinados agentes pode mudar em função das condições ambientais, como por exemplo a temperatura (Lewis & Horning 1991), o pH (Belanger & Cherry 1990, Havens 1992) e o nível alimentar (Koivisto *et al.* 1992). Deste modo, quanto mais estreita a faixa de tolerância a condições ambientais, maior o nível requerido pelo organismo para sobreviver, crescer e reproduzir-se. Portanto, testes que abranjam estes principais processos biológicos, realizados em condições diferenciadas de exposição (*i.e.* pH, temperatura, dureza, etc.), são importantes na determinação dos efeitos de poluentes e contaminantes ambientais. Dentro desta abordagem, portanto, a padronização dos testes de toxicidade torna-se inconveniente.

Ainda dentro da abordagem ecossistêmica, muitas tentativas têm sido feitas no sentido de tornar mais realistas os testes de toxicidade, como a realização de ensaios multi-espécies (*i.e.* comunidades, mesocosmos e testes *in situ*, Chapman *et al.* 1992, Burton *et al.* 2005) e o uso de *end points* funcionais (*i.e.* produção primária, decomposição, etc), em adição aos testes

tradicionais que avaliam somente a sobrevivência, crescimento e reprodução de uma única espécie.

Uma abordagem mais reducionista, mas não menos importante, é a que estuda os efeitos comportamentais de agentes estressores em organismos individuais. Marcucella & Abramson (1978) definiram ‘Toxicologia Comportamental’ como as mudanças do comportamento de um organismo, induzida pelo estresse, que excede o limite normal de variabilidade. Dentro da hierarquia da organização biológica o comportamento é uma resposta toxicológica que reflete o efeito de todos os níveis do organismo e representa a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais (Grue *et al.* 2002). A escolha de habitat, captura de presas e fuga de predadores são classes de comportamento que afetam as variáveis demográficas fundamentais como nascimento e morte e, conseqüentemente, os padrões da dinâmica de populações e a estrutura das comunidades (Anholt 1997). Portanto, a “Toxicologia Comportamental” pode ajudar a prever quais os possíveis efeitos dos agentes tóxicos no *fitness* das espécies testadas e as conseqüências no nível de populações.

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão dos principais métodos ecotoxicológicos empregados na avaliação da qualidade da água e no biomonitoramento da contaminação ambiental, limitando-se às respostas ao nível de organismo. De fato, o nível de organismo situa-se no meio da escala hierárquica de resposta a

estressores, integrando os níveis bioquímico, celular e fisiológico (Figura 2). Portanto, antes que os efeitos possam se expressar no nível de populações, comunidades e ecossistemas, a resposta de organismos individuais fornece uma boa avaliação do risco de extinção local de alguns grupos de organismos susceptíveis. Dentro desse alcance de organização, serão abordados os métodos tradicionais, como testes de toxicidade aguda e crônica, assim como os métodos mais modernos, como o biomonitoramento automático em tempo real para análise do efeito de substâncias tóxicas na atividade motora de organismos aquáticos. Será feita também uma análise crítica de todos estes métodos, procurando-se destacar suas vantagens e limitações.

ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os resultados das análises químicas por si só não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes porque não demonstram os efeitos sobre o ecossistema. Somente os sistemas biológicos (organismos ou partes deles) podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias. A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente. A determinação de substâncias isoladas através de análises químicas tradicionais, além de

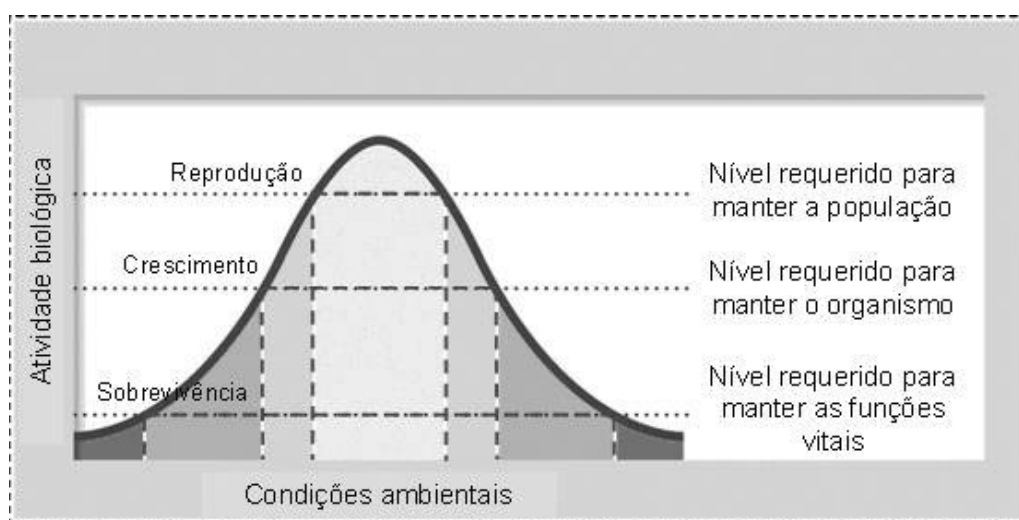


Figura 1. Faixas de tolerância e níveis de atividade biológica requeridos para manter as funções vitais (sobrevivência, crescimento e reprodução) dos organismos sob um gradiente de condições ambientais (e.g. pH, temperatura, oxigênio dissolvido, substâncias tóxicas). Modificado de Ricklefs (2001).

Figure 1. Tolerance limits and amount of biological activity necessary to sustain vital functions (survival, growth and reproduction) of organisms over a range of environmental conditions (e.g. pH, temperature, dissolved oxygen, toxic substances). Adapted from Ricklefs (2001).

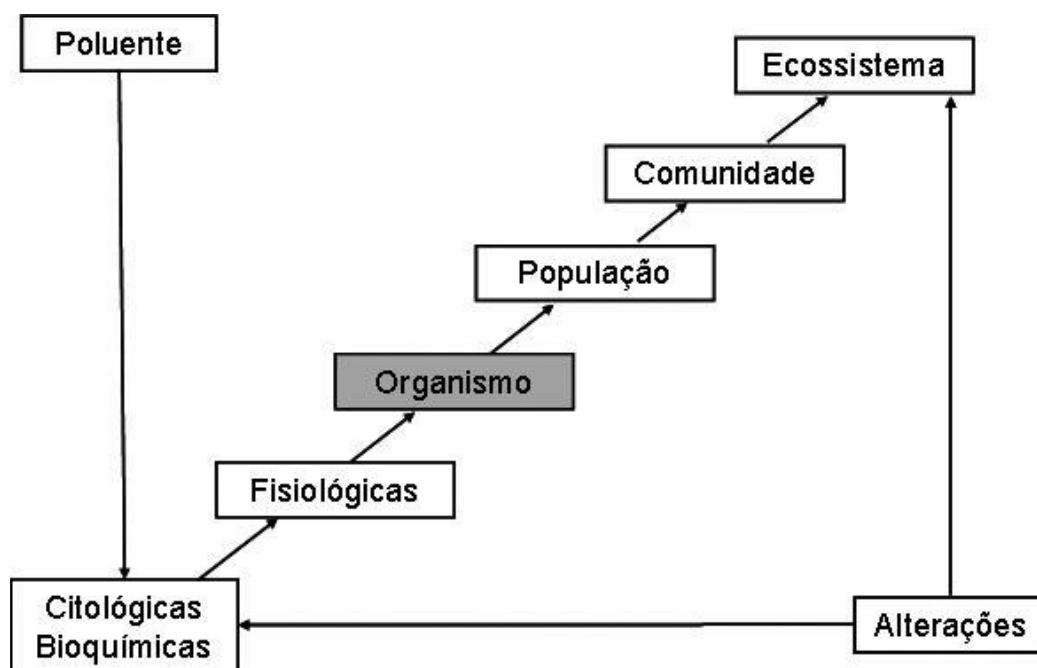


Figura 2. Níveis de organização biológica e resposta aos efeitos de poluentes.
 Figure 2. Levels of biological organization and responses to pollutant effects.

não detectarem os efeitos nos organismos, não dão resposta sobre que tipo de agente químico está sendo responsável pela toxicidade e informações sobre as possíveis interações entre substâncias (aditivas, antagônicas ou sinérgicas), como também da biodisponibilidade das mesmas. Uma abordagem promissora neste sentido é a Avaliação e Identificação da Toxicidade, AIT (*Toxicity Identification Evaluation* – TIE). A AIT associa técnicas de fracionamento de amostras e testes de toxicidade (Fase I), análises químicas (Fase II) e confirmação da toxicidade (Fase III), fornecendo uma idéia mais precisa de que tipo de composto (*e.g.* metais, ânions inorgânicos, compostos orgânicos polares e não polares, voláteis, oxidantes, etc.) está envolvido na toxicidade para a biota aquática. Entretanto, não é do escopo desta revisão, aprofundar-se nesta abordagem (consultar Botta *et al.* 2006).

Os testes de ecotoxicidade permitem avaliar a contaminação ambiental por diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral, assim como, avaliar a resultante de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (Marschner 1999, Lombardi 2004). Tem como vantagem, abranger uma grande variedade de substâncias biologicamente disponíveis em uma amostra ambiental através de um

único ensaio, possibilitando a detecção de efeitos de substâncias tóxicas novas que possam surgir no ecossistema aquático (Branco 1989). Este instrumento torna-se de suma importância na busca de generalizações sobre o grau de toxicidade em vários tipos de corpos hídricos e para determinação da influência direta de elementos vindos das atividades antrópicas e/ou naturais (Zagatto & Gherardi-Goldstein 1991). Detectam a capacidade inerente de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo avaliar em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos. Em suma, os procedimentos ecotoxicológicos tradicionais têm maior preocupação em caracterizar os efeitos adversos causados por uma amostra tóxica sem a preocupação de identificar os agentes tóxicos isoladamente.

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, que devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. As exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo. A exposição a um agente

tóxico pode ser aguda, quando a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações subletais, durante um longo período de tempo (Schvartsman 1991).

Estes testes apresentam uma série de normas e procedimentos padronizados que devem ser seguidos para que as respostas sejam consideradas válidas (Tabela I). Assim, temos as séries de diluição, o controle negativo e o controle positivo. As séries de diluição são utilizadas para se medir em que concentração o material a ser testado apresenta efeitos ou não sobre aquela determinada população, fornecendo sempre informações sobre a relação concentração/efeito, permitindo assim uma estimativa da proximidade dos limites de tolerância e de um *ranking* de Toxicidade. O controle negativo é uma população exatamente igual à que se encontra em testes, mas sem a adição do contaminante, isto ajuda a determinar até que ponto os efeitos podem ter acontecido por outro fator qualquer. No controle positivo, utiliza-se um agente tóxico de efeito conhecido (*i.e.* uma substância química de referência) para assegurar que o organismo responde apropriadamente.

Para detecção de despejos tóxicos no ambiente, as amostras devem ser coletadas ou os organismos devem ser expostos em vários pontos localizados à montante do ponto de despejo, preferencialmente além da área de mistura e à jusante do ponto de descarte. Cuidados devem ser tomados para incluir uma área controle e uma área de recuperação, assim como várias estações intermediárias respeitando o gradiente de poluição (De Zwart 1995).

Uma situação onde há muitas fontes de poluição é aquela onde há mais do que um despejo de efluente dentro do curso de água de forma que seus efeitos podem sobrepor-se. Essa é a situação mais comum de ser encontrada. A avaliação toxicológica é particularmente útil para determinar se a combinação de efluentes causará algum efeito, pois estes efeitos são medidos em combinação (De Zwart 1995). Neste caso, também é importante que os estudos sejam direcionados para aquelas fontes que contribuem mais para os efeitos adversos, fazendo uma correlação entre o efluente e a sua toxicidade no ambiente (Eagleson *et al.* 1990, Dickson *et al.* 1992, Khan *et al.* 1994).

Uma vez carregados para dentro dos corpos de água, os compostos tóxicos podem interagir diretamente com a biota por ingestão e contato, ou se depositar nos

Tabela I. Normas brasileiras para padronização de testes ecotoxicológicos.
Table I. Brazilian guidelines for standardization of ecotoxicological tests.

