
COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ECOTOXICOLÓGICOS NA AVALIAÇÃO DE SEDIMENTOS MARINHOS E ESTUARINOS

VALÉRIA APARECIDA PRÓSPERI

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental

ORIENTADORA: Prof. Dra. Odete Rocha

São Carlos
2002

P966a Prósperi, Valéria Aparecida
Avaliação ecotoxicológica de sedimentos marinhos e estuarinos através da interface sedimento/água / Valéria Aparecida Prósperi. — São Carlos, 2002.

Tese (Doutorado) — Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2002.
Área : Ciências da Engenharia Ambiental.
Orientador: Profa. Dra. Odete Rocha.

1. Teste de toxicidade. 2. Interface sedimento/água. 3. Água intersticial. 4. Sedimento. 5. *Lytechinus variegatus*. I. Título.

Dedico esse trabalho ao meu irmão Wagner, que após minha defesa, nos deixou na confusão de todos os dias e se abrigou na paz de Deus.

Dedico também a todos aqueles que sonham e fazem acontecer.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todos os minutos dessa viagem maravilhosa que é a vida, e que me deu forças para concluir um sonho antigo chamado doutorado;

Ao Adilson, meu Thell, que chegou na minha vida e fortaleceu meus objetivos, além de estar ao meu lado com toda a paciência e carinho sendo meu maior incentivador;

À minha preciosa e querida mãe, dona Lourdes, por absolutamente tudo, desde as palavras de apoio, dedicação e amor até os pequenos gestos práticos que tem facilitado minha vida; ao Wagner, meu mano lutador, pela presença constante; ao meu pai, Talmadge, por todas as lições de vida que me ensinou enquanto esteve perto de mim e à minha dindinha Norma, que me enlouquece, mas que eu adoro;

À minha orientadora Dra. Odete Rocha pela viabilização do meu desejo de cursar o doutorado e que na fase final deste trabalho me encorajou dizendo que tudo daria certo;

Aos meus sogros Adalgiza e José Luiz, e também meus queridos Gilson, Elenice, Eliane, Amilcar e Eva pelo carinho e paciência no nosso dia-a-dia;

Ao meu amigo Eduardo Bertoletti por todo incentivo e discussões, iniciadas lá atrás no mestrado, que versaram desde análise estatística, procedimentos metodológicos até as telhas, pedreiros, reformas etc e tal;

Aos meus companheiros da CETESB Sandra, Márcia Aragão, Liliana, Rosalina, Mila, Carlos, Ivo, Maria do Carmo, Márcia Botelho, Angela, Débora, Marta Lamparelli, Guiomar, Zé Eduardo e Francisco Ferreira, pelas palavras de apoio e/ou viabilização das diversas atividades vinculadas a este projeto. Em especial, ao Daniel pelo auxílio na tradução do resumo (Dani obrigada pela força necessária no último minuto!!);

Ao Álvaro Migotto, querido amigo, pelas conversas e disponibilidade para fotografar meus companheiros de trabalho, os ouriços;

À minha querida amiga Regina Safadi pela amizade, carinho e revisão do texto, além de contribuir para minhas altas contas telefônicas devido às conversas constantes sobre assuntos científicos ou simplesmente papo furado, mas não menos importantes;

Às minhas queridas amigas Fabíola e Eliete tão distantes fisicamente de mim, mas tão perto do meu coração, por toda a alegria que sempre me proporcionam nos momentos em que estamos juntas;

Aos amigos Walmir, Cris Vallias, Maristela, Silmara, Mauro, Maria Elena, Morena, por serem pessoas presentes na minha vida e ao Geraldo Eysink que, através dos seus e-mails floridos, me enviou muitas palavras de incentivo;

À Cris Bianchini que tem feito com que eu perceba a Valéria com suas potencialidades e limitações;

Ao pessoal do CEBIMar, Joseilton, Adriano, Elso, Simone, Lenise, Wagnei, Dina e Fátima que viabilizaram a execução dos experimentos e/ou tornaram minha estadia sempre tão agradável no Centro de Biologia Marinha da USP;

Ao Antonio de Castro Bruni, que efetuou as análises estatísticas e à Marise C. Chamani, pela elaboração do mapa com a localização dos pontos de amostragem ;

Aos Drs. Brian Anderson, John Hunt, Steve Bay e Scott Carr pelas informações e sugestões no início deste estudo e à Marion Nipper pelas dicas, textos e papos via internet;

À CETESB e ao CEBIMar/USP pela possibilidade de execução deste projeto.

Uma tese não se faz sozinha, é preciso apoio, incentivo e auxílio real. Portanto a todas as pessoas citadas acima e outras que indiretamente fizeram algo por mim, meu sincero agradecimento.

Que os sonhos saiam das gavetas e invadam nossas vidas...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 - Área de estudo.....	18
3.1.2 - Pontos de amostragem	19
3.2 - Coleta do sedimento	21
3.3 - Determinação das variáveis físicas e químicas nas amostras de água intersticial, interface sedimento/água e sedimento integral.....	22
3.3.1 - Amônia.....	22
3.3.2 - Metais e Sulfeto	22
3.3.3 - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	23
3.3.4 - Granulometria	24
3.4 - Testes de toxicidade	24
3.4.1 - Matrizes utilizadas nos testes de toxicidade.....	24
3.4.1.1 - Água intersticial.....	25
3.4.1.2 - Interface sedimento/água.....	25
3.4.2 - Ajuste de salinidade	28
3.4.3 - Variáveis físicas e químicas controladas durante os testes de toxicidade	29
3.4.4 - Sensibilidade dos organismos.....	30
3.4.4.1 - Soluções	30
3.4.5 - Organismo-teste.....	31
3.4.6 - Planejamento experimental para a realização dos testes de toxicidade	32
3.4.6.1 - Preparo das amostras	34
3.4.6.2 - Obtenção dos gametas	35
3.4.6.3 - Tratamento dos gametas	36

3.4.6.3.1 - Óvulos	36
3.4.6.3.2 - Espermatozóides.....	37
3.4.6.4 - Fecundação e cálculo do volume da solução de ovos.....	37
3.4.6.5 - Adição dos organismos aos frascos-teste	37
3.4.6.6 - Encerramento do teste de toxicidade	38
3.4.6.7 - Leitura das amostras.....	39
3.4.6.8 - Aceitabilidade dos resultados dos testes ecotoxicológicos.....	41
3.5 - Análise estatística dos resultados	41
3.5.1 - Sulfato de zinco heptahidratado e cloreto de amônio.....	41
3.5.2 - Amostras de água intersticial e interface sedimento/água	41
4. RESULTADOS	45
4.1 – Critérios de aceitabilidade dos testes de toxicidade	47
4.2 - Amônia.....	52
4.3 - Efeito tóxico observado nas amostras de água intersticial e na interface sedimento/água.....	59
4.3.1 - Leitura das amostras através dos diferentes estágios embrio-larvais ...	61
4.4 - Análises químicas	68
4.5 - Granulometria	74
5. DISCUSSÃO.....	77
5.1 - Variáveis físicas e químicas controladas durante os testes de toxicidade	77
5.2 - Influência da amônia não ionizada sobre o efeito tóxico observado nas amostras de água intersticial e na interface sedimento/água	79
5.3 - Leitura das amostras através dos diferentes estágios embrio-larvais	86
5.4 - Análises químicas e granulometria	88
5.5 - Variabilidade entre réplicas	94
5.6 - Análise crítica dos métodos utilizados no presente estudo	97
6. CONCLUSÕES	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8. ANEXO.....	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Localização dos pontos de amostragem na Baixada Santista.....	20
FIGURA 2 - Frasco-teste utilizado nos testes de toxicidade na interface sedimento/água (a); Sistema-teste (b)	26
FIGURA 3 - Vista parcial da montagem experimental do teste de toxicidade na interface sedimento/água.....	27
FIGURA 4 - <i>Lytechinus variegatus</i> adulto	31
FIGURA 5 - Etapas do planejamento experimental utilizado para a realização dos testes de toxicidade	32
FIGURA 6 – Carapaça de <i>L. variegatus</i> adulto, com detalhe do gonópodo	35
FIGURA 7 - Estágios do desenvolvimento embrio-larval de <i>L. variegatus</i> avaliados durante a leitura dos testes de toxicidade.....	40
FIGURA 8 - Porcentagem de pluteus normais de <i>L. variegatus</i> na água do mar (1 e 2), em paralelo aos testes com o sedimento referência (ponto 4b), na interface sedimento/água e água intersticial	46
FIGURA 9 - Distribuição da frações granulométricas (%) nas amostras de sedimento da Baixada Santista.....	76
FIGURA 10 - Comparação entre porcentagem de amostras, presença de amônia e efeito tóxico observado nos testes de toxicidade	84
FIGURA 11 Hierarquização das amostras de água intersticial classificadas como tóxicas, de acordo com o estágio de desenvolvimento embrio-larval de <i>L. variegatus</i>	86
FIGURA 12 - Hierarquização das amostras da interface sedimento/água, classificadas como tóxicas, de acordo com o estágio de desenvolvimento embrio-larval de <i>L. variegatus</i>	88
FIGURA 13 - Variabilidade entre réplicas do laboratório. As colunas representam a média dos desvios-padrão das amostras que apresentaram pluteus normais.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Testes de toxicidade aguda ou crônica para avaliação da qualidade da água, padronizados por organizações internacionais.....	4
TABELA 2 - Testes de toxicidade aguda e crônica para avaliação da qualidade da água doce e marinha, padronizados pela CETESB	5
TABELA 3 - Testes de toxicidade aguda e crônica utilizados na avaliação de sedimentos por diversas organizações	9
TABELA 4 - Localização dos pontos de amostragem	19
TABELA 5 - Substâncias químicas analisadas nas três matrizes (sedimento bruto, água intersticial e água da interface sedimento/água)	21
TABELA 6 - Procedimentos utilizados durante a realização dos testes ecotoxicológicos com <i>L. variegatus</i>	33
TABELA 7 - Valores de CI50;24h obtidos nos testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i> e sulfato de zinco	48
TABELA 8 Características físicas e químicas das amostras de água intersticial, provenientes de sedimentos coletados na Baixada Santista, durante os experimentos com <i>L. variegatus</i>	49
TABELA 9 - Características físicas e químicas da interface sedimento/água, provenientes das amostras de sedimentos coletados na Baixada Santista, durante os experimentos com <i>L. variegatus</i>	50
TABELA 10 - Porcentagem de água intersticial nas amostras após o processo de salinização	51
TABELA 11 - Valores de CI50;24h obtidos nos testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i> e amônia não ionizada.	52
TABELA 12 - Concentrações de amônia total e não ionizada (mg/L), obtidas nas amostras de água intersticial durante os testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i>	54
TABELA 13 - Concentrações de amônia total e não ionizada (mg/L), obtidas nas amostras da interface sedimento/água, durante os testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i>	55

TABELA 14 - Correlação canônica entre a concentração de amônia não ionizada e os efeitos tóxicos sobre os estágios embrio-larvais, nos testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i>	56
Tabela 15 - Avaliação da influência da amônia não ionizada (inicial e final) sobre os efeitos tóxicos nos diferentes estágios do desenvolvimento embrio-larval de <i>L. variegatus</i>	57
TABELA 16 - Concentrações de amônia total nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista	58
TABELA 17 - Resultados dos testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i> na interface sedimento/água e na água intersticial de sedimento da Baixada Santista	60
TABELA 18 - Intensidade dos efeitos tóxicos nos estágios de desenvolvimento embrio-larval de <i>L. variegatus</i> , nas amostras de água intersticial provenientes de sedimentos coletados na Baixada Santista.....	62
TABELA 19 - Intensidade dos efeitos tóxicos nos estágios de desenvolvimento embrio-larval de <i>L. variegatus</i> , na interface sedimento/água das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista	65
TABELA 20 - Concentrações de metais, expressas em mg/L, na água intersticial das amostras de sedimento coletados na Baixada Santista.....	68
TABELA 21 - Concentrações de metais, expressas em mg/L, na interface sedimento/água, das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.	69
TABELA 22 - Concentrações de metais pesados, expressas em µg/g, nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista	70
TABELA 23 - Correlação canônica entre as concentrações de metais no sedimento bruto e aquelas presentes tanto na interface sedimento/água (a) quanto na água intersticial (b).....	71
TABELA 24 - Correlação canônica entre as concentrações de metais no sedimento bruto e os efeitos tóxicos nos diferentes estágios embrio-larvais tanto na água intersticial (a) quanto na interface sedimento/água (b).....	72
TABELA 25- Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), expressos em µg/kg, determinados nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista	73

TABELA 26 - Correlação canônica entre os efeitos tóxicos observados nos diferentes estágios embrio-larvais, e as concentrações de HPAs determinadas nas amostras de sedimento, coletadas na Baixada Santista	74
TABELA 27 - Resultados das análises granulométricas, expressa em %, realizadas com amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista	75
TABELA 28 - Resultado da análise canônica entre as frações granulométricas das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista e os testes de toxicidade com <i>L. variegatus</i>	78
TABELA 29 - Resultados dos testes de toxicidade obtidos para <i>L. variegatus</i> e outras espécies de ouriço para alguns metais.....	90
TABELA 30 - Comparação das metodologias de teste de toxicidade utilizadas no presente estudo	97

RESUMO

A amônia não ionizada pode ser um interferente nos testes de toxicidade com a água intersticial de sedimentos marinhos e estuarinos. Com o objetivo de se encontrar uma alternativa que minimizasse o efeito da amônia avaliou-se, em paralelo à água intersticial, o método que utiliza a interface sedimento/água. Foram analisadas 25 amostras de sedimento através do teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*. Foi observada correlação significativa entre os efeitos tóxicos para os diversos estágios embrio-larvais e a concentração de amônia não ionizada para os dois métodos avaliados. Quando comparadas com a interface sedimento/água, foram observadas concentrações superiores de amônia não ionizada em todas as amostras de água intersticial que, isoladamente, poderiam causar os efeitos tóxicos observados. Concluiu-se que o teste de toxicidade na interface sedimento/água é o método mais adequado para avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos, pois possibilitou a utilização de um maior número de resultados de testes de toxicidade do que aquele com a água intersticial, uma vez que minimizou a influência da amônia. Foi evidenciada correlação significativa entre os resultados das concentrações de HPAs determinadas nas amostras de sedimento bruto e a toxicidade observada nos diversos estágios embrio-larvais, pelo método da água intersticial. Para os metais, obteve-se correlação significativa com os efeitos tóxicos nos referidos estágios determinados na interface sedimento/água. Não foi evidenciada correlação entre a granulometria e o efeito tóxico nas amostras. O registro dos efeitos nos diferentes estágios embrio-larvais mostrou-se bastante útil, pois além de oferecer informações a respeito da toxicidade da amostra (ausência ou presença), possibilitou a hierarquização, em termos da intensidade de efeito adverso, daquelas amostras tóxicas.

ABSTRACT

Un-ionized ammonia is considered a confounding factor in interstitial water toxicity tests with marine and estuarine sediment. In order to find an alternative in which the ammonia influence is minimized an evaluation of the sediment/water interface method was performed. Sediment samples from 25 sites were analyzed with the chronic toxicity test with the sea urchin *Lytechinus variegatus*. There was a significant correlation between both toxicity test results and un-ionized ammonia. Un-ionized ammonia concentrations, which could be responsible for the toxic effects, were higher in all interstitial samples when compared with sediment/water interface. It was concluded that the use of the sediment/water interface toxicity test can minimize the ammonia influence and more toxicity test results could be used. A significant correlation between PAHs in the whole sediment and the toxicity observed on interstitial water was shown. For metals the correlation occurred with sediment/water interface. There was no correlation between grain size and both toxicity test. It was possible to know about the toxicity (presence or absence) and classify the toxic samples in terms of toxic effects with the different stages of *L. variegatus*.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento das cidades e sua urbanização aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias e do processo de industrialização geraram, conseqüentemente, uma quantidade cada vez maior de substâncias de características diversas, cujo destino final é o ambiente.

A poluição orgânica, proveniente de efluentes domésticos ou industriais, a lixiviação de solos agrícolas, a utilização de metais, produção de moléculas orgânicas sintéticas e despejos radioativos têm sido algumas das formas de poluição predominantes nos ecossistemas aquáticos, tanto nas águas continentais quanto nos ambientes marinhos. A maioria das substâncias e os seus subprodutos podem causar efeitos adversos ao homem, assim como às biocenoses dos ecossistemas aquáticos ou terrestres (MEYBECK *et al.*, 1990).