Normas	Identificação
L5.018	Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera, Crustacea).
L5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I - Sistema Estático. Parte II - Sistema Semi-Estático. Parte III - Sistema de Fluxo Contínuo.
L5.020	Teste de toxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i> (Chlorophyceae).
Normas da CETESB	
L5.022	Avaliação de toxicidade crônica, utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea).
L5.227	Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Photobacterium phosphoreum</i> (Sistema Microtox).
L5.228	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i> .
L5.250	Água do Mar - Teste de Toxicidade Crônica de Curta Duração com <i>Lytechinus ariegatus</i> Lamarck, 1816 (Echinodermata, Echinoidea).
L5.251	Água do Mar - Teste de Toxicidade Aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> Silva, 1979 (Mysidacea, Crustacea).
Normas da ABNT	
NBR 12713	Água - Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea).
NBR 12714	Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte I - Sistema estático.
NBR 12715	Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte II - Sistema semi-estático
NBR 12716	Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte III - Sistema de fluxo contínuo.
NBR 12648	Ensaio de toxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i> (Chlorophyceae).

sedimentos. Este compartimento funciona, portanto, como um sumidouro temporário de poluentes os quais, sob determinadas condições ambientais, podem ser liberados para a coluna de água afetando assim não só a fauna bentônica quanto à nectônica também. Por isso, no monitoramento ecotoxicológico de ecossistemas aquáticos é importante, além de analisar a água, avaliar a toxicidade do sedimento.

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas. (Rand & Petrocelli 1985). Normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a anteceda, como o estado de imobilidade em invertebrados. Estes testes têm por objetivo determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) ou a Concentração Efetiva Média (CE₅₀), isto é, a concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição.

A avaliação ecotoxicológica aguda de corpos de água, com organismos aquáticos, constitui-se uma abordagem exploratória para evidenciar um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos domésticos e industriais (Bertoletti & Zagato 2006). Tem como objetivo identificar a variabilidade das respostas ao agente entre as diferentes espécies, indicar a toxicidade comparativa e detectar contaminações agudas. No Brasil, os testes de toxicidade aguda vêm sendo empregados no monitoramento de efluentes industriais com o intuito de minimizar o impacto ambiental, avaliar a eficiência de estações de tratamento, bem como requisito para a obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns Estados.

Em seu estudo, Baptista *et al.* (2000) avaliaram a eficiência de uma estação de tratamento de efluentes de uma indústria têxtil, para isso, utilizaram três organismos bioindicadores, o crustáceo *Daphnia magna*, o peixe *Poecilia reticulata* e a bactéria *Vibrio fischeri*, representativos de diferentes níveis tróficos. Os teste de toxicidade aguda revelaram que o tratamento empregado pela indústria foi eficiente quanto à remoção de toxicidade aguda para os organismos *D. magna* e *P. reticulata*, para estes organismos o efluente tratado não causou nenhum efeito agudo, porém no

teste com *V. fischeri* o efluente tratado causou toxicidade aguda. Este estudo revela a importância de se avaliar ecotoxicologicamente a eficiência de estações de tratamento de efluentes, e de se utilizar espécies representativas de diferentes níveis tróficos.

Para Ravera (1998) e Cairns (2002), a associação do monitoramento químico com o monitoramento biológico permite uma melhor avaliação das causas dos efeitos nos organismos, através da identificação de substâncias que podem estar influenciando na toxicidade das amostras. Novelli (2005), avaliando a toxicidade de amostras de água e sedimento no rio Monjolinho (São Paulo) utilizando *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, verificou toxicidade aguda das amostras de água em todos os pontos amostrados em julho de 2003, para *D. similis*. Estes resultados apresentaram correlação com as concentrações de metais e concentrações de matéria orgânica detectados no sistema em estudo.

Entretanto, muitas vezes, efluentes que estão dentro dos padrões (tanto físico-químico quanto ecotoxicológico) estabelecidos pela legislação para lançamentos em corpo de água podem causar distúrbios no ecossistema. Apesar da regulação de descargas de compostos tóxicos no ambiente, o ecossistema aquático pode apresentar condições inadequadas para manutenção da vida mesmo quando as características físico-químicas da água conferirem com a estabelecida pelo critério de qualidade. Isto pode ser causado pela interação entre componentes do efluente, interações entre múltiplas descargas ou fontes de poluição não pontuais, e interações com o corpo de água receptor (Bervoets *et al.* 1996).

Zagatto *et al.* (1987) observaram que a maioria das amostras coletadas a jusante dos lançamentos de efluentes industriais da bacia do Rio Cubatão causou efeito tóxico agudo em *D. similis* e *Chlorella vulgaris*, sendo que tal efeito nem sempre foi associado aos agentes químicos presentes. De modo semelhante, Bertoletti *et al.* (1989) também demonstraram que 50% das amostras da água dos rios da região da Grande São Paulo submetidas ao ensaio com *D. similis* apresentaram efeito tóxico agudo. Estes autores evidenciaram a inexistência de correlação entre os resultados dos ensaios ecotoxicológicos e as análises físicas e químicas e, por isso, recomendaram a utilização destes testes para complementar a caracterização das águas destinadas à proteção da vida aquática.

É importante atentar para o fato de que o monitoramento de ecossistemas aquáticos não deve estar limitado apenas às análises do componente água, mas também deve incluir o sedimento, uma vez que o ambiente sedimentar pode alterar a qualidade das águas quando substâncias naturais e de origem antropogênica introduzidas no sistema são liberadas para coluna d' água devido a mudanças das condições ambientais (Adams *et al.* 1992).

No Brasil, os primeiros trabalhos para avaliar a toxicidade de sedimentos foram realizados em 1980, com material proveniente da represa Billings e do rio Cubatão, como parte de projetos mais amplos para controle de poluição e recuperação ambiental desenvolvidos pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB 1983 a,b). Os ensaios agudos foram realizados com extrato aquoso do sedimento, utilizando como organismo teste *D. similis*. Os resultados obtidos com o rio Cubatão foram comparados com os dados de análises químicas e da estrutura da comunidade bentônica, o que resultou em indicações seguras quanto à detecção dos problemas de contaminação por metais e compostos orgânicos, contribuindo para o diagnóstico ambiental da região.

Os testes de toxicidade aguda também podem ser aplicados para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um determinado agente tóxico isolado e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida aquática e do ambiente, como no estudo de Resgalla Jr. *et al.* (2002) que avaliaram a toxicidade aguda de alguns agroquímicos utilizados em arroz irrigado, visando estabelecer as concentrações de risco bem como os possíveis efeitos que tais produtos possam apresentar sobre organismos não-alvo. Empregaram como espécie indicadora a carpa-comum em função da sua utilização em consórcios de arroz com peixe. Foram testados individualmente os herbicidas Metsulfuron, Clomazone, Oxifluorfen, Oxadiazon e Pirazosulfuron e o inseticida Carbofuran. Os resultados indicaram grande variação entre os produtos quanto à toxicidade para a espécie testada. A partir desse estudo, os autores estimaram o índice de segurança, através da relação entre a CL_{50} e a concentração provável utilizada na lavoura.

No ambiente aquático, entretanto, os poluentes acabam sofrendo uma série de transformações (diluição, fotodegradação, biodegradação etc.), estando

geralmente disponíveis em concentrações crônicas. Somente em rios que recebem muito aporte de efluentes industriais e domésticos é possível identificar efeitos agudos. De forma geral, estes testes são baratos, confiáveis e simples de desenvolver, porém existem algumas limitações como:

- Não há como avaliar de que maneira a mortalidade aumentará após a exposição, uma vez que estes testes são de curta duração (0-96h). Em certos casos, após uma exposição a curto ou médio prazo, o efeito adverso só aparece depois de um período de latência, e os curtos períodos de exposição empregados nos testes agudos podem não abranger este período;
- Geralmente é realizado com uma única espécie. Em um contexto de multiespécies, o agente tóxico pode ser transferido pela cadeia alimentar, ocorrendo a *biomagnificação*, onde, os níveis de exposição por ingestão podem resultar em níveis maiores do que os que causam mortalidade a partir de uma dada concentração na água. Além disso, competição, predação e outras interações interespecíficas pode aumentar o estresse dos organismos, resultando no aumento da sensibilidade.
- Apenas um estágio de vida é testado. A sensibilidade das espécies nos estágios juvenil, larvar e ovos é frequentemente diferente, geralmente maior, do que no estágio adulto.
- A sensibilidade de um organismo a um poluente pode variar. Um nível seguro para uma espécie de peixe "A" pode não ser para espécie "B" que faz parte da mesma comunidade biológica. Vitozzi & De Angelis (1991), avaliando 200 compostos tóxicos a diferentes espécies de peixes (*Poecilia reticulata*, *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinus Carpio*, *Oryza latipes*, *Salmo gairdnerii* e *Leuciscus idus*), verificaram o que se denomina de "toxicidade aguda a espécie seletiva", ou seja, cada espécie apresenta uma sensibilidade à uma determinada substância.
- Não é sensível a efeitos subletais que podem levar a morte por exposição prolongada. As concentrações subletais de produtos tóxicos no ambiente aquático podem causar uma série de efeitos que não causam a morte imediata dos organismos, mas que representam perturbações importantes, consideradas como 'morte ecológica', as quais impedem que o organismo realize suas funções no ecossistema,

inclusive podendo progredir para a morte. Entre estes efeitos estão: a dificuldade na localização de presas, problemas na percepção química e motora, inibição da desova, aborto, deformação de órgãos reprodutores, perda de membros, alterações respiratórias, alterações na taxa de fotossíntese, desenvolvimento de carcinomas, etc. Muitos efeitos indiretos e subletais podem ocorrer a médio/longo prazo, em diferentes intensidades, podendo causar a redução das populações das espécies atingidas.

Fracácio *et al.* (2000) também perceberam a limitação dos testes de toxicidade aguda em seu estudo realizado no Rio Monjolinho. Este rio recebe esgoto *in-natura* da cidade, além de efluentes industriais e agrícolas (principalmente resíduos de pesticida para cultivo de cana). O estudo avaliou a toxicidade aguda do rio Monjolinho em maio de 1998 com organismos de diferentes níveis tróficos e, no entanto, verificaram que para um curto período de tempo houve toxicidade para algas e microcrustáceos somente em alguns pontos mais urbanizados do rio. Os autores concluíram que seria necessária a avaliação mais cautelosa da toxicidade tanto espacial quanto temporalmente, com ênfase em testes crônicos e *in situ*, e com fases mais sensíveis (larvas) de espécies representativas do sistema para realmente conhecer o potencial tóxico deste rio frente às atividades do seu entorno.

Devido à diluição progressiva e saneamento, amostras de muitas localidades não produzem ou produzem apenas efeitos marginais em testes de toxicidade aguda, não revelando assim a relação fundamental entre a concentração e o efeito que é crucial para a avaliação da toxicidade. No entanto, as condições locais podem muito bem atribuir certos aspectos de instabilidade em longo prazo ao ecossistema. Prolongar consideravelmente a exposição de organismos aos contaminantes ou aumentar a concentração tóxica são as principais soluções para detectar o risco de perturbações sutis do ecossistema através de testes de toxicidade, porém, isto muitas vezes não é exequível.

TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA

Os testes de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados dos testes de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir da CL_{50} . Comparado com os testes

agudos, estes testes são mais sensíveis à diluição esperada em amostras ambientais. Avalia a ação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por um período que vai de 1/10 do ciclo vital até a totalidade da vida do organismo (Rand & Petrocelli 1985). De modo geral, porém, não exclusivo, estes efeitos são subletais e observados em situações em que as concentrações do agente tóxico, às quais ficam expostos os organismos, permitem sua sobrevivência, mas afetam uma ou várias de suas funções biológicas, interferindo, por exemplo, na reprodução, desenvolvimento de ovos, no crescimento, etc.

A intoxicação crônica pode ocorrer por dois motivos (Chasin & Azevedo 2003):

1) pela acumulação do xenobiótico no organismo, que ocorre quando a quantidade de xenobiótico eliminada é inferior à quantidade absorvida. A concentração do agente tóxico no organismo aumenta progressivamente até obtenção de níveis suficientes para gerar efeitos adversos.

2) Pela adição dos efeitos causados por exposições repetidas, sem que o tóxico se acumule no organismo.

Em ambientes aquáticos a ocorrência dos efeitos crônicos é mais freqüente, devido: à diluição pontual dos xenobióticos oriunda das águas de contribuição, às relações antagonistas entre as substâncias, à rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica e à sedimentação de sólidos em suspensão. Dessa forma, os organismos se expõem a baixas concentrações de determinados poluentes durante longo períodos de tempo (Stephan & Mount 1973), ocasionando efeitos crônicos a níveis subletais e até mesmo letais ao longo do tempo.

Os testes de toxicidade crônica são também utilizados sempre que os testes de toxicidade aguda não forem suficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável, isto é, para detectar indícios de toxicidade aguda. A seguir, são dados alguns exemplos da aplicação de testes crônicos quando os testes agudos falham em fornecer respostas mensuráveis.

Barbosa *et al.* (2000) realizaram teste de toxicidade aguda com o efluente (lodo) de uma estação de tratamento de água utilizando como bioindicadores, o crustáceo *Daphnia similis*, larva de inseto *Chironomus xantus* e o peixe *Hyphessobrycon egues*. Como os testes agudos não indicaram toxicidade, foi conduzido um teste crônico com *D. similis*, que resultou em efeitos

na reprodução. Concluindo, nem sempre a toxicidade aguda reflete o potencial deletério de um efluente complexo, sendo imprescindível a realização de testes de toxicidade crônica para complementar a avaliação ou monitoramento ambiental, do ponto de vista biológico.

No estudo de Bervoets *et al.* (1996), foi observado efeito na reprodução de *Daphnia magna* na concentração de 0,5% de um efluente industrial contendo altos níveis de cálcio, cádmio, cloreto de chumbo e sulfatos. Em uma concentração ambiental de 4%, todos os componentes do efluente estão de acordo com os limites estabelecidos pela regulação europeia (European Communities 1978); entretanto, um efeito significativo na reprodução da *D. magna* foi detectado até mesmo em concentrações oito vezes menores.

Em um trabalho recente, Ferrão-Filho *et al.* (no prelo) demonstraram que a água de um reservatório eutrófico (Reservatório do Funil, RJ) apresentou efeitos crônicos para duas espécies nativas de microcrustáceos zooplânctônicos (*Daphnia gessneri* e *Moina micrura*) e que estes efeitos foram correlacionados com a presença de toxinas de cianobactérias na água. Dentro do período testado, entretanto, houve pouca evidência de letalidade (Teste agudo de 48 h), o que demonstra a importância dos testes crônicos na avaliação do efeito de toxinas de cianobactérias em espécies nativas.

ESCOLHA DO ORGANISMO-TESTE

Várias espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos e em corpos receptores. Dentre os principais grupos de organismos, utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos.

A sensibilidade de um organismo frente à qualidade do seu ambiente, usada no biomonitoramento, pode ser a nível bioquímico, fisiológico, morfológico, comportamental, etc. Toda essa sensibilidade depende não somente do fator a ser monitorado, mas também do nível nutricional, idade do organismo, sexo, fase de desenvolvimento, características genéticas, competição entre indivíduos ou espécies, etc.; além de fatores ambientais como luminosidade e temperatura.

O mesmo deve ser considerado ao se estudar o acúmulo de certa substância. A padronização dos organismos bioindicadores é por isso um fator de fundamental importância em programas de monitoramento.

Para a escolha do organismo-teste geralmente usam-se os seguintes critérios de seleção de espécies: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (Rand & Petrocelli 1995).

Considerando-se a dificuldade em encontrar uma espécie com todas estas características, existem muitas espécies padronizadas que podem ser utilizadas, sendo extremamente importante a realização de bioensaios com espécies representativas do ambiente de estudo, pois respondem melhor as condições encontradas nos ambientes naturais onde vivem.

No entanto, não existe uma única espécie de organismo que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Por este motivo, recomenda-se empregar no mínimo três espécies que representem diferentes níveis na cadeia trófica, a fim de se obter resultados mais precisos e detectar um efeito tóxico específico, aumentando a probabilidade de se obter uma resposta tóxica com organismos de diferentes sensibilidades (Baun *et al.* 1999).

Com objetivo de identificar as diferenças na sensibilidade a compostos tóxicos entre as espécies *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) e *Danio rerio* (peixe), usados como organismos padrão para teste ecotoxicológicos aquáticos, Martins *et al.* (2007) avaliou um banco de dados de testes de toxicidade aguda contendo mais de 500 valores para *D. magna* e 70 para *D. rerio*. Para a maioria das substâncias, como: Malathion, Parathion, Metil-parathion, Cádmio, Cloreto, 3, 4-Dicloroanilina, Aldicarb, Anilina, Etileno Glicol, Dietanolamina e Trietanolamina e Cloreto de Mercúrio, *D. magna* foi mais sensível que *D. rerio*. Por outro lado, as substâncias Acroleína, Sulfato de Cobre, Lindane e Di-n-butylphthalato e o-Cresol foram mais tóxicas em testes agudos com *D. rerio* comparado a *D. magna*. Neste estudo, o autor

conclui que a sensibilidade destes organismos irá depender da substância tóxica avaliada, salientando para o fato de que não há um organismo extramente sensível a todas as substâncias.

Testes de toxicidade aguda com peixes e dafnidos continuam sendo o método principal de testes de controle ambiental (Sandbacka *et al.* 2000). Dessa forma, *D. magna* e *D. rerio* podem ser usados conjuntamente como um sistema de alerta no caso de contaminação aguda como despejos acidentais, despejos de efluentes industriais, contaminação aguda de pesticida, contaminação acidental ou intermitente de água. No Brasil, os testes ecotoxicológicos com microcrustáceos foram padronizados inicialmente com espécies exóticas como *Daphnia similis* (ABNT 1993) e *Ceriodaphnia dubia* (ABNT 2003), mas, recentemente, um protocolo de teste de toxicidade crônica foi desenvolvido para a espécie nativa *C. silvestre* (ABNT 2003). É necessário, portanto, desenvolver mais estudos no sentido de investigar o potencial de uso de outras espécies nativas no biomonitoramento ecotoxicológico.

RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA

Os ensaios ecotoxicológicos têm por objetivo estabelecer as relações dose-efeito e dose-resposta que fundamentam todas as considerações necessárias para avaliação do risco. Para uma melhor compre-

ensão da diferença entre os dois tipos de relações, torna-se necessário conceituar dose, efeito e resposta. A expressão 'dose' se emprega para especificar a quantidade de uma substância química administrada, a qual pode não ser idêntica à dose absorvida. Nas exposições ambientais pode-se estimar a dose com base na medição das concentrações ambientais em função do tempo. E a dose nos órgãos e tecidos que interessam, pode-se estimar com base na quantidade administrada ou ingerida, ou na medida da concentração em amostras biológicas.

Os termos 'efeito' e 'resposta', muitas vezes podem ser usados como sinônimos para denominar uma alteração biológica, em um organismo ou em uma população em relação a uma exposição. Contudo, em Ecotoxicologia estes termos se diferenciam, utilizando-se o termo 'efeito' para denominar uma alteração biológica e o termo 'resposta' para indicar a proporção de uma população que manifesta um efeito definido.

A curva dose-efeito demonstra a relação entre a dose e a magnitude de um efeito graduado, em um indivíduo ou em uma população. Estas curvas podem adotar distintas formas, lineares ou não. A curva dose-resposta representa a relação entre a dose (ou concentração) e a proporção da população que responde com um efeito mensurável. Em geral estas curvas são sigmóides (Figura 3).

Uma forma de explicar a configuração das curvas dose-resposta é dizer que cada indivíduo de uma

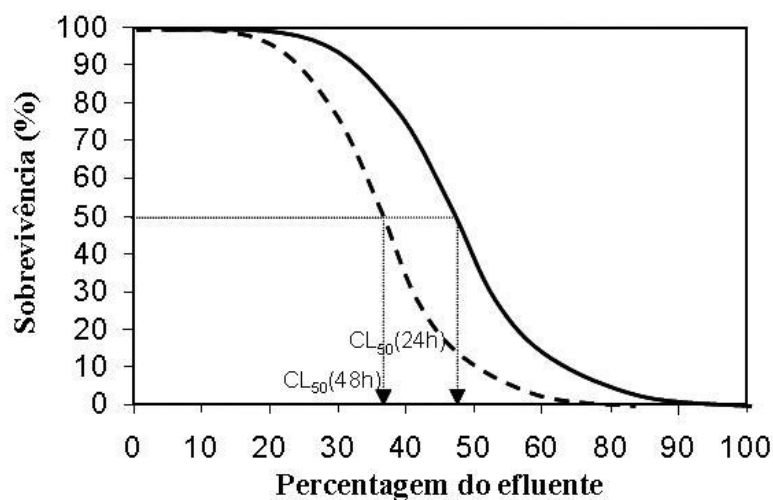


Figura 3. Curva dose-resposta hipotética para um efluente qualquer. A concentração de efluente é dada pela percentagem de diluição de amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após 48 horas de exposição. Os valores de $CL_{50}(24h)$ e $CL_{50}(48h)$ podem ser estimados por simples interpolação gráfica.

Figure 3. Hypothetical dose-response curve for any given effluent. Concentration of the effluent results of the dilution (%) of the effluent sample in the test solution. The continuous line illustrates response over the first 24h and the dotted line illustrates response after 48h of exposition. $CL_{50}(24h)$ and $CL_{50}(48h)$ can be estimated by direct graphic interpolation.

população tem uma “tolerância” própria e requer uma determinada dose antes de responder com um efeito. Deste modo, pode-se reconhecer uma região inicial em que o efeito tóxico ainda não se apresenta, uma região intermediária em que o efeito se desenvolve rapidamente, e uma região final em que o efeito diminui assintoticamente. Portanto, existe tanto uma dose baixa à qual ninguém responderá, quanto uma dose alta à qual todos responderão. A razão disto deve-se à variabilidade biológica, isto é, à diferente sensibilidade dos indivíduos (ou animais) à ação de determinada substância química.

Ao término de um teste de toxicidade, são obtidos diferentes níveis de um efeito tóxico pré-determinado (e.g. mortalidade para testes de toxicidade aguda), os quais estão em função das diferentes diluições do agente químico, empregadas no experimento. No entanto, é necessário dispor de métodos estatísticos para determinar um único valor, que represente o conjunto dos dados gerados. Dessa forma, a curva dose-resposta permite avaliar a resposta da população estudada a partir das concentrações, às quais 10%, 50%, 90% ou qualquer outra porcentagem da população reage a um determinado efeito.

Normalmente, o valor obtido num teste de toxicidade aguda é a CE_{50} ou a CL_{50} , que é a concentração que causará uma resposta em 50% dos indivíduos de uma população que foi exposta a uma substância química. O motivo da determinação da concentração efetiva ou letal a 50% dos organismos deve-se à menor variabilidade na estimativa deste parâmetro, característico da população estudada. Assim sendo, após a exposição de organismos a essa concentração do agente tóxico, espera-se que pelo menos a metade da população de indivíduos expostos responda de maneira quantitativamente idêntica.

Nos testes de toxicidade crônica determina-se a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO). Pode-se determinar também o Valor Crônico (VC), que é a média geométrica da CENO e da CEO e a Concentração Percentual de Inibição (ICp), que é a concentração que causa um percentual de inibição na reprodução ou no desenvolvimento embrionário e/ou larval em um tempo específico de exposição. A CENO seria, portanto, uma concentração considerada segura do agente tóxico ou efluente tóxico a ser lançado num corpo d'água, enquanto que a CL_{50} e a CE_{50} são

parâmetros que indicam a toxicidade da substância ou amostra testada; quanto menor a CL_{50}/CE_{50} , maior a toxicidade da substância ou amostra.

A utilidade destes parâmetros, entretanto, vem sendo questionada por alguns autores (Kooijman 1996, Péry *et al.* 2002, Jager *et al.* 2004, 2006). Quanto ao conceito de CL_{50}/CE_{50} , os seguintes problemas podem ser mencionados: 1) não incorporam todos os dados do teste, somente os resultados finais (e.g. 48 ou 96h); 2) variam com o tempo de exposição, ou seja, os valores de CL_{50}/CE_{50} decrescem com o tempo de exposição; problema que não é completamente resolvido pela padronização do teste com um tempo fixo de exposição; 3) requer várias concentrações com efeitos parciais, o que torna o teste complicado na prática; 4) resulta geralmente de um modelo de regressão puramente descritivo, log-logístico ou log-probabilístico (e.g. Logit ou Probit) utilizado somente para interpolação, representando a distribuição de sensibilidade na população testada; a escolha destes modelos, entretanto, é arbitrária e pressupõe que os dados se ajustem bem a curva (i.e. *goodness-of-fit*). Não existem, entretanto, justificativas biológicas ou toxicológicas para a escolha deste ou daquele modelo.