Deve ser considerado que os efeitos dos poluentes são variáveis, observando-se desde danos de ordem estética e econômica, a danos graves à saúde do homem e aos ecossistemas. Os efeitos dependem do clima, de condições locais como a densidade populacional, a taxa de liberação dos poluentes, padrões de dispersão, variabilidade espacial e temporal das concentrações, suscetibilidade e sensibilidade das espécies presentes no corpo receptor (PASCHOAL, 1996).

Atualmente, existe um grande esforço no sentido de se conhecer e encontrar formas de preservação dos ambientes aquáticos, uma vez que estes são receptores de uma grande carga poluidora proveniente das mais diversas fontes antropogênicas. Embora nos diferentes ambientes naturais existam comunidades adaptadas capazes de suportar as condições existentes, bem como suas flutuações naturais (TOMMASI, 1979), a mudança nos fatores ambientais, como aquelas decorrentes da introdução

de compostos químicos, pode induzir alterações na estrutura e acarretar situações críticas que levam à extinção de diferentes organismos.

Em resposta à necessidade de se conhecer o destino e o efeito dessas substâncias no ambiente aquático surgiu a Ecotoxicologia, que se utiliza principalmente da Toxicologia, uma ciência reducionista, que apresenta grande capacidade preditiva, e da Ecologia, uma ciência holística, mas de baixa capacidade preditiva e de diagnóstico. A finalidade dessa ciência é avaliar os efeitos das substâncias tóxicas nos ecossistemas, visando primordialmente a sua proteção como um todo e não apenas dos componentes isolados (HARRIS *et al.*, 1990).

No campo da Toxicologia Aquática, Forbes foi um dos primeiros pesquisadores a reconhecer o significado da presença ou ausência de espécies e comunidades dentro de um ecossistema aquático e a relatar pesquisas para a classificação de rios em zonas de poluição baseadas em espécies tolerantes (FORBES, 1925 apud HOFFMAN *et al.*, 1995).

Segundo PETTS & CALOW (1996), a presença de poluentes aquáticos pode ser detectada diretamente, através de determinações químicas, ou indiretamente em função dos efeitos que causam nos organismos presentes no próprio corpo d'água e no ambiente que os cerca.

SOARES (1990) ressalta, ainda, que a) alguns agentes químicos produzem efeitos biológicos adversos em concentrações bastante inferiores às detectadas pelos atuais métodos analíticos; b) nos sistemas aquáticos as substâncias químicas não são encontradas, normalmente, em concentrações constantes, podendo ocorrer picos ocasionais de concentrações elevadas, as quais terão, obviamente, um significado biológico muito maior do que os níveis normais; (c) ambientes aquáticos contêm misturas complexas de substâncias químicas cuja toxicidade não pode ser atribuída a um ou vários componentes isolados, de forma que,

devido aos efeitos antagônicos e sinérgicos, a toxicidade pode ser maior, menor, ou igualar a soma da toxicidade dos seus constituintes; (d) os efeitos biológicos de um agente químico são função da sua concentração e das características do sistema em que atua.

Dessa forma, os testes de toxicidade, que refletem o efeito da somatória das condições ambientais sobre organismos ecologicamente representativos, são instrumentos importantes no controle da qualidade do ambiente aquático. O resultado obtido por esse tipo de avaliação está vinculado à capacidade natural dos organismos de responderem ao estresse a que estão submetidos no seu ambiente.

Os testes de toxicidade têm sido utilizados para responder muitos tipos de questões (SPRAGUE, 1973; BRUNGS & MOUNT, 1978; MACEK, 1980; REISH, 1987):

- A substância é letal ao organismo-teste e em que concentração?
- Quais são os efeitos de uma substância tóxica sobre os organismos expostos a concentrações subletais durante uma parte ou todo o ciclo de vida?
- Qual organismo é mais sensível?
- Sob quais condições os despejos são mais tóxicos?
- A toxicidade pode mudar quando a substância entra no ambiente?
- Em que grau o recurso hídrico é afetado, seja por meio de liberações acidentais ou episódicas?
- Quais componentes do despejo são tóxicos?
- Quais são os limites aceitáveis para uma emissão segura?

Além disso, através desses testes é possível monitorar a qualidade de um despejo existente ou do corpo hídrico receptor através do uso de testes simples, geralmente avaliando a mortalidade em períodos de 48 a 96 horas, ou ainda de testes crônicos, abrangendo todo o ciclo vital ou parte dele. O monitoramento ambiental incluindo avaliações ecotoxicológicas auxilia o

gerenciamento dos recursos hídricos, uma vez que fornece informações a respeito dos impactos causados pela poluição e fornece subsídios para avaliar a eficiência das medidas adotadas que visam a eliminação ou redução dos efeitos no ambiente. Na literatura internacional são mencionados diversos métodos, aplicados no controle da qualidade da água doce e marinha, utilizando várias espécies. Alguns exemplos estão mencionados na Tabela 1.

TABELA 1 - Testes de toxicidade aguda ou crônica para avaliação da qualidade da água, padronizados por organizações internacionais.

TIPO DE TESTE DE TOXICIDADE	ORGANISMOS DE ÁGUA MARINHA	ORGANISMOS DE ÁGUA DOCE	PADRONIZADO POR
AGUDO	<i>Mysidopsis bahia</i> , <i>M. beryllina</i> , <i>M. menidia</i> , <i>M. peninsulæ</i> , <i>Cyprinodon variegatus</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Pimephales promelas</i>	U.S. EPA (WEBER, 1993)
	-	<i>Daphnia pulex</i> e <i>D. magna</i>	U.S. EPA (WEBER, 1993) ENVIRONMENT CANADA (1990a)
	-	<i>Oncorhynchus mykiss</i> e <i>Salvelinus fontinalis</i>	U.S. EPA (WEBER, 1993) ENVIRONMENT CANADA (1990b)
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	-	ENVIRONMENT CANADA (1990c)
-	-	<i>Selenastrum capricornutum</i>	ENVIRONMENT CANADA (1992a) U.S. EPA (LEWIS <i>et al.</i> , 1994)
CRÔNICO	<i>Arbacia punctulata</i> , <i>Mysidopsis bahia</i> , <i>Cyprinodon variegatus</i> , <i>Menidia beryllina</i>	-	U.S. EPA (KLEMM <i>et al.</i> , 1994) U.S. EPA (1995)
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> <i>S. droebachiensis</i> , <i>Arbacia punctulata</i> , <i>Lytechinus pictus</i> , <i>Dendraster excentricus</i>	-	ENVIRONMENT CANADA (1992b) ASTM (1995)
	-	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Selenastrum capricornutum</i>	U.S. EPA (LEWIS <i>et al.</i> , 1994), ENVIRONMENT CANADA (1992c), ENVIRONMENT CANADA (1992d)
	-	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo salar</i> e <i>Oncorhynchus kisutch</i>	ENVIRONMENT CANADA (1992e)

Especificamente no Estado de São Paulo, a partir da década de 70, através da implantação de um laboratório de ecotoxicologia na CETESB, foram desenvolvidos e padronizados testes de toxicidade com organismos de água doce (NAVAS-PEREIRA *et al.*, 1987). Esses testes têm sido utilizados em vários estudos como instrumento de controle da qualidade ambiental, principalmente em uma rede de monitoramento de águas continentais com mais de 100 pontos de amostragem (CETESB, 2000).

Posteriormente, a partir do final da década de 80, testes com organismos marinhos começaram a ser desenvolvidos, tendo sido implantados e normalizados nesta Companhia (PRÓSPERI & NIPPER, 1989a,b; NIPPER *et al.*, 1990, 1991, 1992, 1993; NIPPER & PRÓSPERI, 1992,1993; PRÓSPERI, 1998; CETESB, 1992, 1999). Enquanto ferramenta de avaliação ambiental, os testes de toxicidade têm sido utilizados em diagnósticos específicos tanto de áreas marinhas quanto estuarinas (PRÓSPERI *et al.*1996, 1998). Na Tabela 2 encontra-se uma relação dos testes de toxicidade aguda e crônica já padronizados pela CETESB .

TABELA 2 - Testes de toxicidade aguda e crônica para avaliação da qualidade da água doce e marinha, padronizados pela CETESB.

TIPO DE TESTE DE TOXICIDADE	ORGANISMOS DE ÁGUA MARINHA	ORGANISMOS DE ÁGUA DOCE	REFERÊNCIA
AGUDO	-	<i>Daphnia similis</i>	CETESB, 1991a
		<i>Selenastrum capricornutum</i>	CETESB, 1989
		<i>Danio rerio</i>	CETESB, 1990a,b
	<i>Mysidopsis juniae</i>	-	CETESB, 1992
CRÔNICO	-	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CETESB, 1991b
	<i>Lytechinus variegatus</i>	-	CETESB, 1999

De acordo com RAND & PETROCELI (1985), o grande objetivo dos esforços científicos em Toxicologia Aquática se concentrou na caracterização de efeitos tóxicos na coluna d'água resultantes da contaminação de origem terrestre. Hoje em dia existe um crescente reconhecimento de que a contaminação localizada em sedimentos pode apresentar efeitos adversos significativos nos ecossistemas aquáticos, com impactos na estrutura das comunidades bentônicas, sendo os efeitos

associados à água superficial da interface sedimento/água (GIESY *et al.*, 1990; LONG *et al.*, 1990).

ADAMS *et al.* (1985) mencionam que a proteção da qualidade dos sedimentos tem sido vista como uma extensão da qualidade da água, uma vez que além de sua importância como habitat para diversos organismos aquáticos também pode ser o maior depósito de vários agentes químicos persistentes introduzidos no ambiente. Além disso, estudos geoquímicos, no campo ou laboratório, têm mostrado que o sedimento apresenta potencial de formar associações com várias classes de poluentes antropogênicos (PRUELL & QUINN, 1985).

Na verdade, os sedimentos servem tanto como reservatório de contaminantes como fonte de contaminação para a coluna d' água. Entretanto, níveis elevados de contaminantes no sedimento podem ou não ocasionar efeitos sobre a biota aquática, uma vez que dependem de uma série de fatores que irão promover ou não sua biodisponibilidade e conseqüentemente a toxicidade.

Deve ser lembrado que sedimentos com misturas de contaminantes podem produzir efeitos tóxicos diferentes daqueles com contaminantes individuais. Além disso, há muitas circunstâncias onde sedimentos considerados altamente contaminados, com base nos resultados de determinações químicas, não apresentam efeito tóxico porque a toxicidade varia com a concentração e as condições encontradas num sedimento específico.

Sedimentos contaminados com nutrientes, metais, substâncias orgânicas ou aquelas que consomem oxigênio podem ser encontrados em sistemas marinhos, estuarinos e de água doce. Enquanto alguns desses contaminantes estão presentes em elevadas concentrações como resultado de um processo natural, na maioria dos casos a acumulação é proveniente

de atividades antropogênicas. São várias as rotas pelas quais os contaminantes chegam aos ecossistemas aquáticos, tais como efluentes industriais, derrames de petróleo, fontes não pontuais, etc. (POWER & CHAPMAN, 1992).

Muitas das substâncias químicas encontradas nos sedimentos podem ser imediatamente letais ou apresentar efeitos a longo prazo, por exemplo, na reprodução dos organismos (POWER & CHAPMAN, 1992). De acordo com MIX (1986), organismos residentes no fundo, como caranguejos e peixes demersais, podem desenvolver lesões cancerosas como resultado do contato com sedimentos contaminados.

Os sedimentos podem ser constituídos de quatro componentes principais, sendo a maior parte ocupada pela água intersticial, que preenche o espaço entre as partículas (FÖSTNER, 1987 apud POWER & CHAPMAN, 1992). A fase inorgânica inclui rochas, fragmentos de conchas e partículas minerais resultantes da erosão natural de materiais terrestres. Já a matéria orgânica ocupa um pequeno volume, mas é um importante componente, uma vez que pode regular a adsorção e biodisponibilidade de muitos contaminantes e, como último componente, estão as substâncias derivadas de atividades antropogênicas (POWER & CHAPMAN, 1992).

Várias ferramentas são utilizadas para avaliar a extensão da contaminação dos sedimentos e determinar os efeitos nas comunidades, incluindo estudos de bioacumulação, biomarcadores, avaliação da estrutura de comunidades bentônicas, medidas de concentrações químicas de contaminantes e testes de toxicidade. Juntas, essas medidas fornecem uma avaliação integrada para definir a qualidade do sedimento (ANDERSON *et al.*, 1996).

Com relação aos testes de toxicidade, seu principal objetivo é determinar se o sedimento, em um dado momento, apresenta efeito adverso

aos organismos aquáticos. Os testes podem ser usados para avaliar efeitos tóxicos interativos de misturas complexas de contaminantes no sedimento; determinar a relação entre efeito tóxico e biodisponibilidade; investigar interações entre contaminantes; comparar sensibilidade entre organismos diferentes; indicar a distribuição espacial e temporal da contaminação; avaliar a qualidade de material dragado; classificar áreas para priorizar medidas de limpeza (recuperação) e estimar eficiência da remediação ou das práticas de manejo (USEPA,1997). Além disso, não é necessário o conhecimento das rotas específicas de interações entre sedimento e organismos-teste para que os experimentos sejam realizados (KEMP & SWARTZ, 1988).

Nos testes de toxicidade geralmente têm sido analisadas três matrizes de exposição: fase sólida (sedimento integral), água intersticial e elutriatos onde, na grande maioria, são utilizados testes agudos. Enquanto todas as matrizes de exposição têm aplicações específicas, existe um consenso da necessidade do desenvolvimento de metodologias com amostras na fase sólida que utilizem parâmetros subletais (ANDERSON *et al.*, 1996).

Os testes com o sedimento na fase sólida consistem na exposição dos organismos-teste diretamente às amostras de sedimento. Já nos testes com elutriato, uma sub-amostra do sedimento é homogeneizada, sendo que a água de diluição é acrescentada, em geral na proporção 1:4, seguindo-se uma vigorosa agitação dessa mistura. Após esse processo o sobrenadante é retirado e utilizado nos testes de toxicidade (LAMBERSON *et al.*, 1992).

Com relação à água intersticial, formada durante o processo de sedimentação, a quantidade de água disponível depende diretamente da porosidade e indiretamente do tamanho de partícula e do grau de compactação. Ela é definida como a água que ocupa os espaços entre o sedimento ou partículas de solo, sendo que existem vários métodos para

sua obtenção tais como centrifugação, compressão, pressurização, sucção, etc. (ASTM, 1994).

Vários estudos são encontrados na literatura internacional, com diferentes espécies e matrizes de exposição. Avaliações da qualidade ambiental (CARR & CHAPMAN, 1992; NOAA, 1991; ENVIRONMENT CANADA, 1994a), além de estudos que visam a classificação e definição do destino de sedimentos de áreas dragadas ou receptoras do material dragado (USEPA & USACE, 1991; HOFSTRA, 1995; JAAGUMAGI & PERSAUD, 1995; PEDDICORD *et al.*, 1995), têm se tornado mais frequentes. No Estado de São Paulo o órgão de controle ambiental, CETESB, vêm utilizando a água intersticial de sedimentos marinhos e estuarinos para avaliação de áreas costeiras e de sedimentos dragados (PRÓSPERI *et al.*, 1996, 1998). A Tabela 4 apresenta os testes de toxicidade aguda ou crônica utilizados na avaliação da qualidade de sedimentos, padronizados por diferentes organizações.

TABELA 3 - Testes de toxicidade aguda ou crônica utilizados na avaliação de sedimentos, padronizados por diversas organizações.

TIPO DE TESTE DE TOXICIDADE	ORGANISMOS DE ÁGUA MARINHA/ESTUARINA	ORGANISMOS DE ÁGUA DOCE	PADRONIZADO POR
AGUDO	<i>Rhepoxynius abronius, Foxiphalus xiximeus, Corophium volutator, Leptocheirus pinguis, Eohaustorius estuarius, E. washingtonianus, Amphiphoreaea virginiana e Photobacterium phosphoreum</i>	-	ENVIRONMENT CANADA (1992f,g)
	-	<i>Hexagenia limbata, Chironomus tentans Pimephales promelas</i>	ENVIRONMENT ONTARIO (1992)
	<i>Ampelisca abdita, Rhepoxynius abronius, Eohaustorius estuarius e Leptocheirus plumulosus</i>	<i>Hyalella azteca, C. tentans e Lumbriculus variegatus</i>	USEPA (1994d,e)
	-	<i>Hyalella azteca, C. tentans eC. Riparius, Daphnia sp, variegatus</i>	ASTM (2000)
CRÔNICO	-	<i>Hexagenia limbata, Pimephales promelas</i>	ENVIRONMENT ONTARIO (1992)
	-	<i>Hexagenia spp, Ceriodaphnia sp</i>	ASTM (2000)
	<i>Lytechinus variegatus</i>	-	CETESB (1999)

Segundo BURGESS & SCOTT (1992), é necessária uma ampliação do escopo da pesquisa para reconhecimento do potencial de interação entre os ambientes da coluna d'água e do sedimento. Essa interação, como função de vários processos biológicos, químicos e físicos, pode resultar em eventual efeito adverso num compartimento (coluna d'água) como resultado do estado da contaminação do outro (sedimento).

Com relação aos metais, por exemplo, VAN CAPPELLEN & WANG (1995), mencionam que sedimentos superficiais não são recipientes passivos de metais particulados depositados através da coluna d'água. Ao invés disso, funcionam como reatores biogeoquímicos, onde o metal depositado participa numa variedade de processos, incluindo reações microbiológicas, transformações redox, troca adsorção-desorção e precipitação e dissolução de minerais. Esses processos controlam a especiação de metais e, portanto, controlam o retorno dessas substâncias ao ambiente da interface sedimento/água ou sua retenção no sedimento.

A mais intensa atividade biogeoquímica é concentrada na camada superficial do sedimento. Essa é também a porção do sedimento que afeta diretamente a qualidade do corpo d'água na interface com o sedimento, através da troca de solutos. A água da interface separa a coluna d'água, com seu movimento fluido em larga escala e mistura turbulenta, do sedimento superficial onde a difusão molecular tipicamente domina o transporte de solutos. Para particulados, a interface sedimento/água corresponde à transição de uma taxa de deposição relativamente rápida para uma taxa de deposição muito mais lenta. Dessa forma, comparado à coluna d'água, a interface sedimento/água pode ser vista como um ambiente semiconfinado caracterizado por um longo tempo de residência de material particulado. Essas condições favorecem um extenso processo biogeoquímico de materiais depositados e o estabelecimento de um gradiente na composição da água intersticial (VAN CAPPELLEN & WANG, 1995).

Deve ser enfatizado que a liberação de poluentes dos sedimentos contaminados para a água intersticial e para a interface sedimento/água representa um risco potencial dos sedimentos contaminados (REUBER *et al.*, 1987; SALOMONS *et al.*, 1987). Dependendo do grau de contaminação do sedimento, a liberação poderá causar efeito adverso sobre os organismos da coluna d'água (SALOMONS *et al.*, 1987). Segundo BURGESS & SCOTT (1992), poucos estudos têm investigado a forma como os poluentes são liberados e, conseqüentemente, sua disponibilidade e toxicidade.

As vias de exposição para os organismos bentônicos ocorrem através do contato com a água intersticial, da água localizada logo acima do sedimento, através das paredes do corpo e superfície respiratória ou da ingestão de partículas de sedimento contaminado. Nem todos os organismos bentônicos ingerem sedimento e a maior fonte de substâncias orgânicas para a maioria é através da água intersticial ou a água da interface sedimento/água (ADAMS *et al.*, 1985).

A interface sedimento/água é um importante habitat onde ocorre uma densidade significativa de espécies bentônicas e epibentônicas. Além disso, gametas e estágios embrionários de várias espécies, inclusive daquelas que habitam a coluna d'água, podem passar fases críticas do seu desenvolvimento nesse ambiente. Devido ao fluxo de contaminantes do sedimento, a constante deposição de novos materiais da coluna d'água e remineralização de matéria orgânica no sedimento, esse habitat tem potencial de apresentar concentrações tóxicas de contaminantes (REIDEL *et al.*, 1989).

Os sedimentos das zonas costeiras sofrem uma contínua ressuspensão por forças hidrodinâmicas, além da ação biológica e dos processos físicos. Como resultado desses processos ocorre a mistura de partículas com o sedimento por bioturbação ou correntes, filtração ou

ingestão por organismos bentônicos, agregação de partículas ou coagulação, advecção da água intersticial através da filtração da água sub-superficial ou bombeamento pelos organismos, crescimento de macro ou microrganismos que alteram a geometria da interface e isolamento da superfície do sedimento por uma camada limite de água (SANTSCHI *et al.*, 1990).

Segundo FARMER (1991) e SANTSCHI *et al.* (1990), as relações dinâmicas que ocorrem constantemente na interface sedimento/água, como por exemplo, os processos naturais físicos e biogeoquímicos e os impactos antropogênicos, podem alterar a característica tradicional dos sedimentos como “depósito”, de tal forma que pode ocorrer a reciclagem de substâncias antes da sua deposição permanente, além de afetar a mobilização de contaminantes como metais traços. Dessa forma, o sedimento pode agir não somente como depósito, mas como uma fonte de contaminantes, podendo disponibilizar para os organismos aquáticos substâncias acumuladas durante décadas (BURGESS & SCOTT, 1992).

HARGIS *et al.* (1984), num estudo com a água da interface exposta ao sedimento contaminado com hidrocarbonetos aromáticos do Rio Elizabeth, Virginia, USA, mostrou que essa água ocasionou a mortalidade, o apodrecimento das barbatanas, o desgaste das brânquias e efeitos deletérios no desenvolvimento, além de alterações histopatológicas em peixes da espécie *Leiostomus xanthurus*. Outro estudo indicou que a reprodução, crescimento e sobrevivência de algas, misidáceos e ouriços foram afetados quando expostos à água superficial de sedimentos marinhos contaminados (BURGES *et al.*, 1992 apud BURGESS *et al.*, 1993).

A exposição de organismos ao fluxo de contaminantes oriundos do sedimento pode ser avaliada através do método apresentado por ANDERSON *et al.* (1996). Neste trabalho são enfatizadas várias vantagens da utilização deste método, que contempla a interface sedimento/água:

- Complementa o conjunto de matrizes de exposição para testes de toxicidade com sedimento, avaliando um importante habitat em que os efeitos tóxicos não têm sido adequadamente estudados;
- Facilita o uso de protocolos de testes de toxicidade já estabelecidos que utilizam parâmetros subletais, preenchendo a lacuna de testes com a fase sólida;
- Pode ser utilizado para avaliar a toxicidade de sedimentos sem homogeneização, eliminando assim os artefatos que podem ser resultado da manipulação de amostras de sedimento e água intersticial;
- O sistema de exposição utilizado minimiza qualquer interação entre a fauna residente que pode estar presente em amostras intactas;
- Reduz os efeitos do tamanho das partículas de sedimento, eliminando possíveis resultados falso-positivos;
- Embora desenvolvido para organismos marinhos, sua aplicação para espécies de água doce pode ser avaliada.

Conforme mencionado anteriormente, a CETESB vem usando a água intersticial como matriz de exposição na avaliação de sedimentos costeiros (PRÓSPERI *et al.*, 1996, 1998), uma vez que essa representa a maior rota de exposição para organismos bentônicos (ADAMS *et al.*, 1985; WHITEMAN *et al.*, 1996) e, substancialmente, influencia a biodisponibilidade de contaminantes (DI TORO *et al.*, 1991).

Embora os testes de toxicidade sejam utilizados internacionalmente, algumas incertezas são associadas a água intersticial, tais como a forma de extração e o momento adequado para sua obtenção. Algumas correntes científicas acreditam que o sedimento deve ser armazenado a 4°C e a água intersticial deve ser retirada 24 horas antes do teste (ENVIRONMENT CANADA, 1994b). Outros pesquisadores realizam esse procedimento logo após a coleta e congelam a amostra (CARR & CHAPMAN, 1995).

Além disso, várias características dos sedimentos como salinidade, oxigênio dissolvido, pH, carbono orgânico total ou dissolvido, sulfeto e amônia, podem agir como fatores que influenciem os resultados dos testes de toxicidade com a água intersticial. Esses parâmetros também podem afetar a biodisponibilidade de contaminantes ou transformá-los numa forma tóxica. O pH, a salinidade e a temperatura, por exemplo, afetam a toxicidade da amônia, enquanto o pH afeta a toxicidade de alguns metais. Uma vez que cada organismo tolera somente uma determinada faixa de variação de cada parâmetro, é impossível eliminar todos os interferentes dos testes de toxicidade. No entanto, algumas variáveis, tais como temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade, podem ser controladas através de procedimentos de testes de toxicidade bem estabelecidos (CARR *et al.*, 2001).

Especificamente com relação à amônia, vários estudos têm enfatizado que a sua presença nas amostras de sedimento tem sido um interferente considerável na avaliação final do resultado dos testes ecotoxicológicos, uma vez que os efeitos tóxicos observados podem ser devidos à presença dessa substância e não aos contaminantes mais persistentes (BAY, 1994; MOORE *et al.*, 1997; HUNT *et al.*, 1998; CARR *et al.*, 2001).

A amônia é um constituinte comum de ambientes aquáticos, sendo oriunda tanto da quebra de produtos nitrogenados quanto da contaminação antropogênica, como por exemplo da entrada de dejetos provenientes do uso de fertilizantes em terras adjacentes. Essa substância apresenta-se, ao mesmo tempo, na forma ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3). A prevalência de qualquer dessas duas formas é dependente da temperatura, pH e salinidade da água. Em função das condições comumente encontradas no ambiente marinho, mais de 95% da amônia total está na forma ionizada (GREESNTEIN *et al.*, 1994).

A amônia não ionizada pode estar presente em sedimentos anóxicos e pode ser formada durante o transporte e armazenamento do sedimento,

tanto pelos organismos residentes que excretam produtos metabólicos, bem como pelo metabolismo bacteriano da matéria orgânica (ASTM, 1994). A amônia na água intersticial é instável e dependente de numerosas variáveis, incluindo o método de coleta do sedimento, o método de extração, condições de armazenamento, temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido (SARDA & BURTON, 1995).

Por outro lado, nas décadas de 20 e 30, a utilização de ouriços do mar em testes ecotoxicológicos foi bem estabelecida por diversos pesquisadores, que investigaram os efeitos de metais na fertilização e desenvolvimento desses organismos (DINNEL *et al.*, 1988). Segundo KOBAYASHI (1971), essas fases são críticas para o crescimento normal dos ouriços e sensíveis para detectar efeitos da poluição em ambientes marinhos. Além disso, gametas e embriões de ouriços têm sido utilizados como sistema biológico básico para pesquisa por fisiologistas, bioquímicos e biólogos experimentais desde meados de 1800 (GIUDICE, 1973; MONROY, 1986).

A expansão da utilização desses organismos ocorreu devido à sensibilidade, facilidade de obtenção de gametas, baixo custo, rapidez na execução dos experimentos e ocorrência cosmopolita (DINNEL & STOBBER, 1985).

Vários métodos utilizando células espermáticas e/ou embriões indicaram que os ouriços do mar são sensíveis e adequados como organismos-teste. São encontrados na literatura resultados de experimentos com diversas espécies de equinodermos que incluem substâncias químicas (LILLIE, 1921; HOADLEY, 1923; KOBAYASHI, 1981, 1990; DINNEL *et al.*, 1989; HIS *et al.*, 1999), petróleo (ALLEN, 1971; CHIA, 1973; LONNING & HAGSTRON, 1975; STRAUGHAN, 1976), óleos e dispersantes (KOBAYASHI, 1981), esgotos municipais (MUCHMORE & EPEL, 1973; DINNEL *et al.*, 1981, 1987), entre outros.

Estudos com a espécie de ouriço do mar *Lytechinus variegatus* podem ser encontrados na literatura brasileira a partir da década de 70, referentes a análises fisio-farmacológicas com pedicelárias, atividades de enzimas ou processos inflamatórios (BIANCONCINI, 1978; ALTIMARI, 1987; SAWAYA, 1987, 1989a,b; MANGIATERRA, 1997). No campo da Toxicologia Aquática, alguns pesquisadores têm utilizado essa espécie como objeto de estudo nas avaliações de substâncias químicas (NIPPER *et al.*, 1993, MASTROTI, 1999), efluentes industriais (PRÓSPERI, 1993; RACHID, 1996), água de produção de petróleo (BADARÓ-PEDROSO, 1999), petróleo (LOPES *et al.*, 1997) e água e sedimentos marinhos (ZAMBONI, 1993; PRÓSPERI *et al.*, 1998).

Portanto, devido à existência da norma “Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*”, padronizada pela CETESB (1999), aliado ao reconhecimento de que a amônia pode ser um interferente nos testes de toxicidade com sedimentos, especialmente quando se utiliza a água intersticial, tornou-se oportuno realizar o presente trabalho, para avaliar o método indicado por ANDERSON *et al.* (1996). Por meio desse método supõe-se que o efeito da amônia seja minimizado sobre os resultados dos testes de toxicidade e, dessa forma, espera-se o aprimoramento da avaliação da qualidade de sedimentos marinhos e estuarinos.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

- ✓ Indicar o método de teste ecotoxicológico mais adequado a ser utilizado nos processos de avaliação da qualidade de sedimentos marinhos e estuarinos.

2.2 - Objetivos específicos

- ✓ Comparar os métodos e resultados dos testes de toxicidade na interface sedimento/água e água intersticial, para avaliação da qualidade de sedimentos;
- ✓ Estabelecer a faixa de sensibilidade da espécie *Lytechinus variegatus* à amônia não ionizada;
- ✓ Registrar os diversos estágios embrio-larvais de *L. variegatus* em cada amostra e avaliar a possibilidade de hierarquização, em termos da intensidade do efeito adverso, das amostras classificadas como tóxicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Área de estudo

A Baixada Santista, São Paulo, apresenta uma situação ambiental bastante complexa em função de vários fatores, incluindo a diversificação da atividade portuária, a poluição gerada pelo complexo industrial de Cubatão, a carência de saneamento básico, as constantes dragagens no estuário e à disposição de resíduos sólidos industriais e domésticos em locais impróprios, além dos freqüentes derramamentos de óleo e outras substâncias tóxicas nos cursos d'água.

Considerando que amostras de sedimento da Baixada Santista foram coletadas pela CETESB, para avaliação do grau de contaminação ambiental desta região (LAMPARELLI, *et al.* 2001), incluindo análises ecotoxicológicas com a água intersticial, as mesmas foram utilizadas no presente estudo. Dessa forma, os testes de toxicidade com a interface sedimento/água foram realizados em paralelo aos testes com água intersticial, viabilizando a avaliação do método ecotoxicológico mais adequado para diagnóstico da qualidade de sedimentos marinhos e estuarinos no futuro.

Salienta-se que o estudo realizado em 1999 por LAMPARELLI *et al.* (2001), abrangeu 26 pontos de amostragem, incluindo rios, estuários e o mar em toda a região de influência da poluição hídrica. Foram realizadas coletas de amostras de água, sedimentos e organismos aquáticos. Cerca de 120 parâmetros foram determinados, incluindo metais pesados e arsênio, pesticidas organoclorados, organoclorados aromáticos, organofosforados, herbicidas e outros pesticidas, compostos fenólicos, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), solventes aromáticos e halogenados, bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas e furanos.

3.1.2 - Pontos de amostragem

No presente estudo foram utilizados sedimentos de 18 pontos de amostragem coletados no período de março a maio de 1999, conforme descritos abaixo (Tabela 4) e representados na Figura 1.

TABELA 4 - Localização dos pontos de amostragem na Baixada Santista.