Vários exemplos podem ilustrar as limitações dos testes padronizados e dos métodos estatísticos para analisar os dados obtidos com estes protocolos. Por exemplo, o teste agudo com *Daphnia similis* dura 48 h (ABNT 2004a) e com o peixe *Danio rerio* dura 96 h (ABNT 2004b), independentemente da substância ou composto utilizado. Entretanto, a CL_{50} geralmente decresce com o tempo, porque leva algum tempo para o químico se acumular nos tecidos do organismo até atingir uma concentração limiar, a partir da qual o efeito se apresenta. A toxicocinética, ou seja, a velocidade com que a substância é absorvida, distribuída nos tecidos e eliminada do organismo, depende tanto das propriedades do organismo (especialmente da razão área de superfície/volume) quanto das propriedades do composto químico (e.g. hidrofobicidade). Portanto, faz pouco sentido fixar arbitrariamente um tempo de exposição.

Para algumas substâncias, a duração do teste padrão pode ser suficiente para fornecer a CL_{50} ; para outras, entretanto, pode não ser, e isto impõe severas restrições à comparação de diferentes químicos (Jager *et al.* 2006). Surfactantes, por exemplo, reagem rapidamente, mas se nenhum efeito aparecer

após algumas horas de exposição, é pouco provável que aparecerá naquela concentração. Com o cádmio ocorre o contrário, a CL_{50} continua a cair mesmo após três semanas de exposição (Kooijman 1996). Substâncias voláteis, como os hidrocarbonetos derivados do petróleo, têm um mecanismo totalmente diferente, agem rapidamente após poucos minutos de exposição, devido ao efeito de narcose, porém, muitos organismos se recuperam e, aparentemente, adquirem resistência após 24 horas de exposição (Lima 2006).

Uma alternativa ao uso da CL_{50}/CE_{50} seria o uso do Tempo Letal Médio (TL_{50}), que seria o tempo necessário para matar ou imobilizar 50% dos organismos expostos. Embora de uso restrito, é útil na comparação entre toxicantes com diferentes mecanismos de ação, dando uma idéia da velocidade de absorção da substância e do seu efeito. Alguns autores têm utilizado este parâmetro na comparação entre diferentes toxinas de cianobactérias (Ferrão-Filho *et al.* 2000, Guo & Xie 2006), e de dinoflagelados (Wang *et al.* 2005), que tem efeito rápido ou retardado, dependendo da espécie-teste, da microalga e do mecanismo de ação de suas toxinas (Ferrão-Filho *et al.* 2000, Ferrão-Filho *et al.* 2008).

Com relação à CENO, um problema inerente a essa estatística é que a hipótese nula atesta que “não há efeito na concentração aplicada”; em outras palavras, “a concentração é segura”. A CENO nada mais é do que um parâmetro estatístico derivado de teste de hipóteses, ou seja, da comparação entre as respostas dos tratamentos com as do controle. No entanto, um efeito não estatisticamente significativo não quer dizer que não exista efeito. Variações nos procedimentos experimentais podem resultar em valores elevados da CENO, o que torna o uso da CENO inapropriado em legislação. De fato, a variabilidade nos valores da CENO é da ordem de 10-34% e, em casos extremos aproxima-se de 100% (Crane & Newman 2000). Apesar da OECD não recomendar o uso da CENO, este parâmetro é frequentemente utilizado em avaliação de risco.

Um alternativa à CENO é o uso de fatores de segurança, que geralmente consiste em se dividir a CL_{50}/CE_{50} por múltiplos de 10 (Chapman *et al.* 1998), para derivar a Concentração Prevista de Efeito não Observado (CPENO), ou seja “a concentração abaixo da qual um efeito indesejado provavelmente não ocorrerá” (EC 2003). Na realidade, esses fatores

de segurança refletem a nossa ignorância a respeito da tradução dos resultados de testes de laboratório (curta duração, alta exposição, uma espécie-teste e condições controladas) para o ambiente natural (longa duração, baixa exposição, várias espécies e ambiente variável).

Muito mais importante do que se fixar fatores de segurança arbitrários é entender a curva dose-resposta. A forma desta curva é determinada pela sensibilidade média da população exposta e pela variação na sensibilidade dentro desta população, sendo que a inclinação desta curva fornece uma estimativa desta sensibilidade (Smit *et al.* 2001). Portanto, o uso da variação específica de sensibilidade dentro de uma população-teste pode contribuir muito mais para a derivação de fatores de segurança, os quais permitem a extrapolação de estimativas de toxicidade aguda para efeitos crônicos, do que o uso de parâmetros como a CL_{50}/CE_{50} e a CENO (Smit *et al.* 2001).

Outra alternativa aos modelos descritivos são os modelos mecanísticos desenvolvidos dentro da Teoria do Balanço Dinâmico de Energia (*Dynamic Energy Budget* – DEB; Kooijman 2000, 2001). A teoria DEB descreve como os organismos adquirem e usam a energia baseados numa série de regras simples de organização metabólica. Dentro desta abordagem, os organismos são tratados como sistemas dinâmicos, com balanços de massa e energia. Baseado nesta teoria, foram desenvolvidos modelos aplicados a ecotoxicologia (DEBtox, Kooijman & Bedaux 1996) como alternativa ao uso da estatística descritiva.

A teoria DEBtox integra dados de concentração interna do agente tóxico, tempo de exposição e a biologia dos organismos, incluindo processos como alimentação (assimilação), manutenção, crescimento e reprodução. O pressuposto básico da teoria DEBtox é que os toxicantes devem ser absorvidos pelo organismo até alcançarem a concentração (interna) crítica para que exerça um efeito.

A Concentração de Não-Efeito (*No-Effect Concentration* – NEC) é um parâmetro do modelo DEBtox que representa a concentração do toxicante que não causa efeito após uma exposição prolongada. Após ultrapassar a NEC o efeito começa a aparecer. A CE_x (Concentração Efetiva a x% dos organismos) também pode ser estimada por este modelo, o que o torna bastante atraente e aplicável aos testes de toxicidade tradicionais.

No modelo DEBtox, a exposição a um agente tóxico pode ser entendida como uma mudança nos parâmetros energéticos, como aumento dos custos de manutenção, diminuição da assimilação de energia, aumento do custo energético de produção de novos tecidos (crescimento), aumento do custo de produção de prole (reprodução) ou mesmo um efeito direto como aumento do risco ao desenvolvimento do embrião (ver Kooijman & Bedaux 1996 para uma descrição mais detalhada). Com este modelo é possível inclusive a análise simultânea de *endpoints* como sobrevivência, crescimento e reprodução, utilizando um único experimento (Jager *et al.* 2004, Jager *et al.* 2006).

EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO VS *IN SITU*

Os testes realizados *in situ* tendem a ser mais realísticos do que os realizados em laboratório, pois avaliam em tempo real os processos dinâmicos, como sinergismo ou antagonismo, que ocorrem nos ecossistemas aquáticos, refletindo na maior ou menor toxicidade para os diferentes organismos. Este tipo de testes tem como vantagem a coleta contínua de dados em uma série de variáveis físico-químicas (por exemplo, oxigênio dissolvido, temperatura, pH, turbidez, etc.) que podem causar efeitos tóxicos não imputáveis ao agente tóxico, ou que podem afetar a expressão da toxicidade.

Nesses experimentos, os organismos-teste são expostos em gaiolas às condições do corpo de água receptor. Este tipo de avaliação de toxicidade é também conhecido como biomonitoramento ativo. A resposta toxicológica pode ser avaliada através dos efeitos observados em intervalos regulares, ou por sistemas (semi) automáticos de medição contínua. A primeira opção é normalmente associada com critérios como a mortalidade, crescimento e reprodução, enquanto os dispositivos automáticos são mais adequados para avaliar uma resposta fisiológica ou comportamental. Mais adiante, falaremos destes sistemas de biomonitoramento automático.

Estudos *in situ* podem ser realizados utilizando uma única espécie ou várias espécies (testes multiespécies), avaliando as interações entre os organismos. Os testes multiespécies também podem ser realizados em laboratório, em sistemas de microcosmos que são constituídos de amostras do ecossistema natural

(água, sedimento, plantas, invertebrados, peixes etc.) em pequena escala (Aragão & Araújo 2006).

Segundo Mount (1985) os testes com várias espécies seriam mais úteis para assegurar a proteção dos ecossistemas e menos úteis para o manejo de lagos e rios. O autor também conclui que, embora os testes de toxicidade com uma única espécie possam apresentar falhas, eles continuarão sendo utilizados para fins legais, pois fornecem informações conclusivas e decisivas, fato nem sempre possível em estudos com multiespécies, que poderá ser influenciado por uma série de fatores ambientais.

Os testes em campo são indicados para avaliar o impacto de compostos novos no ambiente natural, por exemplo, quando se trata de compostos utilizados na agricultura, como agrotóxicos (Rand 1980). Este tipo de teste é requerido principalmente quando a avaliação de risco, feita com dados de laboratório, indica algum efeito adverso.

No ambiente natural, devido à redução na persistência e biodisponibilidade, os efeitos da maioria das substâncias químicas são menos danosos do que em laboratório, porém algumas se mostram realmente mais tóxicas em campo do que em condições laboratoriais (Aragão & Araújo 2006). Um exemplo é o antraceno, que em laboratório não acarreta toxicidade aguda para plantas ou animais em concentrações menores que sua solubilidade em água, mas no ambiente, com a ação de luz ultravioleta, o antraceno se torna 50.000 vezes mais tóxicos (Graney *et al.* 1995)

Em outros estudos, Boyle *et al.* (1985) e Finger *et al.* (1985) compararam a sensibilidade de várias espécies de organismos ao fluoreno, utilizando testes em laboratório e em campo. Cada espécie respondeu de forma diferente ao poluente. O fitoplâncton, o zooplâncton e a comunidade de insetos aquáticos foram mais sensíveis em testes laboratoriais do que em campo. Já as espécies de peixe testadas foram mais sensíveis aos testes realizados em campo.

Tonissi (1999) estudando o reservatório de Salto Grande comparou resultados de mortalidade obtidos em testes de toxicidade com amostras de água e sedimento em laboratório e *in situ*, utilizando como organismo-teste *D. rerio*. O autor observou que em laboratório não ocorreram mortalidades, mas em campo, as mortalidades indicaram indícios de toxicidade. Segundo o autor, os resultados em

laboratório indicaram claramente uma subestimação dos reais efeitos adversos causados pelos poluentes.

Uma das hipóteses para explicar a ausência de toxicidade em alguns ensaios em laboratório reside nas implicações das manipulações das amostras durante os experimentos laboratoriais, no controle de variáveis como luminosidade e a aeração constante, que tornam as reações químicas diferentes do ambiente natural, e também pelo fato de que as amostras de águas coletadas no campo se constituem em uma referência pontual do sistema, uma vez que várias informações não estão sendo avaliadas (Fracácio, 2006).

Tucker & Burton (1999) afirmaram que os testes laboratoriais não são apropriados para avaliação de impactos gerados por fontes não pontuais na escala de tempo. Neste sentido, Meletti (1997) atentou para o fato de que as amostragens pontuais de água não necessariamente representam a real qualidade do ambiente, ainda mais se o ambiente for um rio, onde a variabilidade espacial e temporal é muito intensa. Em contrapartida, em ambientes naturais, embora os organismos possam auxiliar na detecção dos distúrbios em longo prazo, é muito difícil estabelecer a relação causa-efeito em decorrência das alterações qualitativas e quantitativas que ocorrem nos ecossistemas. Assim, a maioria dos padrões de qualidade para a proteção da vida aquática foi e ainda são estabelecidos com base em estudos laboratoriais, os quais simulam o que pode ocorrer nos ecossistemas aquáticos com razoável aproximação (Bertoletti 2000).

BIOMONITORAMENTO AUTOMÁTICO EM TEMPO REAL

A avaliação da qualidade das águas permite geralmente a obtenção de resultados pontuais, que representam apenas a situação do momento da tomada das amostras. Para que se obtenham dados representativos da variação temporal da qualidade das águas em ambientes como rios, mares e lagos, é necessária uma grande quantidade de amostras, tomadas a intervalos regulares. Isto requer implicações de custo e esforço logístico altos.

Como foi dito anteriormente, muitos efeitos indiretos e subletais podem ocorrer a médio ou longo prazo, em diferentes intensidades, podendo causar a redução das populações das espécies atingidas (Jensen & Bro-Ramussen 1992, Cabrera *et al.* 1998). Os

testes de toxicidade crônica são bons na determinação destes efeitos subletais, porém tem longa duração e custos mais elevados. Estudos recentes indicam que a avaliação rápida e de ótima relação custo-benefício pode ser realizada utilizando métodos de biomonitoramento automático em tempo real através de respostas comportamentais de invertebrados e peixes (Little & Finger 1990, Sheed *et al.* 2001, Untersteiner *et al.* 2003).