PONTO	DATA DA COLETA	LOCALIZAÇÃO	
1	06/mai	23°52'59,1" S e 46°24'28,4"W	Rio Cubatão
2a	05/mai	23°52'22,6"S e 46°23'34,6"W	Rio Piaçaguera
2b	05/mai	23°52'28,2"S e 46°23'34,1"W	
3a	22/mar	23°52'31,1"S e 46°22'35,9"W	Canal de evolução da Cosipa
3b	22/mar	23°52'33,3"S e 46°22'24,2"W	
4a	22/mar	23°54'42,8"S e 46°20'33,2"W	Largo dos Caneus
4b	22/mar	23°54'44"S e 46°19'50"W	
5a	22/mar	23°54'58,7"S e 46°18'5,2"W	Canal do Estuário de Santos
5b	22/mar	23°55'10,8"S e 46°18'8,3"W	
6	29/abr	23°59'0,4"S e 46°16'57,6"W	Rio Santo Amaro
7a	28/abr	23°59'39"S e 46°18'35"W	Saída do estuário de Santos
7b	28/abr	23°59,3'37"S e 46°18'34,7"W	
8	05/mai	23°55'7,1"S e 46°23'49,2"W	Rio Casqueiro
9	26/abr	23°54'29,8"S e 46°26'54,6"W	Rio Santana
10	26/abr	23°57'1,1"S e 46°28'23,9"W	Rio Branco
11	27/abr	23°57'15,1"S e 46°25'47,1"W	Largo de São Vicente
12	27/abr	23°59'8,2"S e 46°26'14,6"W	Rio Mariana
13	03/mai	23°58'28,4"S e 46°24'48,7"W	Canal de Barreiros
14	03/mai	23°58'27,6"S e 46°23'6"W	Entre Ilha Porchat e praia Paranapuã
15a	23/mar	24°0'15,4"S e 46°20'54,2"W	Saída do emissário de Santos
15b	23/mar	24°0'9,3"S e 46°20'58,2"W	
16	23/mar	24°1'0,9"S e 46°22'32,5"W	Morro de Itaipu
17	23/mar	24°0'51,8"S e 46°19'41,2"W	Ponta grossa da barra
18a	28/abr	23°57'35,2"S e 46°15'51,8"W	Ilha da Moela
18b	28/abr	24°2'48,7"S e 46°15'38,2"W	

3.2 - Coleta do sedimento

Procurou-se, em cada ponto de amostragem, selecionar sedimento de zonas de deposição, uma vez que nessas regiões ocorre a acumulação de contaminantes. Nos pontos 2 a 5, 7, 15 e 18 foram obtidas duas amostras de locais distintos, para verificação da possível variabilidade dentro de cada região escolhida, enquanto que nos demais pontos coletou-se apenas uma amostra, perfazendo um total de 25 amostras de sedimento.

Em função do grande volume de sedimento necessário para a realização das análises químicas e ecotoxicológicas, foram efetuadas várias tomadas de sedimento superficial, com pegador Van Veen. Essas amostras foram transferidas para bandejas plásticas e homogeneizadas, e após a composição do volume total, as alíquotas foram separadas e acondicionadas em frascos específicos, de acordo com o parâmetro a ser avaliado. A tabela 5 sumariza as análises químicas efetuadas no presente projeto.

TABELA 5 - Substâncias químicas analisadas nas três matrizes (sedimento bruto, água intersticial e água da interface sedimento/água).

MATRIZ	PARÂMETRO
Sedimento bruto, água intersticial e interface sedimento/água	romo, níquel, cobre, zinco, cádmio, mercúrio e chumbo; sulfeto (somente água intersticial)
Sedimento bruto	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluranteno, Pireno, Benzo-antraceno, Benzo-b-fluoranteno, Benzo-k-fluoranteno, Benzo-a-pireno, Benzo-ghi- pirleno, Benzeno-1.2.3.cd-pireno, Criseno Dibenzeno-antraceno) e amônia total
Água intersticial e interface sedimento/água (durante os experimentos)	Oxigênio dissolvido, pH, salinidade, amônia total e não ionizada

Salienta-se que as determinações de metais (sedimento integral e água intersticial), sulfeto (água intersticial), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e amônia total (sedimento) foram realizadas pelos laboratórios do CEGEC/CENPES, no Rio de Janeiro. As determinações de metais das amostras da interface sedimento/água e amônia total da água intersticial e interface foram efetuadas pelo Laboratório de Química Inorgânica da CETESB.

3.3 - Determinação das variáveis físicas e químicas nas amostras da água intersticial, interface sedimento/água e sedimento integral

3.3.1 - Amônia

A determinação de amônia total no sedimento foi realizada de acordo com procedimentos descritos no Standard Methods (APHA *et al.*, 1995).

Para a determinação de amônia total nas amostras de água intersticial e na interface sedimento/água efetuou-se a preservação com ácido sulfúrico ($\text{pH} \leq 2$). Posteriormente, foi utilizado o método colorimétrico automático com nitroprussiato de sódio, segundo Standard Methods (APHA *et al.*, 1989). A conversão para amônia não ionizada foi realizada associando-se os valores de amônia total, pH, temperatura e salinidade de cada amostra, através de uma planilha do Microsoft Excel originaria do Southern California Coastal Water Research Project (California). A referida planilha produziu os mesmos resultados, calculados manualmente, conforme descrito por BOWER & BIDWELL (1978).

3.3.2 - Metais e Sulfeto

Para o sedimento bruto, uma amostra representativa de até 0,5g foi digerida em 10 mL de ácido nítrico concentrado por 10 minutos, num sistema fechado e sob pressão, usando aquecimento por radiação de microondas.

Após resfriamento, a amostra digerida foi filtrada e diluída pelo método descrito em USEPA (1994a).

Para a análise, a amostra foi introduzida por nebulização pneumática para um plasma de rádio frequência, onde o processo de transferência de energia causa dessolvatação, atomização e ionização. Os íons são extraídos do plasma para o interior de um espectrômetro de massas quádruplo, mantidos sob baixa pressão e são detectados por um detetor de dinodos, de acordo com ASTM (1996).

Com relação às amostras de água intersticial, após obtenção por centrifugação, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para o sedimento bruto.

No que se referiu especificamente às amostras da interface sedimento/água, uma vez que o laboratório químico não poderia efetuar a determinação de metais nos 25 pontos de amostragem, somente as amostras 1 a 5, 15 e 18 (réplica a), 7 e 14 foram analisadas. A escolha foi feita em função de informações anteriores do potencial de contaminação desses locais. Nessas amostras, os metais foram determinados por espectrometria de absorção atômica, conforme procedimentos descritos no Standard Methods (APHA *et al.*, 1992).

As determinações de sulfeto na água intersticial também foram realizadas de acordo com os procedimentos do Standard Methods (APHA *et al.*, 1992).

3.3.3 - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

As amostras de sedimento foram submetidas à extração com diclorometano e o extrato final analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, para a presença dos compostos orgânicos

prioritários semivoláteis. A análise foi quantitativa, baseada no uso de hidrocarbonetos poliaromáticos deuterados como padrões internos e padrões certificados dos compostos em questão, segundo USEPA (1994b).

3.3.4 - Granulometria

A determinação de granulometria por peneiramento e o tempo de decantação para as partículas finas seguiu a Norma Técnica L6.160 (CETESB, 1995). As amostras foram primeiramente tratadas com peróxido de hidrogênio para a eliminação de todo o seu conteúdo orgânico. Posteriormente procedeu-se à determinação granulométrica propriamente dita, realizada por peneiramento a seco para a fração de areia e sedimentação por pipetagem para as frações de silte e argila. Na determinação da distribuição granulométrica foi empregada a escala de Wentworth .

A classificação dos sedimentos foi realizada de acordo com SHEPARD apud SUGUIO (1973), empregando-se o “software” desenvolvido pelo Prof. Dr. Jorge Yamamoto, do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo.

3.4 - Testes de toxicidade

3.4.1 - Matrizes utilizadas nos testes de toxicidade

CARR *et al.* (2001) elaboraram um documento compilando orientações de diversos pesquisadores para a realização de testes de toxicidade com água intersticial. Dentre elas, recomenda-se que amostras de sedimento devem ser manuseadas o mais rápido possível após a coleta, não ultrapassando 14 dias. Caso a água intersticial seja a matriz a ser testada, a mesma deve ser removida do sedimento o quanto antes, sendo que o congelamento da amostra pode ser efetuado na impossibilidade de realização imediata do teste. No presente trabalho, as amostras de água

intersticial foram extraídas no prazo de 2 a 8 dias, enquanto que as amostras com a interface sedimento/água foram manuseadas num prazo de 3 a 8 dias após a coleta. Em ambos os casos, o teste de toxicidade foi iniciado no máximo após 24 horas.

3.4.1.1 - Água intersticial

Para extração da água intersticial, o sedimento foi homogeneizado em cubas de polietileno com o auxílio de colheres e espátulas do mesmo material, sendo transferido para frascos de 500mL da centrífuga, devidamente pesados. Utilizou-se a velocidade de rotação de 4000 rpm durante 30 minutos e no final desse período, após a retirada da água intersticial, foi efetuada uma segunda centrifugação na mesma velocidade durante 15 minutos. As amostras foram então transferidas para frascos descartáveis de polietileno com 250mL de capacidade, devidamente rotulados e mantidos sob refrigeração até o início do teste, que não excedeu o prazo máximo de 24 horas após a centrifugação.

3.4.1.2 - Interface sedimento/água

O método utilizado foi baseado em ANDERSON *et al.* (1996), com modificações quanto ao tamanho e tipo de material utilizado na confecção do frasco-teste. Esse frasco, de vidro com formato cilíndrico, apresenta 14,5cm de altura e diâmetro interno de 4cm. A 3cm da base contém uma rede de malha 60µm e a 1 cm da base apresenta um furo de aproximadamente 0,5cm de diâmetro, para evitar a formação de bolhas (Figura 2).

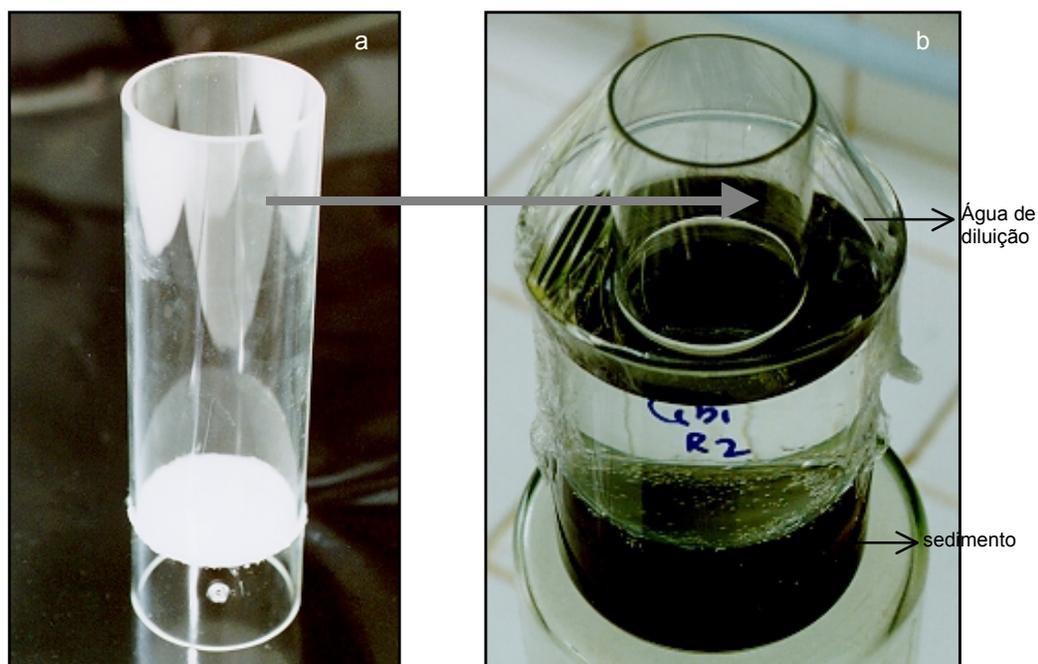


FIGURA 2 - Frasco-teste utilizado nos testes de toxicidade na interface sedimento/água (a); Sistema-teste (b).

No dia anterior ao início do experimento, o sedimento foi homogeneizado em cubas de polietileno com o auxílio de colheres e espátulas do mesmo material, sendo transferidos cerca de 150g de sedimento, que não ultrapassaram 2cm de altura, a partir da base dos béqueres de 1L. Em seguida, cuidadosamente, para minimizar a ressuspensão do sedimento, foram adicionados 750mL de água do mar de boa qualidade, proveniente de São Sebastião, litoral do estado de São Paulo, filtrada em cartuchos de celulose de 1 e 5 μ m e carvão ativado, e aeração suave (Figura 3).



FIGURA 3 - Vista parcial da montagem experimental do teste de toxicidade na interface sedimento/água.

Salienta-se que a água marinha deste local tem sido utilizada há vários anos em testes de toxicidade com *L. variegatus*, nos trabalhos realizados pela CETESB, e como meio de cultura para o crustáceo misidáceo *Mysidopsis juniae*, mantido em laboratório (PRÓSPERI & NIPPER, 1989a,b; NIPPER *et al.*, 1990, 1991, 1992, 1993; NIPPER & PRÓSPERI, 1992,1993; PRÓSPERI *et al.*, 1996, 1998).

Em seguida aguardou-se cerca de 12 horas, para estabilização do sistema, sendo posteriormente instalado, no interior dos béqueres, os frascos-teste (Figura 2), onde os ovos de *L. variegatus* foram adicionados.

Previamente à execução do presente estudo, foi realizada uma avaliação preliminar do método “interface sedimento/água”, referente ao manuseio do sedimento e treinamento da metodologia. O objetivo foi verificar os possíveis problemas técnicos para sua execução, de tal forma que os eventuais acertos pudessem ser realizados antes do início deste estudo. Através deste ensaio prévio verificou-se que:

- béqueres de 1L, modelo Griffin, são mais adequados em função da altura e diâmetro;
- frascos com capacidade para 20mL são mais apropriados para o armazenamento das amostras com formol, pois a retirada dos organismos do tubo-teste ocorre através da lavagem do mesmo, gerando maior volume final de amostra a ser armazenada, quando comparado ao teste com água intersticial;
- a transferência da amostra do tubo-teste para o frasco de armazenamento é facilitada através do uso de um funil acoplado ao mesmo;
- após a retirada do tubo-teste do interior do béquer que contém a amostra de sedimento, a lavagem da parte externa deste tubo é facilitada se o mesmo for introduzido numa cuba com água marinha limpa, evitando, dessa forma, que os organismos fiquem fora do meio líquido enquanto esse procedimento é realizado.

3.4.2 - Ajuste de salinidade

Testes prévios indicaram que *L. variegatus* apresenta taxa de fecundação normal em salinidades acima de 30‰ (NIPPER *et al.*, 1991). Uma vez que neste projeto foram utilizadas amostras de áreas estuarinas, aquelas amostras que apresentaram salinidade inferior a 30‰, nos testes com água intersticial, foram ajustadas para esta salinidade, antes do início dos experimentos.

Esse ajuste foi realizado por acréscimo de quantidade conhecida de salmoura, preparada por congelamento da água do mar, seguido de descongelamento, com retenção de fração da amostra que derreteu inicialmente, sendo que a salinidade final da salmoura não foi superior a 100‰. Para cálculo da quantidade de salmoura a ser adicionada nas amostras utilizou-se a fórmula, sugerida por SALOMÃO (1978):

$$V_s = \frac{V_t}{\frac{S_s - S_d}{S_d - S_e} + 1}$$

Onde:

V_s = volume de salmoura

V_t = volume total da amostra a ser preparada

S_s = salinidade da salmoura

S_d = salinidade desejada

S_e = salinidade original da amostra

Quando foi necessário o ajuste de salinidade (amostras 1, 2a a 5a, 6, 8 a 14), além do controle com água de diluição, também foi preparado um controle com salmoura e água desionizada, para verificação da influência da salmoura sobre os organismos-teste.

3.4.3 - Variáveis físicas e químicas controladas durante os testes de toxicidade

Tanto o teste com água intersticial quanto com a interface sedimento/água foram mantidos durante todo o período experimental em banho-maria para manutenção da temperatura constante ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

Para cada amostra e controle experimental, no início e término de ambos os testes, foram efetuadas medidas de temperatura (com termômetro de imersão); salinidade (com refratômetro com compensação de temperatura); oxigênio dissolvido (por método eletroquímico); pH (com potenciômetro) e amônia total.

Para cada amostra, em ambos os testes, foram preparadas três réplicas. No experimento com água intersticial, também foram preparados dois frascos adicionais para leitura das variáveis físicas e químicas anteriormente mencionadas, no final do período de exposição. Já nos testes de toxicidade da interface sedimento/água foram retiradas sub-amostras de

10mL de cada uma das três réplicas, para realização das referidas medidas. Essas sub-amostras foram obtidas com o auxílio de uma pipeta automática, posicionada a aproximadamente 1cm acima do sedimento.

3.4.4 - Sensibilidade dos organismos

Os resultados dos testes de toxicidade, expressos através da concentração de inibição mediana a 50% dos organismos expostos, após 24h de exposição (CI50;24 horas), devem situar-se no intervalo delimitado por duas vezes o desvio padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para a mesma espécie (WEBER, 1993).

A sensibilidade do lote de organismos foi avaliada através de testes de toxicidade com a substância de referência sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Esses experimentos foram realizados em paralelo às amostras ambientais, num total de nove testes. Resultados obtidos anteriormente para essa espécie e substância estão apresentados em PRÓSPERI (1998).

Também foram realizados cinco experimentos com cloreto de amônio, para determinação da faixa de sensibilidade do organismo-teste à amônia não-ionizada, uma vez que esta substância é considerada um interferente nos resultados dos testes com sedimento.

3.4.4.1 - Soluções

Todas as soluções foram preparadas no dia da realização dos testes utilizando-se balões volumétricos e pipetas automáticas, à temperatura de $25 \pm 2^\circ C$.

Foram analisadas cinco concentrações-teste para sulfato de zinco heptahidratado (0,018; 0,032; 0,058, 0,1 e 0,18 mg Zn/L) e cloreto de amônio (0,5; 0,95; 1,8; 3,4 e 6,5 mg NH_3/L), com três réplicas por concentração.

3.4.5 - Organismo-teste

A espécie indicada na norma CETESB (1999), *Lytechinus variegatus* (Figura4), pertence ao Filo Echinodermata, Classe Echinoidea, Subclasse Euechinoidea, Superordem Echinacea, Ordem Temnopleuroida (BARNES, 1984). Ocorre na região litorânea, sobre substratos arenosos e lodosos, e apresenta-se fértil o ano todo, viabilizando assim a execução de ensaios com gametas e embriões.

Os indivíduos não apresentam dimorfismo sexual, tendo carapaça regularmente hemisférica e achatada inferiormente, de cor verde com as zonas inter-ambulacrais e os espaços entre os poros mais claros, e coloração dos espinhos variando desde o verde até púrpura arroxeadado com tons esverdeados. Essa espécie é bastante comum na região do Caribe e na Costa Atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do Norte (EUA) até a Costa Sudeste do Brasil (GIORDANO, 1986).

Os exemplares de ouriços-do-mar foram coletados por mergulho em São Sebastião/SP e mantidos em aquários com fluxo contínuo de água do mar, contendo macroalgas oriundas do mesmo local, no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, São Sebastião/SP, onde os testes foram realizados.



FIGURA 4 - *Lytechinus variegatus* adulto

3.4.6 - Planejamento experimental para a realização dos testes de toxicidade

A Figura 5 apresenta as etapas do planejamento experimental utilizado para a realização dos experimentos. As metodologias estão detalhadas nos itens a seguir.

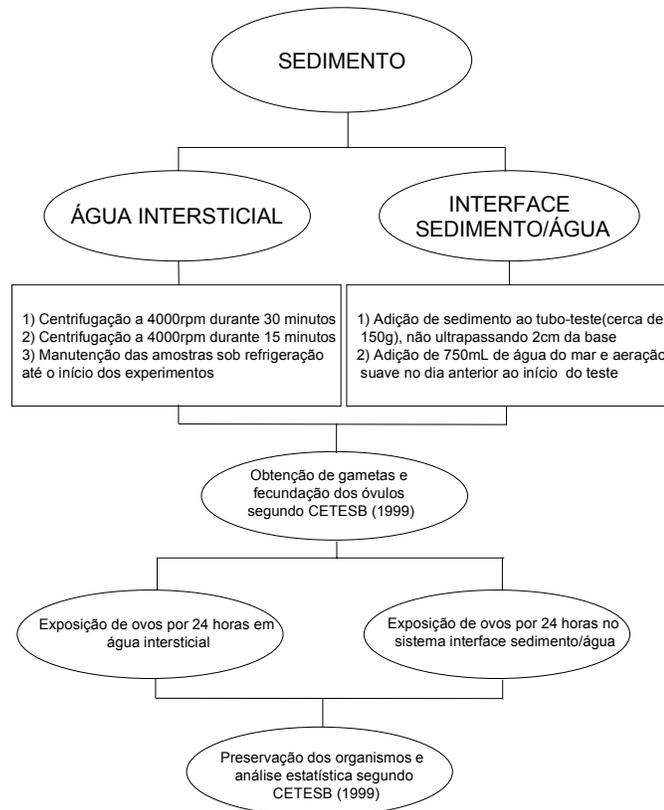


FIGURA 5 - Etapas do planejamento experimental utilizado para a realização dos testes de toxicidade.

O teste de toxicidade foi realizado segundo CETESB (1999). O referido ensaio consistiu na exposição de ovos do organismo-teste a várias concentrações de um agente tóxico ou amostra ambiental, durante a totalidade do período de desenvolvimento embrionário, que é de 24 a 28 horas. Tal procedimento permitiu a obtenção da concentração de inibição a 50% dos organismos (CI50) das substâncias sulfato de zinco heptahidratado e do cloreto de amônio ou indicou se a amostra de sedimento apresentou, ou não, efeito tóxico, durante o período de exposição. Salienta-se que para o

teste referente à interface sedimento/água foram feitas algumas modificações para adequação da metodologia, conforme indicado na Tabela 6.

TABELA 6 - Procedimentos utilizados durante a realização dos testes ecotoxicológicos com *L. variegatus*.

CONDIÇÕES	ÁGUA INTERSTICIAL/SULFATO DE ZINCO/CLORETO DE AMÔNIO (CETESB, 1999)	INTERFACE SEDIMENTO/ÁGUA
Sistema	Estático	Estático
Água de diluição	Água do mar natural filtrada em cartuchos de celulose de 1 e 5 µm e carvão ativado	Água do mar natural filtrada em cartuchos de celulose de 1 e 5 µm e carvão ativado
Temperatura	25±2°C	25±2°C
pH	7,8 a 8,3	7,8 a 8,3
Salinidade	33±3 ‰	33±3 ‰
Fotoperíodo	16h luz e 8h escuro	16h luz e 8h escuro
Volume da amostra	10mL de água intersticial	180 mL de água de diluição (no interior do frasco-teste) (*)
Tempo e velocidade de centrifugação da amostra	30 minutos a 4000 rpm + 15 minutos a 4000rpm	Amostra não é centrifugada (*)
Presença de sedimento durante o teste	Não	Sim (cerca de 150g, não ultrapassando 2cm da base do béquer) (*)
Idade dos organismos	ovos de <i>L. variegatus</i>	ovos de <i>L. variegatus</i>
Aeração	Não	Sim (*)
Alimentação	Nenhuma	Nenhuma
Frasco-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 10mL	Erlenmeyer + frasco-teste, conforme Figura 2 (*)
Nº organismos/frascos-teste	300 ovos	1000 (*)
Duração do teste	24 a 28 hs	24 a 28 hs
Preservação dos embriões	Formol tamponado com bórax (concentração de 0,4% nas amostras)	Formol tamponado com bórax (concentração de 0,4% nas amostras)
Efeito observado	Desenvolvimento embrio-larval	Desenvolvimento embrio-larval
Expressão do resultado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CI50 para sulfato de zinco e cloreto de amônio; ▪ Tóxica ou não tóxica, para amostras de água intersticial 	Tóxica ou não tóxica

(*) - modificações em relação ao método com água intersticial

3.4.6.1 - Preparo das amostras

Os frascos-teste foram numerados aleatoriamente e registrados na ficha de controle do teste. Nos testes com água intersticial e substância de referência foram utilizados tubos de ensaio com capacidade para 10mL e nos testes de interface sedimento/água foram usados béqueres de 1L e frascos-teste (Figura 2), conforme já descritos anteriormente.

Frascos de 11 mL (para os testes com água intersticial e substância de referência) e de 20mL (para os testes com a interface sedimento/água), com tampa, receberam a mesma numeração dos frascos-teste, pois foram utilizados ao final do experimento para preservação das amostras com formol.

Nos experimentos com água intersticial foram preparadas três réplicas para cada amostra, além de duas réplicas para as medidas das variáveis físicas e químicas analisadas no final do teste. Para o controle experimental também foram preparadas outras cinco réplicas adicionais, utilizadas para avaliação do momento adequado para encerramento do teste. No caso de amostras cuja salinidade foi ajustada, foram preparadas, também, cinco réplicas com salmoura e água desionizada.

Para os testes com sulfato de zinco heptahidratado e cloreto de amônio foram preparadas 3 réplicas por concentração, e uma réplica extra da menor e da maior concentração, devidamente identificadas e utilizadas ao final do teste, para verificação da salinidade, concentração de oxigênio dissolvido e pH.

As amostras de sedimento foram preparadas de acordo com o procedimento descrito em 3.4.1.1 e 3.4.1.2, e as soluções de sulfato de zinco heptahidratado e cloreto de amônio conforme descrito no item 3.4.4.1.

3.4.6.2 - Obtenção dos gametas

Cerca de 15 a 20 animais adultos foram coletados, de modo a serem obtidos gametas de no mínimo três indivíduos de cada sexo. A superfície dos animais foi previamente lavada com água do mar, para remoção de fezes e outros detritos.

Foram injetados 2,5 mL de KCl em pontos diametralmente opostos na região perioral de cada ouriço. O animal foi agitado suavemente, para que o KCl se espalhasse pela cavidade celômica. Os gametas dos indivíduos maduros foram então liberados através dos gonóporos (Figura 6), localizados na superfície aboral do animal. Esse procedimento promove a liberação de todos os gametas (maduros e imaturos), de tal forma que o organismo não poderá ser reutilizado num curto espaço de tempo. Após a injeção de KCl, os ouriços foram colocados em bandejas plásticas, para que os procedimentos de coleta dos gametas, distintos entre machos e fêmeas, pudessem ser obedecidos.

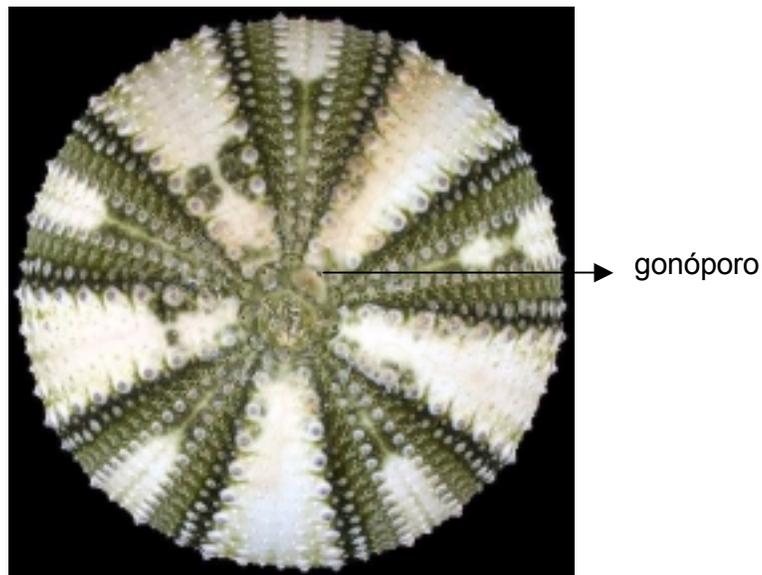


FIGURA 6 - Carapaça de *L. variegatus* adulto, com detalhe do gonóporo.

Machos e fêmeas são identificados pela diferença na coloração dos gametas. Os óvulos, amarelo-alaranjados, foram coletados diretamente em

água do mar. Para tanto, as fêmeas foram apoiadas sobre a superfície de béqueres de 400mL contendo água de diluição à temperatura de teste, com a superfície aboral voltada para baixo. Utilizou-se um béquer, com diâmetro menor que o diâmetro do ouriço, para que este permanecesse pousado na abertura do béquer, com os gonóporos imersos na água. Os óvulos foram coletados durante 15 minutos aproximadamente, para evitar que os imaturos, geralmente liberados com a desova prolongada, se misturassem aos óvulos maduros.

O esperma, identificado por sua cor branca, foi coletado com conta-gotas de ponta fina, diretamente dos gonóporos, e mantidos em béquer de 30 mL sobre gelo até o início dos experimentos. Esse procedimento deve ser obedecido, pois os gametas masculinos, ao entrarem em contato com água do mar, vão perdendo a capacidade de promover a fecundação (STEARNS, 1973).

3.4.6.3 - Tratamento dos gametas

3.4.6.3.1 - Óvulos

Com conta-gotas, retirou-se uma sub-amostra dos óvulos de cada fêmea, coletados nos diferentes béqueres. As amostras foram observadas ao microscópio. Os óvulos utilizados apresentaram-se redondos, lisos e de tamanho homogêneo (Figura 7a). Lotes de óvulos de tamanho ou formato irregular, que é indício de óvulos inviáveis, foram descartados.

Após sedimentação dos lotes de óvulos viáveis, o sobrenadante foi descartado e o restante filtrado através de malha de 150µm e reunidos em um béquer de 1L. Acrescentou-se água de diluição à temperatura de teste, elevando-se o volume para 600 mL. Esse procedimento de lavagem foi repetido três vezes, para facilitar a fecundação.

3.4.6.3.2 - Espermatozóides

O espermatozóide de todos os machos selecionados foi homogeneizado com um bastão de vidro para o preparo da suspensão em água do mar, na proporção de 0,5 mL de espermatozóide (coletado com seringa de 1mL) para 25mL de água marinha, misturando-se bem para dissolução de grumos. A suspensão de espermatozóides foi preparada após o término da lavagem dos óvulos, e usada imediatamente para o processo de fecundação.

3.4.6.4 - Fecundação e cálculo do volume da solução de ovos

Foram acrescentados 1 a 2 mL da suspensão de espermatozóides ao béquer contendo os óvulos e, após aproximadamente cinco minutos, foi preparada uma diluição de 100x (1mL da suspensão contendo os ovos em 99mL de água de diluição, em proveta de 100 mL). Dessa suspensão três sub-amostras de 1mL foram retiradas e transferidas para a câmara de Sedgewick-Rafter, onde o número de ovos, identificados pela membrana de fecundação à sua volta (Figura 7b) foi anotado.

Após a contagem, foi calculada a média dos valores obtidos nas três sub-amostras, multiplicado-se por 100 (fator de diluição), obtendo-se assim o número de ovos fecundados por mL da suspensão. A partir dessa informação foi calculado o volume desta suspensão que continha 300 ovos, que posteriormente foram adicionados ao teste com água intersticial. No teste da interface sedimento/água foram adicionados 1000 ovos. Salienta-se que sempre foi utilizado, em cada teste, um lote de ovos com no mínimo 80% de fecundação.

3.4.6.5 - Adição dos organismos aos frascos-teste

Com uma pipeta automática, foi transferido para os frascos-teste o volume da suspensão que continha 300 ovos (água intersticial ou substância de referência) ou 1000 ovos (interface sedimento/água), no prazo máximo de

30 minutos após o início do processo de fecundação, sendo que esse volume não excedeu 100 μ L. O horário de início do teste foi devidamente registrado.

Posteriormente, foram medidos os valores de salinidade, oxigênio dissolvido e pH de uma sub-amostra do controle e de cada amostra ambiental, bem como da maior e menor concentração de teste com sulfato de zinco e cloreto de amônio. As alíquotas para leitura da amônia foram preservadas com ácido sulfúrico ($\text{pH} \leq 2$). Os testes foram mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em fotoperíodo de 16h luz-8h escuridão, por 24 horas.

3.4.6.6 - Encerramento do teste de toxicidade

Ao final de 24 horas, separou-se o conteúdo de uma das réplicas extras do controle dos ensaios com água intersticial, e uma sub-amostra do controle dos experimentos de interface sedimento/água, retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em ambos os casos, essas amostras foram transferidas para um dos frascos com tampa contendo cerca de 5 gotas de formol.

Essas amostras foram analisadas ao microscópio, para verificação do estágio de desenvolvimento de 100 embriões e, se as larvas se apresentavam em estágio de pluteus bem desenvolvido, com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo de larva (Figura 7j), o teste era encerrado. Caso contrário na 25^a e, subseqüentemente, até a 28^a hora, esse processo poderia ser repetido sem que o teste fosse invalidado.