Dentro da hierarquia da organização biológica, o comportamento é uma resposta toxicológica que reflete o efeito de todos os níveis do organismo e representa a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais (Grue *et al.* 2002). Dessa forma, o comportamento tem sido explorado em vários sistemas biosensores para a detecção de alterações ambientais através da análise de imagem em tempo real (Charoy *et al.* 1995, Dodson *et al.* 1995, Sorensen *et al.* 1995, Tahedl & Häder 1999, Tahedl & Häder 2001).

A alteração no comportamento é um alerta para o tipo de dano ou estresse causado por uma substância, e este estresse causará a redução ou aumento do metabolismo. Segundo Olla *et al.* (1980) e Schreck *et al.* (1997), quando um animal é exposto a uma perturbação, a primeira resposta de defesa é comportamental, na maioria das vezes um comportamento de fuga, desenvolvido para diminuir a probabilidade de morte ou economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica.

O biomonitoramento automático faz uso de organismos aquáticos para fornecer um aviso adiantado da presença de substâncias tóxicas na água. Este conceito tem sido aplicado no monitoramento de efluentes industriais, para detectar processos de tratamento incompletos em Estações de Tratamento de Efluentes, no auxílio a agravos ambientais devido a derramamento tóxico acidental/intencional ou no monitoramento de fontes de água potável utilizadas para o abastecimento público de água.

Os sistemas de advertência utilizados têm as seguintes características básicas (BBE 2004):

- Os organismos são mantidos em laboratório ou em campo, sob circunstâncias controladas, e expostos, em uma base freqüente ou contínua do fluxo, ao efluente ou à água que está sendo avaliada.
- Parâmetros fisiológicos ou comportamentais do organismo são monitorados por dispositivos que armazenam e comparam a uma faixa de

comportamento normal do biosensor (espécie sentinela que gera respostas associadas a parâmetros externos), passando a responder às circunstâncias anormais indicadas pelo organismo.

- A função do organismo biosensor é, primeiramente, detectar mudanças na toxicidade, a curto prazo, da fonte a qual ele está sendo exposto.

Vários grupos de organismos têm sido utilizados como espécies sentinelas ou biosensoras em sistemas de biomonitoramento automático em tempo real, como por exemplo: algas, cladóceros, bivalves, peixes e microorganismos.

Microalgas: As mudanças na composição algal, a estrutura da população e a distribuição são usadas por muitos anos para extrair conclusões sobre a saúde de um corpo de água, e no que diz respeito à ecologia. As populações de fitoplâncton são estimadas tipicamente medindo-se a concentração de clorofila. As medidas são feitas com fluorímetros e podem ser intermitentes ou contínuas. Esta tecnologia tem sido estendida recentemente para avaliar substâncias tóxicas. A empresa alemã BBE Moldaenke (*Biological Biophysical Engineering*) desenvolveu um sistema, o “Algae Toximeter” (mede a atividade fotossintética da alga), para sinalizar substâncias tóxicas na água em tempo real. Nesse sistema, as algas, que são cultivadas automaticamente e independentemente, são adicionadas a uma amostra de água e a concentração ativa de clorofila é medida. Se as algas forem danificadas, por exemplo, por um herbicida que reduza a atividade fotossintética das algas, um alarme é induzido.

Cladóceros: O comportamento da natação dos dafinídeos pode ser usado para avaliar a presença de substâncias tóxicas na água. O comportamento dos indivíduos é observado através de sistemas de câmera de vídeo. As imagens são analisadas em linha por um computador para detectar modificação do comportamento de natação. Um alarme é soado quando ocorrem modificações estatisticamente significativas do comportamento de natação (Wolf *et al.* 1998, Dodson *et al.* 1995, Lechelt *et al.* 2000).

Bivalves: A base conceitual para o sistema encontra-se no mecanismo comportamental de defesa dos bivalves. Sob condições normais as valvas dos bivalves permanecem abertas para permitir a respi-

ração e a alimentação. Sob condições adversas do ambiente, as valvas se fecham para evitar irritação. O comportamento de abertura e fechamento das valvas é usado como parâmetro biológico para se medir o efeito de substâncias tóxicas ou condições adversas. Organismos individuais são monitorados continuamente por sensores eletromagnéticos de alta frequência de indução ou por sensores de proximidade ligados a um sistema de levantamento de dados para analisar os sinais. O comportamento atual do movimento das valvas é comparado com os dados históricos do mesmo indivíduo. Se as mudanças significativas no comportamento forem detectadas, o sistema soará um alarme. Alguns sistemas são programados a ativarem a coleta automática de uma amostra da água, para posterior análise físico-química (Kramer *et al.* 1989, Borcherdig & Jantaz 1997).

Peixes: Os sistemas utilizam parâmetros comportamentais, como velocidade média, movimento opercular, número de giros etc., que são monitorados por câmeras (Kato *et al.* 2004), ou parâmetros eletrofisiológicos, onde os peixes são monitorados por eletrodos (van Der Schalie *et al.* 2004). Ambos os sistemas podem disparar alarme e fazer coleta automática de amostras de água para a análise química quando um evento tóxico ocorrer. As descargas elétricas de órgãos de peixes elétricos tropicais são também usadas como um sistema de advertência adiantado para monitoramento da qualidade da água (Pimentel-Souza & Siqueira 1992). O sistema é baseado na caracterização do tempo do sinal elétrico emissor pelos peixes que podem variar com a qualidade físico-química da água. Os sinais elétricos de peixes individualmente confinados são registrados em intervalos regulares de tempo, amplificados, e processados para detectar o comportamento elétrico incomum.

Microorganismos: Um dos microorganismos utilizados para este tipo de biomonitoramento é *Euglena gracilis*, no sistema denominado ECOTOX, desenvolvido por Hader & Lebert (1985). Esses autores observaram que parâmetros fisiológicos como a precisão de orientação gravitacional, mobilidade, velocidade e formato da célula são bastante sensíveis a substâncias tóxicas e radiação UV, tornando *E. gracilis* um ótimo biosensor. O sistema de biomonitoramento ECOTOX é baseado em mudanças no comportamento de movimento de uma única célula de *Euglena gracilis* induzidas por tóxicos. Este tipo de sistema compara mobi-

lidade, velocidade, orientação e forma das células dos organismos-teste em uma suspensão controle com o comportamento dos mesmos organismos após a adição da amostra-teste de água. Essas medições são feitas automaticamente usando um sistema analisador de imagem em tempo real provido de uma câmera CCD de alta resolução.

Na França, Inglaterra, Alemanha e Países Baixos, grande esforço foi feito na concepção e validação de sistemas de biomonitoramento automático de alerta. Em Maio de 1993, estes esforços culminaram em uma demonstração dos resultados em uma conferência na Alemanha, organizada pelo Escritório Federal Alemão de Saúde (*Bundes Gesundheitsamt - Institut für Wasser-Boden-und Lufthygiene*), conjuntamente ao Ministério Federal para Pesquisa e Tecnologia (*Bundesministerium für Forschung und Technologie*) e a SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*). Durante esta conferência foram apresentados os resultados obtidos com um grande número de dispositivos de sistemas de Biomonitoramento automático em tempo real (muitos dos quais estão comercialmente disponíveis no momento). As principais conclusões de quatro anos de estudos comparativos sobre a aplicabilidade de cerca de 20 dispositivos de biomonitoramento automático em tempo real, é que uma bateria de testes, com base em diferentes espécies e respostas fisiológicas, deve ser operado simultaneamente, a fim de detectar níveis ambientais de uma vasta gama de substâncias tóxicas. Sistemas com base nos seguintes princípios foram sugeridos a serem instalados em estações para biomonitoramento da qualidade da água:

- comportamento de natação de dafnídeos;
- produtividade de alga;
- redução de luz em bactérias luminescentes.

A Alemanha detém os sistemas mais sofisticados e mantém uma extensa rede de estações de biomonitoramento em tempo-real. Para monitorar a qualidade das águas superficiais foram instaladas 32 estações de biomonitoramento automático na bacia do rio Reno, acomodadas em contêineres fixados próximos a margens de rios, utilizando como biosensores peixes, algas, moluscos e microcrustáceos (NWQMC 2002).

No Reino Unido, o monitoramento contínuo é baseado em respostas eletrofisiológicas de trutas em cativeiro, onde os peixes são mantidos conectados

permanentemente a eletrodos. Este dispositivo é patenteado e comercializado na Europa, sendo denominado de MARK III (Gruber & Diamond 1993).

Atualmente a Marinha americana (EUA) vem desenvolvendo e aperfeiçoando no “U.S. Army Center for Environmental Health Research” equipamentos para biomonitoramento em tempo-real, operando uma estação automatizada utilizando peixes como organismos sensores para avaliar a eficiência de uma estação de tratamento criada com o objetivo de monitorar o processo de despoluição de lençóis freáticos contaminados por resíduos da produção e armazenamento inadequado de produtos para fabricação de armamentos em uma base Naval (Sheed *et al.* 2001). Possui ainda uma versão portátil, IABS - AC 1090 – *Intelligent Aquatic BioMonitoring System*[®] (USACEHR 2004), para ser particularmente usada em estações de tratamento de efluentes e reservatórios de abastecimento de água. Tem sido usado com sucesso em um dos reservatórios de água que abastece a cidade de Nova York.

Várias universidades americanas também têm investido na aplicação do biomonitoramento automático em tempo real. Podemos citar a parceria entre a Marinha Americana (*U. S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine*) e a Universidade de Maryland (*Aquatic Pathobiology Center*), com a implantação de um sistema denominado Sistema de Proteção Ambiental em Tempo-Real, para monitoramento de rios na Baía de Chesapeake, através do programa *Environmental Monitoring for Public Access and Community Tracking* (EMPACT 2006). Este programa vem, inclusive, monitorando a toxicidade causada por florações de algas nocivas na Baía de Chesapeake, utilizando a resposta ventilatória de peixes (van Der Schalie *et al.* 2001).

A Universidade do Norte do Texas desenvolve um projeto denominado “CLAM”, sistema baseado no comportamento de abertura das valvas em moluscos bivalves (UNT 2005). Investimentos semelhantes têm sido desenvolvidos em empresas privadas (Biosensor[®]), para avaliação de toxicidade em rios ou outras perturbações provocadas por efluentes industriais (Gruber & Diamond 1988).

O desenvolvimento de programas computacionais, em conjunto com a evolução dos equipamentos de captura e registro de imagem, tanto analógica quanto digital, possibilitou a abertura de uma nova perspectiva

metodológica para a avaliação ecotoxicológica em tempo real. No entanto, a maioria dos métodos de biomonitoramento automático empregados nas duas últimas décadas permanece no estágio de laboratório. Apenas uns poucos foram testados em condições de campo e realmente alguns estão disponíveis comercialmente.

No Brasil, até o momento só existem dois trabalhos nessa área, o estudo sobre biomonitoramento em tempo real realizados na década de 80 pelo Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) juntamente com pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA) e um mais recente, desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O primeiro estudo tinha como objetivo desenvolver um sistema de controle de poluição de água doce por substâncias específicas (metais pesados particularmente pelo seu efeito altamente tóxico), através do uso do peixe *Gymnotiformes sulamericanos* (Pimentel-Souza & Siqueira 1992). Devido à dificuldade em obter financiamento, a equipe desagregou-se. Em 1996, pesquisadores da Universidade de Nancy, França, sem tradição nesta pesquisa científica, haviam solicitado patente do processo (Thomas *et al.* 1996). Após este período, os pesquisadores brasileiros conseguiram financiamento que resultou em trabalhos para literatura científica, não alcançando fins comerciais.

O segundo estudo utiliza a atividade natatória do peixe *Danio rerio* como resposta ao estresse tóxico, através de um sistema analisador de imagem (Videomex-V, Columbus Instruments, USA). Este estudo encontra-se em fase avançada, com atividades voltadas para laboratório. Em 2007, Magalhães *et al.* publicaram um estudo relatando o efeito do hipoclorito de sódio na velocidade média de natação, conseguindo detectar concentrações abaixo de 50% da CL_{50} (24h) em 2 horas de exposição. Outro estudo recente demonstrou a aplicabilidade deste sistema de biomonitoramento na detecção de toxinas de cianobactérias, utilizando *D. rerio* e *Daphnia pulex* (Ferrão-Filho *et al.* 2007). As pesquisas continuam em andamento com o peixe *D. rerio* para diferentes agentes tóxicos, além de estudos utilizando outros organismos biosensores, como

para detecção de alterações comportamentais em peixes *Poecilia vivipara* parasitados pelo trematódeo *Acanthocollariotrema umbilicatum* e com *Daphnia*, submetidas à cianobactérias tóxicas.