Após a verificação, nos experimentos com água intersticial, o conteúdo de cada tubo de ensaio (exceto os tubos preparados para as análises físicas e químicas) foi então transferido para o frasco

correspondente, contendo 5 gotas de formol. Cada frasco foi imediatamente tampado e agitado suavemente, para preservação dos embriões.

Nos testes de toxicidade da interface sedimento/água, seguiu-se o seguinte procedimento :

- Para composição da amostra a ser avaliada quanto às variáveis físicas e químicas, cerca de 30mL de cada réplica foram retirados, com o auxílio de uma pipeta automática de 10mL, posicionada a aproximadamente 1cm do sedimento. Quando foi o caso (pontos 1, 2 a 5a, 7, 14, 15a e 18a), foi retirado com o auxílio de um sifão (tubo de aeração, acoplado a um pipeta de boca arredondada) o volume de 1L, composto das 3 réplicas, para determinação de metais (Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Ni e Zn);
- O frasco-teste que continha os embriões foi retirado do béquer e lavado externamente, quando necessário, com água do mar limpa, para eliminação do sedimento aderido nas bordas externas;
- Os embriões foram transferidos do frasco-teste com o auxílio de uma pisseta de água do mar e um funil plástico, acoplado ao frasco de 20mL já contendo 10 gotas de formol.

3.4.6.7 - Leitura das amostras

Na leitura do teste embrio-larval, de acordo com norma CETESB (1999), primeiramente deve ser registrado o número de larvas pluteus normais (tamanho do corpo igual ao comprimento do corpo) (Figura 7j) e anormais no controle, num total de cem indivíduos. A seguir, a leitura das amostras é realizada através da comparação das larvas pluteus com aquelas do controle.

No presente estudo, a leitura foi ampliada através da introdução do registro dos estágios anteriores a pluteus normais. Para tanto, foram também anotados o número de pluteus pequenos (tamanho menor do que a

larva normal), gástrula (Figura 7i), mórula (Figura 7g), blástula (Figura 7h), outras divisões (divisões anteriores à mórula, por exemplo ovo com 2, 4 ou 8 células, Figuras 7c a 7f) e indivíduos deformados.

Para a leitura propriamente dita, foram observados os 100 primeiros organismos, de cada réplica, que apareceram no campo do microscópio (aumento 100x), em câmara de Sedgewick-Rafter. Primeiramente procedeu-se à leitura do controle, que serviu como referência para as demais amostras. Posteriormente, a leitura do teste foi realizada aleatoriamente, sendo que esses dados foram registrados na ficha de teste.

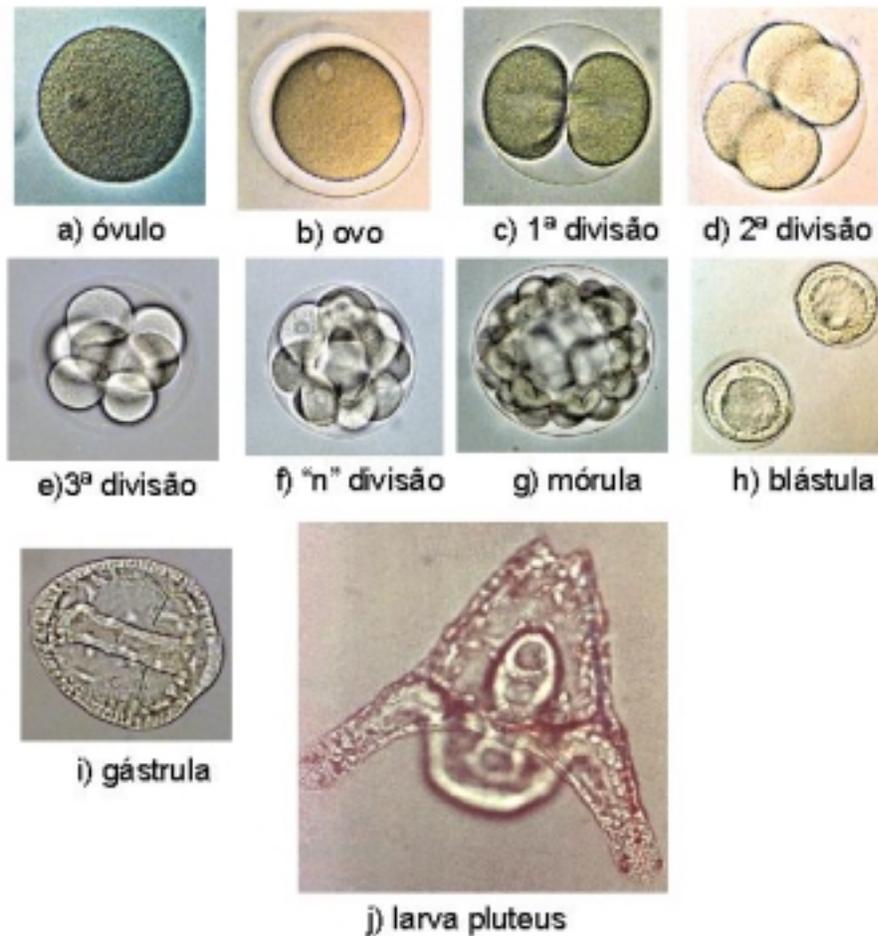


FIGURA 7 - Estágios do desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus* avaliados durante a leitura dos testes de toxicidade.

3.4.6.8 - Aceitabilidade dos resultados dos testes ecotoxicológicos

Foram considerados válidos os testes nos quais:

- A porcentagem de pluteus normais no controle experimental foi superior ou igual a 80%;
- resultado do teste de toxicidade com a substância de referência sulfato de zinco heptahidratado, realizado em paralelo às amostras ambientais, encontrou-se dentro do intervalo delimitado por dois desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para a mesma espécie.

3.5 - Análise estatística dos resultados

3.5.1 - Sulfato de zinco heptahidratado e cloreto de amônio

Para análise dos resultados dos testes de toxicidade com as substâncias sulfato de zinco heptahidratado e cloreto de amônio foi calculada a CI50; 24h. Esse cálculo foi realizado através do método de interpolação linear ICP (NORBERG-KING, 1993).

3.5.2 - Amostras de sedimento

Para a análise estatística dos resultados dos testes de toxicidade crônica de curta duração com *L. variegatus* em águas superficiais e sedimentos, a norma CETESB (1999) indica o teste “t” de Student. Entretanto, devido à possibilidade de obtenção de “falsos positivos”, onde os efeitos são estatisticamente significativos, mas não importantes do ponto de vista biológico, bem como de “falsos negativos”, onde existem efeitos adversos, mas não são detectados por imprecisões na realização do teste, como variação biológica intrínseca dos organismos experimentais, número inadequado de réplicas, etc., optou-se pelo uso do teste “t” por bioequivalência (ERICKSON & MCDONALD, 1995), disponível no programa estatístico Toxstat 3.5 (WEST & GULLEY, 1996). Assim, para analisar a

ocorrência ou não de efeito tóxico comparou-se o resultado do teste do controle experimental (amostra 4b) com os resultados dos testes das diversas amostras.

O teste de hipóteses por bioequivalência permite detectar, para o parâmetro considerado, neste caso, o desenvolvimento embrio-larval, se as médias obtidas no controle e na amostra diferem significativamente. Essa avaliação requer a definição da porcentagem de efeito acima da qual é considerada não só estatística, mas também biologicamente significativa. Assim, para a aplicação do teste de bioequivalência foi necessário o estabelecimento da constante r , a qual incorpora a porcentagem de efeito biologicamente relevante. Um dos métodos para definição dessa constante r , fundamenta-se no estabelecimento da DMS (Diferença Mínima Significativa) e que, segundo THURSBY *et al.* (1997), constitui uma abordagem que pode ser aplicada à grande maioria dos procedimentos estatísticos.

Para o estabelecimento do r , foi efetuado o levantamento dos valores da DMS obtidos nos cálculos dos testes de hipóteses convencionais de ensaios de toxicidade com efluentes, substâncias químicas e amostras ambientais realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB, totalizando 167 dados para *L. variegatus*.

Os testes de hipóteses convencionais foram efetuados através do programa Toxstat 3.5 (WEST & GULLEY, 1996) foram conduzidos, primeiramente, testes de normalidade (Shapiro Wilks e χ^2). Em seguida, para a análise de homogeneidade de variância, aplicou-se o teste de Levene, utilizando os dados transformados para arco seno, obtidos com amostras de efluentes e substâncias químicas. Para as amostras ambientais, onde os dados não foram transformados, utilizou-se o teste "F". Posteriormente, para efluentes e substâncias químicas, foi aplicado o método de comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos e do controle (procedimento de

Dunnett) e para amostras ambientais, incluindo uma única concentração e o controle, foi aplicado o teste “t” de Student.

Para todos os tipos de amostra, foram obtidos os valores de DMS como uma porcentagem em relação à resposta obtida no controle ($\% \text{ DMS} = \text{DMS} / \text{m\u00e9dia do controle} \times 100$). Estes foram ordenados para identifica\u00e7\u00e3o da DMS cr\u00edtica (75\u00b0 percentil), ou seja, 75% dos dados s\u00e3o iguais ou inferiores a este valor, de acordo com o intervalo de dados de DMS analisados. Finalmente, o r foi calculado subtraindo-se de 100 o valor de DMS cr\u00edtico (correspondente ao 75\u00b0 percentil).

Utilizando-se os valores ordenados, foi definido que o valor da DMS corresponde a 12%, ou seja, 75% dos resultados foram iguais ou menores que esse valor. Subtraindo-se o mesmo de 100, obteve-se 88% e, portanto, o valor de r utilizado nos testes de bioequival\u00eancia aplicados aos resultados de testes de toxicidade cr\u00f4nica com *L. variegatus* e amostras ambientais pela CETESB foi de 0,88. Da mesma forma, no presente estudo, tamb\u00e9m foi utilizado este valor de r .

Para a an\u00e1lise de correla\u00e7\u00e3o dos resultados dos testes de toxicidade e das an\u00e1lises de hidrocarbonetos polic\u00edclicos arom\u00e1ticos (HPAs), metais, granulometria e am\u00f4nia foi utilizada a t\u00e9cnica de correla\u00e7\u00e3o can\u00f4nica, cujo princ\u00edpio b\u00e1sico \u00e9 desenvolver uma combina\u00e7\u00e3o linear em cada um dos conjuntos de vari\u00e1veis, tal que a correla\u00e7\u00e3o entre os dois conjuntos seja maximizada. Na correla\u00e7\u00e3o can\u00f4nica n\u00e3o existe a distin\u00e7\u00e3o entre vari\u00e1vel independente e dependente, existem somente dois conjuntos de vari\u00e1veis em que se busca a m\u00e1xima correla\u00e7\u00e3o entre ambos (MORRISON, 1990).

Primeiramente, dentre os dados observados, foram exclu\u00eddos aqueles que possu\u00edam alta correla\u00e7\u00e3o (acima de 0,997) para evitar problemas de multicolinearidade. Par\u00e2metros que apresentaram resultados constantes para todos os pontos de amostragem tamb\u00e9m foram exclu\u00eddos por n\u00e3o

serem informativos no sentido estatístico. Quando o valor de concentração foi, em algumas amostras, inferior ao limite de detecção do método, foi considerado este limite como indicativo da respectiva concentração. Nessa avaliação o valor de “p” indica o nível de significância, e o valor obtido na correlação, quanto mais próximo de 1, evidencia que a mesma é mais elevada.

No caso específico da avaliação do efeito da amônia não ionizada nos diversos estágios de desenvolvimento embrio-larval, foi aplicada a análise de regressão linear simples com estimadores de mínimos quadrados.

As análises de correlação canônica e regressão linear simples foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Statistica (STATSOFT, 1998). O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

4. RESULTADOS

Avaliações ecotoxicológicas de sedimentos devem incluir um controle negativo, que é o sedimento livre de contaminantes. Esse controle negativo é usado para avaliar a aceitabilidade do teste, evidenciando a saúde dos organismos. Por outro lado, um sedimento referência também pode ser utilizado, sendo proveniente da área de estudo e apresentando-se como um indicador das condições locais (ASTM, 2000).

No início do presente projeto foi definido que o sedimento controle (controle negativo) seria aquele proveniente de São Sebastião, São Paulo, local de coleta de *L. variegatus*, uma vez que no experimento preliminar com a interface sedimento/água, realizado em janeiro/99, o sedimento dessa região não apresentou efeito tóxico sobre os embriões desse equinodermo.

Entretanto, durante a realização deste estudo, com ambos os métodos empregados, foram observados efeitos adversos sobre *L. variegatus* nas amostras provenientes desse sedimento controle. A porcentagem de pluteus normais presente nos testes com água intersticial foi de 0% (em março e maio) e, na interface sedimento/água, realizado em maio, foi de 55%, inviabilizando o uso desse sedimento como controle negativo. Já, com relação ao sedimento referência, não havia indicativo de um ponto de amostragem que, a princípio, pudesse ser utilizado para esta finalidade.

Após a realização dos experimentos e do levantamento das informações referentes à granulometria e características químicas, optou-se por considerar a amostra da Ilha dos Canéus (ponto 4b) como sedimento referência e, conseqüentemente, como controle experimental a ser utilizado nas análises estatísticas. Também foi considerado para essa escolha, o fato da amostra 4b apresentar porcentagem de pluteus normais similar àquela

observada na água marinha (água de diluição) utilizada para verificação do estágio de desenvolvimento embrio-larval, no final do experimento (Figura 8).

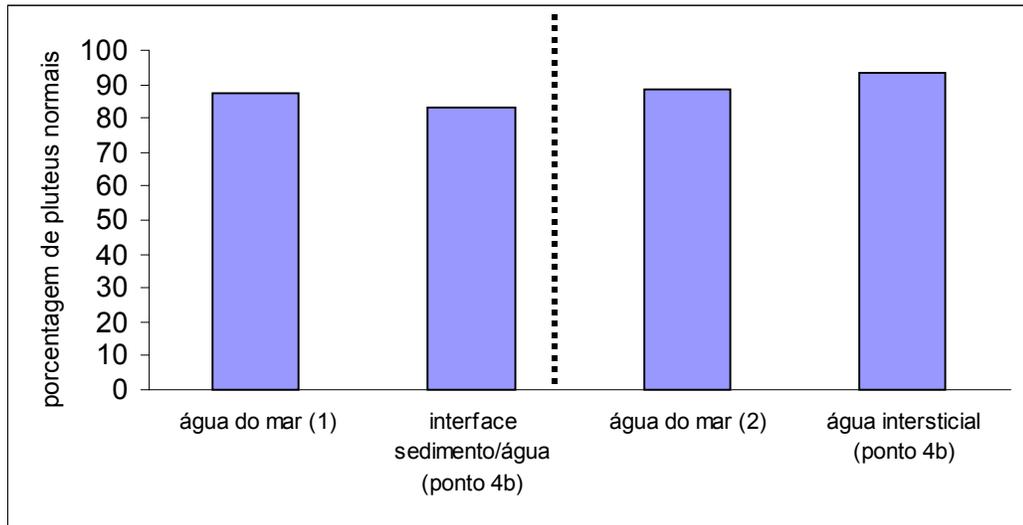


FIGURA 8 - Porcentagem de pluteus normais de *L. variegatus* na água do mar (1 e 2), em paralelo aos testes com o sedimento referência (ponto 4b), na interface sedimento/água e água intersticial.

No estudo “Sistema Estuarino da Baixada Santista” (LAMPARELLI *et al.*, 2001), os autores optaram por adotar os critérios estabelecidos pelo Canadá e Estados Unidos (FDEP,1994; ENVIRONMENT CANADA, 1999) (Anexo I), para classificação da qualidade dos sedimentos analisados, uma vez que a legislação ambiental brasileira não dispõe de critérios específicos e também não existiam dados de valores basais, isto é, anteriores à contaminação antropogênica, para as substâncias químicas nos sedimentos da região de estudo.

Os valores das substâncias apresentadas nesse critério foram derivados a partir do seu comportamento e persistência nos sedimentos,

potencial de bioacumulação e efeitos sobre organismos aquáticos e discriminam dois níveis de classificação:

a) TEL (“Threshold Effect Level”), que representa a concentração abaixo da qual não são esperados efeitos adversos sobre organismos aquáticos

b) PEL (“Probable Effect Level”), que se refere à concentração acima da qual ocorrem efeitos adversos severos sobre a biota aquática. Concentrações intermediárias entre o TEL e o PEL apresentam probabilidade de ocorrência de efeitos ocasionais sobre os organismos (Anexo I).