Vários estudos demonstraram a eficiência na detecção de compostos químicos por peixes através do comportamento, salientando a velocidade de resposta a exposições subletais. *Oncorhynchus mykiss* respondeu a vários poluentes em 40 min para 10-25% da CL_{50} (Baldwin *et al.* 1994), em 1h para compostos orgânicos e para concentrações menores que 50% da CL_{50} (96h) (Kaiser *et al.* 1995). *Carassius auratus* respondeu com aumento da atividade natatória em 4h de exposição a carbofuranos (Saglio *et al.* 1996) e *Apteronotus albitrons* detectou concentrações de 44 e 69,6µg/L de cianeto de potássio em 17 e 6 minutos, respectivamente (Thomas *et al.* 1996).

Estes estudos evidenciam a importância do desenvolvimento de biomonitores para melhor avaliar o potencial efeito de contaminantes no ambiente, pois a informação é gerada rapidamente comparada a outros testes de sensibilidade toxicológica, tais como: a) os agudos, que só irão determinar concentrações letais entre 24 a 96h de exposição; b) os crônicos, que só dão respostas em longo prazo (ex. crescimento e reprodução); c) o uso de biomarcadores, que só é possível após um período relativamente longo de exposição, entre outros. Em contraste com as análises físico-químicas, os biomonitores facilitam uma indicação inespecífica dos poluentes, incluindo efeitos sinérgicos e antagonísticos, no monitoramento da água.

Os sistemas de biomonitoramento em tempo real são uma alternativa eficiente para avaliação toxicológica, pois são capazes de detectar alterações comportamentais induzidas por concentrações que não causam mortalidade, mas que possam ter implicações ecológicas para as populações aquáticas. É um método não-invasivo, prático, bastante sensível, apropriado para pesquisas ecotoxicológicas e para uma gama de aplicações, tendo a vantagem de: a) ter sensibilidade elevada comparável com outros testes toxicológicos; b) ter a capacidade de monitorar de forma automática sem causar perturbação ao organismo-teste; c) os organismos respondem com mudanças comportamentais dentro de curtos períodos de tempo.

Contudo, de acordo com outros indicadores toxicológicos, a extrapolação das respostas comportamentais para efeitos que podem ocorrer em popula-

ções naturais é difícil de interpretar. Embora sejam de difícil avaliação, estes estudos demonstram melhor a realidade do ambiente do que os testes de exposição aguda. Além disso, o comportamento pode ser usado como um indicador de toxicidade subletal válido e consistente, podendo ser facilmente incorporado em protocolos para avaliar a sensibilidade dos testes de toxicidade padrão (Little & Finger 1990).

LEGISLAÇÃO BRASILEIRA REFERENTE A ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

A ecotoxicologia é uma área ainda pouco explorada no Brasil e, além disso, nossas leis ambientais com relação a análises ecotoxicológicas na avaliação de poluição estão em estágio de construção. A Resolução CONAMA nº 357/2005 além de estabelecer a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, também regulamenta as condições e padrões de lançamento de efluentes, proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida, ou seja, os efluentes líquidos industriais e domésticos devem atender aos Padrões de Emissão, atendendo aos Padrões de Qualidade, em situações críticas de vazão.

Esta resolução limita uma série de potenciais contaminantes no ambiente e acrescenta, em seu artigo 7º, §4º, que “*as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos*”. Acrescenta ainda que no caso de lançamento de efluentes líquidos industriais provenientes de indústrias químicas, petroquímicas e siderúrgicas, poderão ser estabelecidas exigências adicionais para cada caso específico, em termos de toxicidade crônica.

A resolução CONAMA 357/2005 é uma legislação federal e por isso permite a formulação de leis mais restritas de acordo com a necessidade de cada estado brasileiro, ficando livres para estabelecerem seus próprios limites de toxicidade. Muitos são os laboratórios de instituições oficiais que realizam testes de toxicidade. Cada vez mais esta ferramenta tem sido reconhecida como um forte instrumento de avaliação de impacto ambiental. No Brasil o Instituto

Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Companhia Estadual de Tecnologia Ambiental (CETESB-SP), Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina (FATMA-SC), Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA-RJ), Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM-RS), Instituto Ambiental do Paraná (IAP-PR) e a Companhia Pernambucana de Meio Ambiente (CPRH-PE), recomendam a utilização da análise de toxicidade através de testes com organismos-padronizados internacionalmente como um forte instrumento para avaliação do potencial de impacto das substâncias químicas ou efluentes lançados no ambiente.

Em São Paulo, os parâmetros e limites a serem obedecidos, tanto para Padrão de Emissão (efluentes líquidos) como para Padrão de Qualidade (corpos hídricos receptores), constam no regulamento da Lei 997, de 31.05.76, do Estado de São Paulo, aprovado pelo Decreto 8.468, de 08.09.76. Esta lei institui o Sistema de Prevenção e Controle da Poluição do Meio Ambiente e proíbe o lançamento ou liberação de poluentes nas águas, no ar ou no solo que os tornem, ou possam tornar, impróprios, nocivos ou ofensivos à saúde; inconvenientes ao bem estar público; danosos aos materiais, à fauna e à flora e prejudiciais à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade. A Resolução SMA-3, de 22.02.2000, acrescenta a Lei n. 997/76, determinando que os efluentes lançados não deverão causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com as normas que fixam a toxicidade permissível. Além disso, os limites de toxicidade são estabelecidos para cada efluente, podendo ser reavaliados pela CETESB, desde que a entidade responsável pela emissão apresente estudos sobre: a toxicidade do efluente a pelo menos três espécies de organismos aquáticos, a variabilidade da toxicidade ao longo do tempo e, a dispersão do efluente no corpo receptor.

No estado do Rio de Janeiro, a Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA-RJ), através da norma técnica NT-213/1990, estabelece critérios e padrões para controle da toxicidade em efluentes líquidos industriais, utilizando testes de toxicidade com organismos aquáticos vivos, de modo a proteger os corpos d'água da ocorrência de toxicidade aguda ou crônica de acordo com a NT-202/1986 e DZ-209/1990, como parte integrante do Sistema de

Licenciamento de Atividades Poluidoras – SLAP. O controle de efluentes líquidos industriais é feito através do estabelecimento de padrões de toxicidade para o efluente como um todo, não sendo permitido o lançamento de efluentes líquidos industriais, em qualquer corpo receptor, com um número de unidades de toxicidade superior a 8 (oito), obtido em testes de toxicidade aguda realizados com peixes *D. rerio*.

O IAP-PR e a FATMA vem estudando desde o ano de 1992 a implementação dos métodos de testes de toxicidade para avaliação ecotoxicológica de efluentes com objetivo de elaborar uma proposta de lei, onde há limites de lançamento de toxicidade para efluentes industriais. Essa proposta de limites de toxicidade para efluentes industriais teve como base a análise dos dados obtidos pelos órgãos ambientais dos estados de Santa Catarina (FATMA) e do Paraná (IAP). A partir disso, foi criada a Portaria nº 017/02 – FATMA de 18.04.2002, que estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens

(Tabela II). Esses limites são estabelecidos através do fator de toxicidade que representa o menor fator de diluição que causa até 10% de efeito nos organismos. Esta lei determina que as substâncias existentes no efluente não poderão causar ou possuir potencial causador de efeitos tóxicos capazes de provocar alterações no comportamento e fisiologia dos organismos aquáticos presentes no corpo receptor.

Enquanto ainda não se definem quais serão os valores adotados pelos órgãos de fiscalização para a toxicidade máxima permitida nos lançamentos de efluentes das indústrias no Brasil, o uso dos biotestes pelas empresas com efluente potencialmente poluidor permite as empresas comunicar à comunidade e aos seus clientes, que a água que está saindo de seu processo de tratamento não apenas atende aos parâmetros de lançamento da legislação ambiental em vigor, mas também não apresenta efeitos nocivos para os corpos hídricos receptores, o que, certamente tem efeito muito positivo de marketing ambiental.

Tabela II. Limites Máximos de Toxicidade Aguda para os microcrustáceos - *Daphnia magna* e para a bactéria bioluminescente - *Vibrio fischeri*, dos efluentes de diferentes categorias segundo a portaria 017/02 FATMA. FDd - Fator de Diluição para *D. magna*; FDbI - Fator de Diluição para *V. fischeri*; FD = 1 – amostra bruta não tóxica.

Table II. Maximal limits for acute toxicity for the microcrustacean *Daphnia magna* and for the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* in effluents of different types according with the PORTARIA 017/02 FATMA. FDd – dilution factor to *D. magna*; FDbI – dilution factor to *V. fischeri*; FD = 1 – gross non-toxic sample.

Origem dos Efluentes		FDd	FDbI
Categoria da atividade	Subcategoria da atividade		
Metal mecânica	Siderurgia	4	6
	Metalurgia	4	6
	Galvanoplastia	16	8
Alimentícia	Frigoríficos, Abatedouros, Laticínios, Cerealistas, Bebidas, Fecularias, Alimentos	2	4
Esgotos domésticos e/ou hospitalares		1	4
Resíduos urbanos	Efluentes de Aterros Sanitários	8	16
Papel e Celulose		2	4
Couros, peles e produtos similares		4	6
Química	Agroquímica, Petroquímica, Produtos químicos não especificados ou não classificados	2	4
Têxtil	Beneficiamento de fibras naturais e sintéticas, confecção e tinturaria	2	2
Farmacêutica		2	4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises químicas são imprescindíveis na identificação e na quantificação de compostos químicos específicos no ambiente, mas aqueles não cobertos pela técnica analítica são negligenciados (Fent 2003). Além disso, a caracterização química de uma amostra ambiental, não indica o potencial tóxico de uma mistura complexa aos organismos aquáticos, assim como a ausência ou presença de toxicidade nos despejos tratados (Zagatto *et al.* 1992).

No Brasil, estudos sobre a redução de toxicidade em estações de tratamento de efluentes líquidos, domésticos e industriais, estão sendo iniciados e poucas informações estão disponíveis. Embora existam dados físico-químicos que avaliam a eficiência das estações de tratamento existentes, nada se sabe sobre os efeitos potenciais que a carga poluente remanescente pode causar ao corpo receptor, em termos ecotoxicológicos.

O controle da toxicidade de resíduos lançados no ambiente aquático é de suma importância para a saúde do ecossistema e do homem. Os testes de ecotoxicidade podem ser utilizados para demonstrar a probabilidade de toxicidade de uma fonte de poluição para a biota dentro de um corpo de água receptor. Baseando-se no pressuposto de que se um agente é tóxico para uma ou mais espécies em um sistema de teste, é provável de ser tóxico para importantes componentes do ecossistema e, portanto, capaz de causar impacto ambiental negativo.

Uma alternativa ao uso de testes de toxicidade com respostas como mortalidade, crescimento e reprodução, para avaliar o impacto ambiental, é utilizar alterações comportamentais ou fisiológicas através de sistemas de biomonitoramento automático. Através das análises de indicadores comportamentais sensíveis e apropriados, no futuro, as substâncias lançadas no ambiente poderão ser reduzidas a níveis que protejam a viabilidade dos seres vivos, não apenas seu envolvimento com a mortalidade, mas também prevenindo alterações no comportamento e garantindo a estrutura das comunidades aquáticas.

A Ecotoxicologia é, portanto, uma ferramenta que pode ser utilizada antes ou após um evento de poluição ter ocorrido. Antes, para investigar os efeitos relativos da introdução de uma substância química isolada ou uma mistura de substâncias. Nestes estudos

preliminares, diferentes tipos de testes devem ser realizados para avaliar a toxicidade do agente tóxico e garantir que este não irá causar danos à biota. Após, para avaliar o efeito adverso produzido no ambiente pela introdução de uma substância isolada ou uma mistura, considerando as interações químicas, físicas e biológicas com os fatores abióticos do ambiente.

Os resultados provenientes dos estudos ecotoxicológicos podem ser empregados como instrumento de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas de maneira a detectar impactos acidentais ou decorrentes da implantação de empreendimentos produtivos, sendo utilizadas como prova cientificamente aceita das alterações ambientais provocadas por ações criminosas. Podem servir ainda como instrumento regulador, proibindo ou liberando o uso de novos produtos químicos.

REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 1992. *Água – Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae)*. Norma ABNT-NBR 12648. 8p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 1993. *Água – Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea)*. Norma ABNT-NBR 12713. 16p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2003. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de Ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Cladocera, Crustácea)*. Norma ABNT - NBR 13373. 12 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2004a. *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp.* Norma ABNT-NBR 12713. 21p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2004b. *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes*. Norma ABNT-NBR 15088. 19p.
- ADAMS, W.J.; KIMERLE, R.A. & BARNETT, J.W. 1992. Sediment quality and aquatic life assessment. *Environmental Science and Technology*, 26 (10): 1865-1875.
- ANHOLT, B.R. 1997. How should we test for the role of behavior in population dynamics. *Evolutionary Ecology*, 11: 633-640.
- ARAGÃO, M.A. & ARAÚJO, R.P.A. 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. Pp 117-147. In: P.A. Zagatto & E. Bertolotti (eds.), *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. Editora Rima. São Paulo, São Carlos. 478p.
- AZEVEDO, F.A. & CHASIN, A.A.M. 2003. *As bases*

- toxicológicas da Ecotoxicologia*. Editora Rima, São Paulo, São Carlos. 340p.
- BAILLIEULK, M & SCHEUNDERS, P. 1998. On-line determination of the velocity of simultaneously moving organisms by image analysis for the detection of sublethal toxicity. *Water Research*, 32: 1027-34.
- BALDWIN, I.G.; HARMAN, M.M.I. & NEVILLE, D.D. 1994. Performance characteristics of a fish monitor for detection of toxic substances. I: laboratory trials. *Water Research*, 28: 2191-2199.
- BAPTISTA, I.E.; SOARES, C.H.L.; MATIAS, W.G.; LOPES, E.B. 2000. Avaliação da toxicidade Aguda de efluentes de uma indústria textil utilizando *Daphnia Magna*, *Poecilia reticulata* e *Vibrio fisheri* como bioindicadores. Pp 365-377. In: E.L.G. Espíndola; C.M.R.B. Paschoal, O.Rocha, M.B.C. Bohrer & A.L. Oliveira Neto. (eds.). *Ecotoxicologia, Perspectivas para o século XXI*. Rima, São Paulo, São Carlos. 576p.
- BARBOSA, R. M.; POVINELLI, J.; ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E.L.G. 2000. A Toxicidade de Efluentes (Lodo) de Estações de Tratamento de Água a Dalfinídeos (*Daphnia Similis*), Quironomídeos (*Chironomus Xanthus*) e Peixes (*Hyphessobrycon Egues*). Pp 379-394 In: E.L.G. Espíndola; C.M.R.B. Paschoal, O.Rocha, M.B.C. Bohrer & A.L. Oliveira Neto. (eds.). *Ecotoxicologia, Perspectivas para o século XXI*. Rima, São Paulo, São Carlos. 576p.
- BAUN, A.; KLOEFT, L.; BJERG, P.L. & NYHOLM, N. 1999. Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with land fill leached. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(9): 2046-2053.
- BBE. Biological Biophysical Engineering: <http://www.bbe-moldaenke.de/home.html> (acesso em 15/Dez/2004).
- BELANGER, S.E. & CHERRY, D.S. 1990. Interacting effects of pH acclimation, pH and Heavy metal on acute and chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera). *Journal of Crustacean Biology*, 10(2): 225-235.
- BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E.G. & NIPPER, M.G. 1989. Toxicidade de águas superficiais na Região da Grande São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia*, 2(2): 1-20.
- BERTOLETTI, E. 2000. *Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com Danio rerio (Pisces, Cyprinidae)*. Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- BERTOLETTI, E. & ZAGATTO, P.A. 2006. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e Legislação pertinente. Pp 347-379. In: P.A. Zagatto & E. Bertolotti (eds.), *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. Rima. São Paulo. São Carlos. 478p.
- BERVOETS, L.; BAILLIEUL, M.; BLUST, R. & VERHEYEN, R. 1996. Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. *Environmental pollution*, 91 (3): 333-341.
- BORCHERDING, J. & JANTAZ, B. 1997. Valva movement response of the mussel *Creissena polymorpha* – the influence of p H and turbity on the acute toxicity of pentachlorophenol under laboratory and field conditions. *Ecotoxicology*, 6: 153-165.
- BOTTA, C.M.R.; ARAUJO, R.P.A.; SILVÉRIO, P.F.; ALMEIDA, F.V. & MOZETO A.A. 2006. Avaliação ecotoxicológica de sedimentos de ecossistemas aquáticos. Pp. 135-159. In: A.A. Mozeto, G.A. Umbuzeiro & W.F. Jardim (eds.), *Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de sedimentos de Água Doce*. Editora Cubo, São Carlos, SP.
- BOYLE, T.P.; FINGER, S.E.; PAULSON, R.L. & RABENI, C.F. 1985. Comparison of laboratory and field assessment of fluorene part II: effects on the ecological structure and function of experimental pond ecosystems: Validation and Predictability of Laboratory Methods for Asssing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, ASTM. *Spec. Tech. Pub.*, 865: 134-151
- BRANCO, S.M. 1989. Considerações sobre a Nova Legislação Brasileira de Qualidade de Águas. *Revista DAE*, 49(157): 185-187.
- BUIKEMA, A.L. & VOSHELL, J.R. 1993. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. Pp. 344-398. In: D. M. Rosenberg & V. H. Resh (eds.), *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman and Hall, NY. 488p.
- BURTON JR., G.A.; GREENBERG, M.S.; ROWLAND, C.D.; IRVINE, C. A.; LAVOIE, D. R.; BROOKER, J. A.; MOORE, L.; RAYMER, D.F.N. & MCWILLIAM, R.A. 2005. *In situ* exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 134: 133-144.
- CABRERA, C.; ORTEGA, E.; LORENZO, M.L. & LÓPEZ, M.D.C. 1998. Cadmium Contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. *Reviews of Environment Contamination and Toxicology*, 154: 55-81.
- CAIRNS, J. Jr. 2002. Environmental monitoring for the preservation of global biodiversity: The role in sustainable use of the planet. *International Journal of Sustainable Development and World Ecology*, 9(2): 135-150
- CAIRNS, J.JR. & NIEDERLEHNER, B.R. 1995. *Ecological Toxicity Testing*. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 228p.

- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1983a. *Avaliação da toxicidade das águas e sedimentos dos rios da região de Cubatão*. São Paulo: CETESB, Relatório Técnico, 10p.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1983b. *Ensaio biológico com água e sedimento da represa Billings*. São Paulo: CETESB, Relatório técnico, 29p.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1990. *Água – Teste de toxicidade aguda com peixes – Parte II – Sistema Semi-Estático*. Norma CETESB-L5.019-II. 29p.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1994. *Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea)*. Norma CETESB-L5.018. 25p.
- CHAPMAN, P.M.; FAIRBROTHER, A. & BROWN, D. 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 99–108.
- CHAPMAN, P.M.; POWER, E.A. & BURTON JR., G.A. 1992. Integrated assessments in aquatic ecosystems. In: G.A Burton (ed.), *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- CHAROY, C.P.; JANSSEN, C.R.; PERSOONE, G. & CLÉMENT, P. 1995. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotífer) under toxic stress. I. the use of automated trajectory for determining sublethal effects of chemicals. *Aquatic Toxicology*, 32: 271-282.
- CHASIN, A.A.M. & AZEVEDO, F.A. 2003. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: F.A. Azevedo & A.A.M. Chasin (eds.), *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. Rima, São Paulo, São Carlos.
- CRANE, M. & NEWMAN, M.C. 2000. What level of effect is a no observed effect? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:516–519.
- DE ZWART, D. 1995. *Monitoring Water Quality in the Future* (Volume 3): Biomonitoring. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM). Bilthoven, The Netherlands.
- DICKSON, K. L.; WALLER, W. T.; KENNEDY, J. H. & AMMANN, L. P. 1992. Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 1307-1322.
- DODSON, S.I.; HANAZATO, T.; GORSKI, P.R. 1995. Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and Chaoborus kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 43-50.
- E.C. (European Community). 1978. Council Directive of July 1978 on the quality of freshwaters needing protection or improvement in order to support fish life. *Official J. Europ. Communities*, 21(L 222): 1-10.
- EAGLESON, K.W.; LENAT, D.L.; AUSLEY, L.W. & WINBORNE, F. B. 1990. Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:1019-1028.
- EMPACT – *Environment monitoring for public assess and community tracking*: <http://aquaticpath.umd.edu/empact> (acesso em 10/08/2006).
- FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente). 1986. *Critérios e Padrões Para Lançamento de Efluentes Líquidos, NT 202.R-10 de 12/12/86*. Rio de Janeiro: FEEMA.
- FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente). 1990. *Critérios e Padrões para Controle da Toxicidade em Efluentes Líquidos Industriais, NT 213. R- 4 de 4/4/90*. Rio de Janeiro: FEEMA.
- FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente). 1990. *Diretriz de controle de efluentes líquidos industriais, DZ-209.R-2 de 25/06/97*. Rio de Janeiro: FEEMA.
- FENT, K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letter*, 140: 353-365.
- FERRÃO-FILHO, A.S.; DEMOTT, W.R. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2000. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria in the life-history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 45: 1-19.
- FERRÃO-FILHO, A. S.; CUNHA, R., MAGALHÃES, V. F.; SOARES, M. C. S. & BAPTISTA, D. F. 2007. Evaluation of sub-lethal toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicological*, 2(2): 1-8.
- FERRÃO-FILHO, A. S.; COSTA, S. M.; RIBEIRO, M. G. L. & AZEVEDO S. M. F. O. 2008. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*, 23: 161-168.
- FERRÃO-FILHO, A.S., SOARES, M.C.S., MAGALHÃES, V.F. & AZEVEDO S.M.F.O. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (no prelo).
- FINGER, S.E.; LITTLE, E.E.; HENRY, M.G.; FAIRCHILD, J.F. & BOYLE, T.P. 1985. *Comparison of laboratory and field assessment of fluorine -part I: effects of fluorene on the survival, growth, reproduction, and behavior of aquatic organisms in laboratory tests: American Society for Testing and Materials Special Technical Testing Publication 865*. ASTM, Philadelphia, PA.:120-133 (90464).

- FRACÁCIO, R.; RODGHER, S.; ESPINDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; LIMA, D.; NASCIMENTO, A.P. & RODRIGUES, M.H. 2000. Abordagem ecotoxicológica. Pp. 131-144. In: E.L.G. Espindola, J.S.V Silva, C.E. Marinelli & M.M. Abson (eds.), A bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho. Rima, São Carlos, SP. 188p.
- FRACÁCIO, R. 2006. *Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e in situ), com ênfase na toxicidade de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (Danio rerio e Poecilia reticulata) - Sub-bacia do rio Monjolinho (São Carlos, SP)*. Tese de Doutorado. Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil. 209p.
- GRANEY, R.L.; GIESY, J.P. & CLARK, J.R. 1995. Field studies. In: G.M. Rand (ed.), *Fundamentals of aquatic toxicology* (Second Edition). 1125p.
- GRUBER, D. & DIAMOND J.M. 1988. *Automated biomonitoring: living sensors as environmental monitors*. Ellis Horwood Limited, Chichester, London. 208p.
- GRUE, C.E.; GARDNER, S.C. & GIBERT, P.L. 2002. On the Significance of Pollutant-induced Alterations in the Behaviour of Fish and Wildlife. Pp 1-90. In: G. Dell'Omo (ed.), *Behavioural Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, LTD. ISBN 0-471-96852-8.
- GUALTIERI, P.; GHETTI, F.; PASSARELLI, V. & BARSANTI L. 1988. Microorganism Track reconstruction: an image processing approach. *Comput Biol Med*, 18: 57-63.
- GUALTIERI, P. & COLTELLI, P. 1989. A digital microscope for real time detection of moving microorganism. *Micron Microsc Acta*, 20: 99-105.
- GUNATILAKA, A. & DIEHL, P. 2000 A Brief Review of Chemical and Biological Continuous Monitoring of Rivers in Europe and Asia Pp 9-28. In: BUTTERWORTH, GUNATILAKA, GONSEBATT (eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Volume II. New York, Plenum Press.
- GUO, N. & XIE, P. 2006. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution*, 143: 513-518.
- HADER, D.P. & LEBERT, M. 1985. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 42: 509-14.
- HAVENS, K. E. 1992. Acid and aluminum effects on sodium homeostasis and survival of acid-sensitive and acid-tolerant cladocera. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 49: 2393-2398.
- JAGER, T.; CROMMENTUIJN, T.; GESTEL, C.V. & KOOIJMAN, S. 2004. Simultaneous modeling of multiple endpoints in life-cycle toxicity tests. *Environmental Science and Technology*, 38: 2894-2900.
- JAGER, T.; HEUGENS, E. & KOOIJMAN, S. 2006. Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models. *Ecotoxicology*, 15: 305-314.
- JENSEN, A. & BRO-RAMUSSEN, F. 1992. Environmental cadmium in Europe. *Reviews of Environment Contamination and Toxicology*, 125:101-181.
- KAISER, K.L.E.; MCKIMON, M.B.M.; STANDAHL, D.H. & PETT, W.B. 1995. Response threshold levels of selected organic compounds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 2107-2013.
- KATO, S.; NAKAGAWA, T.; OHKAWA, M.; MURAMOTO, K.; OYAMA, O.; WATANABE, A.; NAKASHIMA, H.; NEMOTO, T. & SUGITANI, K. 2004. A computer image processing system for quantification of zebrafish behavior. *Journal of Neuroscience Methods*, 134(1):1-7
- KHAN, A.A.; BARBIERI, J.; SWEENEY, F. & KHAN, S. A. 1994. Estimation of ambient chronic toxicity in a polluted creek system. *Environmental Pollution*, 83: 379-382.
- KOIVISTO, S.; KETOLA, M. & WALLS, M. 1992. Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. *Hydrobiologia*, 248: 125-136.
- KOOIJMAN, S. & BEDAUX, J. 1996. *The analysis of aquatic toxicity data*. Amsterdam: VU University Press. 150p.
- KOOIJMAN, S.A.L.M. 1996. An alternative for NOEC exists, but the standard model has to be abandoned first. *Oikos*, 75: 310-316.
- KOOIJMAN, S.A.L.M. 2000. *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press Cambridge, UK. 442p.
- KOOIJMAN, S.A.L.M. 2001. Quantitative aspects of metabolic organization: a discussion of concepts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 356: 331-349.
- KRAMER K.J.M. ; JENNER, H.A. & DE ZWART, D. 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 188-189(1): 433-443.
- LECHELT, M.; BLOHM, W.; KIRSCHNEIT, B.; PFEIFFER, M.; GRESENS, E.; LILEY, J.; HOLZ, R.; LÜRING, C. & MOLDAENKE, C. 2000. Monitoring of surface water by ultrasensitive *Daphnia* taximeter. *Environmental Toxicology*, 15(5): 390-400.
- LEWIS, P.A. & HORNING II, W.B. 1991. Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 1351-1358.
- LIMA, T.A.S. 2006. *Avaliação da toxicidade dos compostos*