Através dessa linha de avaliação, no ponto 4b, adotado como sedimento referência para os testes ecotoxicológicos, foi verificada a presença de mercúrio (0,76µg/g) acima do PEL e de acenaftileno (13µg/Kg), na faixa onde efeitos deletérios ocasionais podem ocorrer.

Com relação ao mercúrio, ressalta-se que, no teste de solubilização de sedimentos, que ocorre sob condições físicas e químicas brandas, simulando a liberação de contaminantes para o ambiente, essa substância esteve presente em concentrações abaixo do limite de detecção do método (<0,0002 mg/L) (LAMPARELLI *et al.*, dados não publicados). Embora a comparação direta não possa ser realizada, essa informação é um indicativo de que o mercúrio determinado na amostra do sedimento referência não estaria disponível acima dessa concentração. Salienta-se que no trabalho de KOBAYASHI (1995) a concentração de 0,01mg/L de mercúrio promoveu efeito deletério sobre 50% dos indivíduos da espécie de ouriço *Anthocardaris crassispina*.

4.1 - Critérios de aceitabilidade dos testes de toxicidade

Conforme apresentado anteriormente, a porcentagem de pluteus bem desenvolvidos de *L. variegatus*, nos sedimentos referência foi superior a

80% (Figura 8). Além disso, com relação aos testes para avaliação da sensibilidade dos ouriços com sulfato de zinco heptahidratado, os mesmos indicaram CI50;24h variando de 0,05 a 0,12 mg Zn/L, com média de 0,07mg Zn/L (Tabela 7). Em PRÓSPERI (1998), dados anteriormente obtidos para a mesma espécie indicaram CI50;24h média de 0,07mg Zn/L e o intervalo delimitado por dois desvios-padrão de 0,03 a 0,12mg Zn/L.

Dessa forma, os resultados dos testes de toxicidade obtidos no presente estudo apresentaram-se dentro da faixa de sensibilidade estabelecida anteriormente para os organismos-teste.

TABELA 7 - Valores de CI50;24h obtidos nos testes de toxicidade com *L. variegatus* e sulfato de zinco.

DATA	SULFATO DE ZINCO (mg Zn/L) CI50; 24h
21/01/99 ⁽²⁾	0,05
27/01/99 ⁽²⁾	0,07
24/02/99 ⁽²⁾	0,08
03/03/99 ⁽²⁾	0,09
24/03/99 ⁽¹⁾	0,12
25/03/99 ⁽¹⁾	0,05
04/05/99 ⁽¹⁾	0,05
11/05/99 ⁽¹⁾	0,08
07/10/99 ⁽²⁾	0,07
MÉDIA	0,07

⁽¹⁾ testes realizados em paralelo às amostras ambientais.

⁽²⁾ testes realizados em paralelo aos testes com amônia não ionizada

A norma CETESB (1999) recomenda que no final do experimento a concentração de oxigênio dissolvido deve ser maior ou igual a 3,9mg/L. Observou-se que a concentração de oxigênio dissolvido inicial, nas amostras de água intersticial e nas amostras dos testes da interface sedimento/água,

durante todo o período experimental, estiveram sempre acima do nível mencionado (Tabelas 8 e 9). Entretanto, somente no final do experimento com água intersticial nas amostras 6, 7b, 11, 15b, 16 e 17 ocorreram valores inferiores a 3,9mg/L (Tabela 8).

TABELA 8 - Características físicas e químicas das amostras de água intersticial, provenientes de sedimentos coletados na Baixada Santista, durante os experimentos com *L. variegatus*.

AMOSTRA	INÍCIO DO TESTE				TÉRMINO DO TESTE			
	TEMPERATURA (°C)	SALINIDADE (‰)	pH (unidades)	O.D. (mg/L)	TEMPERATURA (°C)	SALINIDADE (‰)	pH (unidades)	O.D. (mg/L)
1	25,0	31	8,2	6,4	26,0	31	8,1	5,9
2a	25,0	30	8,1	6,3	26,0	30	8,1	5,9
2b	25,0	31	8,0	6,2	26,0	31	8,1	5,7
3a	25,5	31	8,1	6,2	25,0	31	8,1	5,3
3b	25,5	31	8,2	6,4	25,0	31	8,3	5,4
4a	25,5	30	8,2	6,2	25,0	30	8,0	5,6
5a	25,5	30	8,1	6,0	25,0	30	8,0	5,3
5b	25,5	31	8,0	5,2	25,0	31	7,9	5,4
6	25,5	31	8,4	6,5	25,0	31	8,2	1,1
7a	25,5	32	8,0	5,9	25,0	32	7,9	5,2
7b	25,5	33	7,9	4,1	25,0	32	7,9	3,4
8	25,0	30	8,2	6,5	26,0	30	8,2	5,5
9	25,5	32	8,1	6,4	25,0	31	8,2	5,9
10	25,5	31	8,3	6,4	25,0	31	8,2	5,8
11	25,5	31	8,4	6,4	25,0	30	8,3	3,4
12	25,5	31	8,4	6,3	25,0	30	8,2	5,4
13	25,0	30	8,0	6,0	26,0	30	8,0	5,3
14	25,0	30	8,1	6,4	26,0	30	8,1	5,8
15a	25,5	34	8,1	6,2	25,0	34	7,9	5,0
15b	25,5	33	8,2	6,3	25,0	33	8,1	2,8
16	25,5	31	7,9	5,7	25,0	32	7,8	3,3
17	25,5	34	8,0	6,2	25,0	34	7,6	3,4
18a	25,5	34	8,1	5,3	25,0	34	8,0	5,3
18b	25,5	34	8,1	6,0	25,0	34	8,0	5,5
4b*	25,5	30	8,0	6,2	25,0	30	7,9	5,5

* sedimento referência

TABELA 9 - Características físicas e químicas da interface sedimento/água, provenientes das amostras de sedimentos coletados na Baixada Santista, durante os experimentos com *L. variegatus*.

AMOSTRA	INÍCIO DO TESTE				TÉRMINO DO TESTE			
	TEMPERATURA (°C)	SALINIDADE (‰)	pH (unidades)	O.D. (mg/L)	TEMPERATURA (°C)	SALINIDADE (‰)	pH (unidades)	O.D. (mg/L)
1	25,0	33	8,1	6,2	26,0	32	7,8	5,0
2a	25,0	33	8,1	6,3	26,0	33	7,8	5,4
2b	25,0	33	8,0	6,4	26,0	32	7,8	5,3
3a	25,5	33	8,0	6,4	26,0	33	7,8	5,4
3b	25,5	34	8,0	6,3	26,0	34	7,9	5,2
4a	25,5	33	8,0	6,4	26,0	33	7,8	5,4
5a	25,5	33	8,0	6,3	26,0	33	7,8	5,2
5b	25,5	33	8,0	6,4	26,0	34	7,8	5,0
6	25,5	34	8,1	6,1	26,5	34	7,9	4,9
7a	24,5	35	8,1	6,2	25,0	35	8,0	5,3
7b	24,5	35	8,0	6,2	25,0	34	7,9	5,0
8	25,0	34	8,2	6,4	26,0	34	7,9	5,3
9	25,5	33	8,1	6,2	26,5	33	7,8	5,0
10	25,5	34	8,1	6,3	26,5	34	7,9	5,4
11	25,5	35	8,1	6,2	26,5	34	7,9	5,1
12	25,5	34	8,1	6,2	26,5	34	8,0	5,1
13	25,0	34	8,1	6,3	26,0	35	8,0	5,3
14	25,0	35	8,2	6,4	26,0	35	8,0	5,7
15a	25,0	34	8,0	6,3	25,0	34	7,9	5,4
15b	25,0	34	8,0	6,1	25,0	34	7,8	5,2
16	25,0	34	8,1	6,1	25,0	34	7,8	5,3
17	25,0	34	8,0	6,1	25,0	34	7,9	5,4
18a	24,5	35	8,1	6,2	25,0	34	8,0	5,2
18b	24,5	35	8,1	6,2	25,0	35	8,0	5,4
4b*	25,5	33	8,0	6,3	26,0	34	7,8	5,2

* sedimento referência

Os parâmetros relativos às variáveis temperatura e pH, de ambos os tipos de experimento, e salinidade para o teste com a interface sedimento/água, estiveram dentro da faixa de variação aceitável para esses testes (Tabelas 8 e 9). Com relação à salinidade, nos testes com água

intersticial, as amostras que sofreram o processo de salinização (exceto as amostras 7a, 7b, 14, 15a, 15b, 16, 17, 18a e 18b) estiveram abaixo da faixa recomendada pela norma CETESB (1999), que é de $34\pm 2\%$. Sabe-se que a salinização promove a diluição da amostra, em função da adição de salmoura e, conforme pode ser observado na Tabela 10, a porcentagem de água intersticial, após o processo de salinização, apresentou uma variação de 60 a 93% na concentração final das amostras analisadas.

TABELA 10 - Porcentagem de água intersticial nas amostras após o processo de salinização.

AMOSTRA	% DE ÁGUA INTERSTICIAL NA AMOSTRA FINAL
1	72
2a	77
2b	72
3a	60
3b	82
4a	60
5a	69
5b	69
6	93
7a	100 *
7b	100 *
8	87
9	76
10	79
11	89
12	87
13	76
14	100 *
15a	100 *
15b	100 *
16	100 *
17	100 *
18a	100 *
18b	100 *
4b**	75

* amostras não foram salinizadas ** sedimento referência

4.2 - Amônia

Os valores de CI50;24h obtidos nos testes com o cloreto de amônio, expressos em mg amônia/L foram convertidos para mg de amônia não ionizada/L, e estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 - Valores de CI50;24h obtidos nos testes de toxicidade com *L. variegatus* e amônia não ionizada.

DATA	AMÔNIA NÃO IONIZADA (em mg/L)	
	CI50;24hs	CI12; 24hs
21/01/99	0,08	0,09
27/01/99	0,14	0,04
24/02/99	0,12	0,07
03/03/99	0,15	0,11
07/10/99	0,14	0,09
MÉDIA	0,13	0,08
δ	0,029	0,026
C.V. (%)	23	33

As concentrações de inibição, CI50;24h, para a amônia não ionizada, variaram de 0,08 a 0,15mg/L, com média de 0,13mg/L (Tabela 11), ou seja, 50% dos organismos podem ser afetados nessa faixa de concentração de amônia não ionizada.

Com o objetivo de verificar a influência da amônia não ionizada sobre o desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*, nos testes de toxicidade com as amostras de sedimento, optou-se por efetuar o cálculo da CI12;24h, que corresponde à concentração a partir da qual ocorre um efeito biologicamente significativo. Para isso, considerou-se a DMS (diferença mínima significativa) crítica igual a 12%, detalhada no item 3.5.2. A partir dos

cálculos estatísticos obteve-se a CI12;24h variando de 0,04 a 0,11mg de amônia não ionizada/L (Tabela 11).

Posteriormente, considerando o coeficiente de variação (C.V.) de 33%, estabeleceu-se a concentração de 0,05 mg de amônia não ionizada/L (*média* – C.V.) a ser utilizada como ponto de corte na comparação com os resultados das amostras de água intersticial ou da interface sedimento/água. Isso significou que aquelas amostras que apresentaram teor de amônia não ionizada menor ou igual a 0,05mg/L não estariam sendo influenciadas por essa substância, ou seja, a toxicidade poderia ser atribuída a outros componentes presentes na amostra e não estar diretamente associada à amônia.

As determinações de amônia total e de amônia não ionizada, obtidas através da análise conjunta das variáveis pH, salinidade e temperatura, para os testes com amostras de água intersticial e interface sedimento/água, estão apresentadas nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

TABELA 12 - Concentrações de amônia total e não ionizada (mg/L), obtidas nas amostras de água intersticial durante os testes de toxicidade com *L. variegatus*.

AMOSTRA	INÍCIO DO TESTE		TÉRMINO DO TESTE	
	AMÔNIA TOTAL	AMÔNIA NÃO IONIZADA	AMÔNIA TOTAL	AMÔNIA NÃO IONIZADA
1	1,00	0,07	1,50	0,09
2a	7,20	0,40	7,40	0,45
2b	8,40	0,38	9,80	0,59
3a	6,10	0,36	3,30	0,19
3b	9,00	0,65	8,00	0,69
4a	3,80	0,27	2,00	0,09
5a	3,60	0,21	1,60	0,07
5b	3,60	0,17	2,00	0,07
6	75,00	8,24	65,00	4,53
7a	3,10	0,15	4,20	0,15
7b	5,20	0,20	5,90	0,21
8	7,00	0,49	8,00	0,60
9	3,50	0,20	3,10	0,22
10	4,50	0,40	4,40	0,31
11	9,70	1,07	9,60	0,83
12	4,50	0,49	4,20	0,29
13	1,30	0,06	2,10	0,10
14	0,77	0,04	1,00	0,06
15a	7,70	0,44	8,0	0,28
15b	29,00	2,09	30,5	1,71
16	2,40	0,09	3,0	0,04
17	1,80	0,08	2,6	0,05
18a	3,40	0,19	4,20	0,19
18b	3,00	0,17	3,00	0,13
4b*	2,70	0,13	1,20	0,04

* sedimento referência

TABELA 13 - Concentrações de amônia total e não ionizada (mg/L), obtidas nas amostras da interface sedimento/água, durante os testes de toxicidade com *L. variegatus*.

AMOSTRA	INÍCIO DO TESTE		TÉRMINO DO TESTE	
	AMÔNIA TOTAL	AMÔNIA NÃO IONIZADA	AMÔNIA TOTAL	AMÔNIA NÃO IONIZADA
1	0,38	0,02	0,55	0,01
2a	2,70	0,15	2,00	0,04
2b	2,80	0,13	3,70	0,06
3a	0,41	0,02	1,10	0,03
3b	1,40	0,06	2,30	0,09
4a	0,14	0,01	0,05	0,001
5a	0,14	0,01	0,22	0,01
5b	0,15	0,01	0,26	0,01
6	6,60	0,38	8,00	0,32
7a	0,39	0,02	0,58	0,03
7b	1,30	0,06	2,30	0,08
8	0,74	0,05	1,10	0,04
9	0,58	0,03	1,10	0,04
10	0,34	0,02	0,35	0,01
11	3,80	0,22	5,30	0,21
12	0,35	0,02	0,42	0,02
13	0,27	0,01	0,38	0,02
14	0,16	0,01	0,15	0,01
15a	0,34	0,02	1,90	0,07
15b	2,50	0,11	5,30	0,15
16	0,09	0,005	0,70	0,02
17	0,13	0,01	0,42	0,01
18a	0,49	0,03	1,20	0,05
18b	0,34	0,02	0,47	0,02
4b*	0,06	0,003	0,02	0,0005

* sedimento referência

Os resultados obtidos através da correlação canônica entre a amônia não ionizada inicial e final e os resultados dos testes de toxicidade, em

termos do número de indivíduos nos diferentes estágios de desenvolvimento embrio-larval atingidos, nos dois métodos, foi significativa para ambos, sendo maior na interface sedimento/água (Tabela 14).

TABELA 14 - Correlação canônica entre a concentração de amônia não ionizada e os efeitos tóxicos sobre os estágios embrio-larvais, nos testes de toxicidade com *L. variegatus*.

RELAÇÃO DE VARIÁVEIS NOS CONJUNTOS		MÉTODO	CORRELAÇÃO CANÔNICA
AMÔNIA INICIAL, AMÔNIA FINAL	PLUTEUS NORMAIS, PLUTEUS PEQUENOS, GÁSTRULA, BLÁSTULA, MÓRULA, OUTRAS DIVISÕES E DEFORMADOS	ÁGUA INTERSTICIAL	0,920 p=0,0002
		INTERFACE SEDIMENTO/ÁGUA	0,987 p<0,0001

Para uma avaliação localizada, em termos de qual estágio embrio-larval poderia ser mais afetado pelas concentrações de amônia não ionizada, aplicou-se a técnica de regressão linear simples, com estimadores de mínimos quadrados (Tabela 15). Verificou-se que a presença da amônia correlacionou-se significativamente na interface sedimento/água com o estágio de gástrula, enquanto que na água intersticial, a maior influência foi observada nos estágios de mórula e blástula. Na referida Tabela são apresentados somente os valores dos coeficientes de correlação que foram significativos, sendo que essa análise também indicou que a interpretação dos sinais dos coeficientes não pode ser conclusiva, devido às diferenças entre as respostas inicial e final.