- xileno e tolueno através da determinação da CL_{50} utilizando o peixe *Danio rerio*. Monografia de Bacharelado. Universidade Veiga de Almeida. 33p.
- LITTLE, E.E. & FINGER, S.E. 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 13-9.
- LOMBARDI, J.V. 2004. Fundamentos de toxicologia aquática. Pp. 261-270 In: M.J.T. Ranzani-Paiva, R.M. Takemota & M.A.P. Lizama (eds.), Sanidade de organismos aquáticos. Org. Livraria Varela, São Paulo. 426p.
- MAGALHÃES, D.P.; CUNHA, R.A.; SANTOS, J.A.A.; BUSS, D.F. & BAPTISTA, D.F. 2007. Behavioral response of Zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822 to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. *Ecotoxicology* 16: 417-422.
- MARCUCELLA, H. & ABRAMSON, C.I. 1978. Behavioral toxicology and teleost fish. Pp. 33-77. In: D. J. Mostofsky (ed.), The Behavior of fish and other Aquatic Animals. Academic Press, London, UK. 393p.
- MARSCHNER, A. 1999. Biologische Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolle durch Biomonitoring. Pp. 568-576. In: J. Oehlmann & B. Markert (eds.), Ökotoxikologie-Ökosystemare Ansätze und Methoden. Ecomed, Landsberg. 576p.
- MARTINS, J.; TELES, L.O.; VASCONCELOS, V. 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33(3): 414-425.
- MELETTI, P.C. 1997. *Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba através de testes de toxicidade aguda com peixes*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos
- MOUNT, D.I. 1985. Scientific problems in using multispecies toxicity teste for regulatory purposes. Pp. 13-18. In: J. Cairns (ed.), Multispecies toxicity testing. Pergamon, New York, NY.
- NWQMC (National Water Quality Monitoring Council). Real Time Biomonitoring for environmental control and drinking water protection. *National Monitoring Conference*, 2002, Madison / Wisconsin: http://www.consulat.com.br/Real_Time_Biomonitoring.pdf (acesso em 26/Ago/2008).
- NOVELLI, A. 2005. *Estudos limnológicos e ecotoxicológicos da água e sedimento do rio Monjolinho – São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre*. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1984. *OECD Guidelines for Testing Chemicals – Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study*. Guideline 204. 9p.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1992. *OECD Guidelines for Testing Chemicals – Fish, Acute Toxicity Test*. Guideline 203. 9p.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1998. *OECD Guidelines for Testing Chemicals – Daphnia magna Reproduction Test*. Guideline 211.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2004. *OECD Guidelines for Testing Chemicals – Daphnia sp., Acute Immobilization Test*. Guideline 202. 12p.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2006. *OECD Guidelines for Testing Chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. Guideline 201. 25p.
- OLLA, B.L.; PEARSON, W.H. & STUDHOLME, A.L. 1980. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. *Rapp P-V Réun-Cons Int Explor Mer*, 179: 162-173.
- PASSARELLI, L. & GUALTIERI, P.A. 1990. Simple device for Ultramicroscopic studies of mobile microorganisms. *Micron Microsc Acta*, 21: 101-104.
- PÉRY, A.R.R.; FLAMMARION, P.; VOLLAT, B.; BEDAUX, J.J.M.; KOOIJMAN, S.A.L.M. & GARRIC, J. 2002. Using a biology-based model (DEBtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 459-465.
- PIMENTEL-SOUZA, F. & SIQUEIRA, A.L. 1992. Effect of external carbon dioxide concentration on the electric organ discharge frequency in the gymnotiform fish *Apteronotus albifrons*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25(2): 175-180.
- PLAA, G.L. 1982. Present status: toxic substances in the environment. *Canadian Journal of physiology and Pharmacology*, 60: 1010-1016.
- RAMADE, F. 1977. *Écotoxicologie*. Masson, Paris, France. 205p.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington. 665p.
- RAND, G.M. 1980. Bioassays. In: F.E. Guthrie & J.J. Perry (eds.), Introduction to Environment Toxicology. Elsevier, North Holland, N.Y.
- RAVERA, O. 1998. Utility and limits of biological and chemical monitoring of the aquatic environment. *Annali di Chimica*, 88(11-12): 909-913.
- REGALLA JR., C.; NOLDIN J. A.; SANTOS, A.L.; SATO G.; EBERHARDT, D.S. 2002. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 12: 59-68.

- RICKLEFS, R. E. 2001. A Economia da Natureza. Guanabara-Koogan, 5a Edição. 503 p.
- SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. & AZAM, D. 1996. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 31:232-238.
- SANDBACKA, M.; CHRISTIANSON, I. & ISOMAA, B. 2000. The acute toxicity of surfactants on fish cells, D. magna and fish—a comparative study. *Toxicology in Vitro*, 14:61-68.
- SCHRECK, C.B.; OLLA, B.L. & DAVIS, M.W. 1997. Behavioral response to stress. Pp. 145-170. In: G.K. Iwama, A.A.D. Pickering, J.P. Sumpter & C.B. Schreck (eds.), *Fish stress and Health in Aquaculture*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- SCHVARTSMAN, 1991. S. *Intoxicações agudas*. (quarta edição). Sarvier, São Paulo. 355p.
- SHEDD, T.R.; VAN DER SCHALIE, W.H.; WIDDER, M.W. & BURTON, D.T. 2001 Long-Term Operation of na Automated Fish Biomonitoring System for Continuous Effluent Acute Toxicity Surveillance. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 66: 392-399.
- SMIT, M.G.D.; HENDRIKS, A.J.; SCHOBEN, J.H.M.; KARMAN, C.C. & SCHOBEN, H.P.M. 2001. The Variation in Slope of Concentration-Effect Relationships. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48 (1): 43-50.
- SORENSEN, F.; BAYLEY, M. & BAATRUP, E. 1995. The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (Isotomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 1587-1590.
- STEPHAN, C.E. & MOUNT, D.I. 1973. Use of toxicity tests with fish in water pollution control. In, *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*, ASTM STP 528. Am. Soc. Testing and materials. Philadelphia, Pa.
- TAHEDL, H. & HÄDER, D.P. 1999. Fast examination of water quality using the automatic biotest ecotox based on the movement behavior of freshwater flagellate. *Water Research*, 33:426-432.
- TAHEDL, H. & HÄDER, D.P. 2001. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48:161-169.
- THOMAS, M.; FLORION, A.; CHRETIEN D. & TERVER, D. 1996. Real-time biomonitoring of water contamination by cyanide based on analysis of the continuous electric signal emitted by a tropical fish: *apteronotus albifrons*. *Water Research*, 30: 3083-3091.
- TONISSI, F.B. 1999. *Avaliação ecotoxicológica do reservatório de Salto Grande, Americana (SP), com subsídios para análise da qualidade ambiental do sistema*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- TRUHAUT, R. 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1: 151-173.
- TUCKER, K.A. & BURTON JR., G.A. 1999. Assessment of nonpoint-source runoff in stream using in situ and laboratory approaches. *Environmental Toxicology*, 18(12): 2797 – 2803.
- UNT - University of North Texas' Little Miami River Clam Biomonitoring. *Aquatic Toxicology Laboratory's. Little Miami River Biomonitor*: http://www.hist.unt.edu/~jallen/littlemiami/Clam_Page.html (acesso em 12/Set/2005).
- UNTERSTEINER, H.; KAHAPKA, J. & KAISER, H. 2003. Behavioral response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal copper stress - validation by image analysis. *Aquatic Toxicology*, 65:435-442.
- USACEHR. U.S. Army Center for Environmental Health Research, located at Fort Detrick, Maryland, USA: <http://usacehr.detrick.army.mil> (acesso em 08/Ago/2004).
- USEPA – Environmental Protection Agency. 1984. *Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control*. EPA-Washington D.C., 135 p.
- USEPA – Environmental Protection Agency. 1996. EPA 712-C-96-114.OPPTS 850.1010 *Aquatic invertebrate toxicity test, freshwater daphnids: ecological effects test guidelines*. Washington. USA.
- USEPA - Environmental Protection Agency. 2002. EPA-821-R-02-1. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5th ed. Washington. USA.
- VAN DER SCHALIE, W.H., SHEDD, T., WIDDER, M., KANE, A.S., SILBERGELD, E., REIMSCHUESSEL, R., POLI, M., SARABUN, C., BURKHOLDER, J., GLASGOW, H. 2001. *Real-Time Monitoring for Toxicity Caused by Harmful Algal Blooms and Other Water Quality Perturbations*. Report EPA/600/R-01/103. U.S. EPA, Washington, DC.
- VAN DER SCHALIE, W.H.; SHEDD, T.R.; WIDDER, M.W. & BRENNAN L.M. 2004. Response characteristics of an aquatic biomonitor used for rapid toxicity detection. *Journal of Applied Toxicology*, 24 (5): 387–394.
- VAN HOOFF, R.; SLUYTS, H.; PAULUSSEN, J.; BERCKMANS, D. & BLOEMEN, H. 1994. Evaluation of a biomonitor based on the phototactic behaviour of *Daphnia magna* using infrared detection and digital image processing. *Water Science Technology*, 30: 79-86.
- VAN STRAALLEN, N. M. 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental Science and Tecnology*, 37(17): 324A-330A.

- VITTOZZI, L. & DE ANGELIS, G.A. 1991. Critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 19(2): 167-204.
- WANG, L., YAN, T., YUA, R. & MINGJIANG ZHOU, M. 2005. Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae*, 4: 371-382.
- WOLF, G.; SCHEUNDERS, P. & SELENS, M. 1998. Evaluation of the swimming activity of *Daphnia magna* by image analysis after administration of sublethal cadmium concentration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120: 99-105.
- ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. 2006. *Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos. 464 p.
- ZAGATTO, P.A. & GHERARDI-GOLDSTEIN, E. 1991. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. *Ambiente*, 5 (1):13 – 20.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E. & SOUZA, H.B. 1992. Avaliação de toxicidade em sistemas de tratamento biológico de efluentes líquidos. *Revista DAE*, 51 (166): 1-6.
- ZAGATTO, P.A.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; LOMBARDI, C.C; MARTINS, M.H.R.B & RAMOS, M.L.L.C. 1987. Bioassay with aquatic organisms: toxicity of water and sediment from Cubatão river basin. *Water Science and Technology*, 19(11): 95-106.

Submetido em 15/03/2008.

Aceito em 22/07/2008.