Tabela 15 - Avaliação da influência da amônia não ionizada (inicial e final) sobre os efeitos tóxicos nos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de *L. variegatus*.

Tipo de Teste	Pluteus Normais		Pluteus Pequenos		Gástrula		Blástula		Mórula		Outras divisões		Deformados		
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
Interface sedimento/água	0,348	0,594	0,754	0,998	0,331	0,003	(51,8)	0,094	0,559	0,098	0,549	0,525	0,604	0,422	0,425
água Intersticial	0,080	0,056	0,128	0,083	0,590	0,523	(-61,3)	(104,7)	(-51,7)	(97,3)	0,096	0,329	0,845	0,869	

Valores dos coeficientes de correlação que foram significativos entre parênteses; p=0,05 (em itálico)

Com relação às análises no sedimento bruto, as determinações de amônia variaram de 0,79 a 11mg/kg (Tabela 16). Analisando as amostras que apresentaram os maiores valores de amônia total nas três matrizes, observou-se que o fato de uma amostra de sedimento apresentar a maior concentração de amônia total não significa que as amostras correspondentes da água intersticial ou da água da interface sedimento/água também irão apresentar os maiores valores dessa substância (Tabelas 12 e 13).

TABELA 16 - Concentrações de amônia total nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

AMOSTRA	AMÔNIA TOTAL (mg/kg)
1	4,2
2a	2,1
2b	6
3a	8,2
3b	11
4a	2,2
5a	**
5b	1,4
6	6,9
7a	1,6
7b	2,1
8	5,8
9	4,9
10	1,3
11	7,8
12	1,7
13	0,96
14	0,79
15a	3,6
15b	9,6
16	0,85
17	1,4
18a	7,2
18b	5,6
4b*	2,7

* sedimento referência

** não foi efetuada análise

Conforme apresentado no quadro abaixo, as amostras que apresentaram a maior e a menor concentração de amônia total no sedimento

bruto (Tabela 16) e as concentrações de amônia não ionizada na água intersticial e na interface (Tabelas 12 e 13), observou-se que somente na amostra 14 foi verificada a coincidência de ocorrer a menor concentração de amônia tanto na água intersticial quanto no sedimento bruto.

	sedimento bruto		água intersticial		Interface sedimento/água	
	a	b	a	b	a	b
Amostras	3b	14	6	14	6	4b

a = amostras que apresentam maiores concentrações de amônia
b = amostras que apresentam menores concentrações de amônia

4.3 - Efeito tóxico observado nas amostras de água intersticial e na interface sedimento/água

Os resultados dos testes de toxicidade com a água intersticial e interface sedimento/água estão apresentados na Tabela 17. Nos testes com água intersticial apenas as amostras 4a, 5a e 14 (12,5% do total) não acarretaram efeito tóxico sobre os embriões de *L. variegatus*. Com relação às amostras analisadas pelo método da interface sedimento/água, as amostras 1, 4a, 5a, 5b, 7a, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15a, 16 e 18a (58% do total) não apresentaram efeito tóxico sobre os organismos expostos.

TABELA 17 - Resultados dos testes de toxicidade com *L. variegatus* na interface sedimento/água e na água intersticial de sedimento da Baixada Santista.

AMOSTRA	ÁGUA INTERSTICIAL DE SEDIMENTO	INTERFACE SEDIMENTO/ÁGUA
1	T	NT
2a	T	T
2b	T	T
3a	T	T
3b	T	T
4a	NT	NT
5a	NT	NT
5b	T	NT
6	T	T
7a	T	NT
7b	T	T
8	T	NT
9	T	NT
10	T	NT
11	T	T
12	T	NT
13	T	NT
14	NT	NT
15a	T	NT
15b	T	T
16	T	NT
17	T	T
18a	T	NT
18b	T	T
4b*	NT	NT

* sedimento referência

NT = não apresentou efeito tóxico T = apresentou efeito tóxico

4.3.1 - Registro dos diferentes estágios embrio-larvais

A introdução do registro dos estágios anteriores a pluteus normais, conforme descrito no item 3.4.6.7, revelou-se bastante útil, pois além de oferecer informações a respeito da toxicidade, possibilitou a discriminação da intensidade dos efeitos tóxicos nas diversas amostras, a partir do número de organismos em cada estágio de desenvolvimento (Tabelas 18 e 19).

TABELA 18 - Intensidade dos efeitos tóxicos nos estágios de desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*, nas amostras de água intersticial provenientes de sedimentos coletados na Baixada Santista.

AMOSTRA	RÉPLICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL						
		PLUTEUS NORMAIS	PLUTEUS PEQUENOS	GÁSTRULA	BLÁSTULA	MÓRULA	DEFORMADOS	OUTRAS DIVISÕES **
1	1	43,0	54,0	0	0	0	3,0	0
	2	42,0	56,0	0	2,0	0	0,0	0
	3	43,0	52,0	0	1,0	0	4,0	0
	média	42,7	54,0	0	1,0	0	2,3	0
	dp	0,6	2,0	0	1,0	0	2,1	0
2a	1	0	0	0	74,0	17,0	6,0	3,0
	2	0	0	0	82,0	6,0	10,0	2,0
	3	0	0	0	75,0	15,0	7,0	3,0
	média	0	0	0	77,0	12,7	7,7	2,7
	dp	0	0	0	4,4	5,9	2,1	0,6
2b	1	0	0	0	96,0	2,0	2,0	0
	2	0	0	0	90,0	3,0	7,0	0
	3	0	0	0	91,0	4,0	5,0	0
	média	0	0	0	92,3	3,0	4,7	0
	dp	0	0	0	3,2	1,0	2,5	0
3a	1	0	77,0	18,0	1,0	0	4,0	0
	2	0	81,0	14,0	0,0	0	5,0	0
	3	0	69,0	29,0	1,0	0	1,0	0
	média	0	75,7	20,3	0,7	0	3,3	0
	dp	0	6,1	7,8	0,6	0	2,1	0
3b	1	0	0	0	100,0	0	0	0
	2	0	0	0	99,0	0	1,0	0
	3	0	0	0	100,0	0	0	0
	média	0	0	0	99,7	0	0,3	0
	dp	0	0	0	0,6	0	0,6	0
4a	1	84,0	15,0	0	0,0	0	0,0	1,0
	2	84,0	13,0	0	0,0	0	3,0	0
	3	78,0	18,0	0	2,0	0	2,0	0
	média	82,0	15,3	0	0,7	0	1,7	0,3
	dp	3,5	2,5	0	1,2	0	1,5	0,6
4b*	1	93,0	4,0	0	0	0	3,0	0
	2	97,0	1,0	0	0	0	2,0	0
	3	91,0	3,0	0	0	0	3,0	3,0
	média	93,7	2,7	0	0	0	2,7	1,0
	dp	3,1	1,5	0	0	0	0,6	1,7
5a	1	86,0	13,0	0	0,0	0	1,0	0
	2	92,0	7,0	0	1,0	0	0	0
	3	94,0	4,0	0	0,0	0	2,0	0
	média	90,7	8,0	0	0,3	0	1,0	0
	dp	4,2	4,6	0	0,6	0	1,0	0

* sedimento referência

** estágios anteriores à mórula, dp = desvio padrão.

TABELA 18 - (continuação).

AMOSTRA	RÉPLICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL						
		PLUTEUS NORMAIS	PLUTEUS PEQUENOS	GÁSTRULA	BLÁSTULA	MÓRULA	DEFORMADOS	OUTRAS DIVISÕES **
5b	1	0	12,0	3,0	79,0	0	6,0	0
	2	0	25,0	12,0	59,0	0	4,0	0
	3	0	48,0	5,0	39,0	0	8,0	0
	média	0	28,3	6,7	59,0	0	6,0	0
	dp	0	18,2	4,7	20,0	0	2,0	0
6	1	0	0	0	0	0	7,0	93,0
	2	0	0	0	0	0	4,0	96,0
	3	0	0	0	0	0	5,0	95,0
	média	0	0	0	0	0	5,3	94,7
	dp	0	0	0	0	0	1,5	1,5
7a	1	0	0	0	94,0	6,0	0	0
	2	0	0	0	93,0	7,0	0	0
	3	0	0	0	100,0	0	0	0
	média	0	0	0	95,7	6,5	0	0
	dp	0	0	0	3,8	0,7	0	0
7b	1	0	0	0	0	0	10,0	90,0
	2	0	0	0	0	0	0	100,0
	3	0	0	0	0	0	28,0	72,0
	média	0	0	0	0	0	12,7	87,3
	dp	0	0	0	0	0	14,2	14,2
8	1	0	0	0	91,0	3,0	6,0	0
	2	0	0	0	96,0	0	4,0	0
	3	0	0	0	93,0	1,0	6,0	0
	média	0	0	0	93,3	1,3	5,3	0
	dp	0	0	0	2,5	1,5	1,2	0
9	1	0	0	84,0	4,0	0	12,0	0
	2	0	2,0	92,0	2,0	0	4,0	0
	3	0	5,0	88,0	1,0	0	6,0	0
	média	0	3,5	88,0	2,3	0	7,3	0
	dp	0	2,1	4,0	1,5	0	4,2	0
10	1	0	0	42,0	53,0	0	5,0	0
	2	0	0	48,0	48,0	0	4,0	0
	3	0	0	58,0	40,0	0	2,0	0
	média	0	0	49,3	47,0	0	3,7	0
	dp	0	0	8,1	6,6	0	1,5	0
11	1	0	0	0,0	0	100,0	0	0
	2	0	0	0,0	0	100,0	0	0
	3	0	0	0,0	38,0	57,0	4,0	1,0
	média	0	0	0,0	12,7	85,7	1,3	0,3
	dp	0	0	0,0	21,9	24,8	2,3	0,6

** estágios anteriores à mórula, dp = desvio padrão.

TABELA 18 - (continuação).

AMOSTRA	RÉPLICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL						
		PLUTEUS NORMAIS	PLUTEUS PEQUENOS	GÁSTRULA	BLÁSTULA	MÓRULA	DEFORMADOS	OUTRAS DIVISÕES **
12	1	0	0	67,0	33,0	0	0,0	0
	2	0	0	70,0	28,0	0	2,0	0
	3	0	0	78,0	22,0	0	0,0	0
	média	0	0	71,7	27,7	0	0,7	0
	dp	0	0	5,7	5,5	0	1,2	0
13	1	15,0	81,0	0	0	0	4,0	0
	2	13,0	87,0	0	0	0	0	0
	3	13,0	84,0	0	2,0	1,0	0	0
	média	13,7	84,0	0	0,7	0,3	1,3	0
	dp	1,2	3,0	0	1,2	0,6	2,3	0
14	1	74,0	22,0	1,0	0,0	0	3,0	0
	2	81,0	17,0	0	2,0	0	0	0
	3	88,0	11,0	0	0	0	1,0	0
	média	81,0	16,7	0,3	0,7	0	1,3	0
	dp	7,0	5,5	0,6	1,2	0	1,5	0
15a	1	0	0	0	100,0	0	0	0
	2	0	0	0	94,0	3,0	3,0	0
	3	0	0	0	90,0	8,0	1,0	1,0
	média	0	0	0	94,7	3,7	1,3	0,3
	dp	0	0	0	5,0	4,0	1,5	0,6
15b	1	0	0	0	0	97,0	3,0	0
	2	0	0	0	0	99,0	1,0	0
	3	0	0	0	0	100,0	0	0
	média	0	0	0	0	98,7	1,3	0
	dp	0	0	0	0	1,5	1,5	0
16	1	0	48,0	24,0	4,0	16,0	8,0	0
	2	0	35,0	18,0	8,0	29,0	10,0	0
	3	0	62,0	20,0	2,0	8,0	6,0	2,0
	média	0	48,3	20,7	4,7	17,7	8,0	0,7
	dp	0	13,5	3,1	3,1	10,6	2,0	1,2
17	1	8,0	82,0	2,0	0	1,0	4,0	3,0
	2	2,0	90,0	4,0	1,0	0	3,0	0
	3	7,0	86,0	3,0	0	0	4,0	0
	média	5,7	86,0	3,0	0,3	0,3	3,7	1,0
	dp	3,2	4,0	1,0	0,6	0,6	0,6	1,7
18a	1	0	63,0	26,0	7,0	0	4,0	0
	2	0	69,0	23,0	2,0	0	6,0	0
	3	0	66,0	31,0	0	0	3,0	0
	média	0	66,0	26,7	4,5	0	4,3	0
	dp	0	3,0	4,0	3,5	0	1,5	0
18b	1	3,0	89,0	2,0	2,0	0	4,0	0
	2	1,0	90,0	3,0	2,0	0	4,0	0
	3	0	88,0	2,0	2,0	0	8,0	0
	média	1,3	89,0	2,3	2,0	0	5,3	0
	dp	1,5	1,0	0,6	0	0	2,3	0

** estágios anteriores à mórula, dp = desvio padrão.

TABELA 19 - Intensidade dos efeitos tóxicos nos estágios de desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*, na interface sedimento/água das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

AMOSTRA	RÉPLICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL						
		PLUTEUS NORMAIS	PLUTEUS PEQUENOS	GÁSTRULA	BLÁSTULA	MÓRULA	DEFORMADOS	OUTRAS DIVISÕES **
1	1	88	8	0	0	0	4	0
	2	90	4	0	0	0	6	0
	3	89	4	0	0	0	6	1
	média	89,0	5,3	0	0	0	5,3	0,3
	dp	1,0	2,3	0	0	0	1,2	0,6
2a	1	4	86	0	1	0	9	0
	2	12	83	0	0	0	5	0
	3	10	80	0	1	0	9	0
	média	8,7	83,0	0	0,7	0	7,7	0
	dp	4,2	3,0	0	0,6	0	2,3	0
2b	1	10	79	1	0	0	10	0
	2	11	78	1	0	0	9	1
	3	14	83	1	0	0	2	0
	média	11,7	80,0	1,0	0	0	7,0	0,3
	dp	2,1	2,6	0	0	0	4,4	0,6
3a	1	9	82	0	0	0	9	0
	2	6	89	0	0	0	5	0
	3	45	48	0	0	0	7	0
	média	20,0	73,0	0	0	0	7,0	0
	dp	21,7	21,9	0	0	0	2,0	0
3b	1	0	88	2	0	0	10	0
	2	3	86	2	0	0	9	0
	3	0	90	2	0	0	8	0
	média	1,0	88,0	2,0	0	0	9,0	0
	dp	1,7	2,0	0	0	0	1,0	0
4a	1	92	7	0	0	0	1	0
	2	84	12	0	0	0	4	0
	3	56	39	0	1	0	4	0
	média	77,3	19,3	0	0,3	0	3,0	0
	dp	18,9	17,2	0	0,6	0	1,7	0
4b*	1	86	6	0	0	0	5	3
	2	87	6	0	0	0	7	0
	3	76	18	0	0	0	6	0
	média	83,0	10,0	0	0	0	6,0	1,0
	dp	6,1	6,9	0	0	0	1,0	1,7
5a	1	62	10	0	0	0	28	0
	2	76	20	1	0	0	3	0
	3	69	21	0	0	0	10	0
	média	69,0	17,0	0,3	0	0	13,7	0
	dp	7,0	6,1	0,6	0	0	12,9	0

* sedimento referência

** estágios anteriores à mórula, dp = desvio padrão.

TABELA 19 - (continuação).

AMOSTRA	RÉPLICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL						
		PLUTEUS NORMAIS	PLUTEUS PEQUENOS	GÁSTRULA	BLÁSTULA	MÓRULA	DEFORMADOS	OUTRAS DIVISÕES **
5b	1	88	9	0	0	0	3	0
	2	87	4	0	0	0	9	0
	3	86	10	0	0	0	4	0
	média	87,0	7,7	0	0	0	5,3	0
	dp	1,0	3,2	0	0	0	3,2	0
6	1	0	0	3	70	2	24	1
	2	0	0	6	76	1	17	0
	3	0	0	10	72	0	18	0
	média	0,0	0,0	6,3	72,7	1,0	19,7	0,3
	dp	0,0	0,0	3,5	3,1	1,0	3,8	0,6
7a	1	79	19	0	0	0	1	1
	2	48	43	0	0	0	8	1
	3	69	28	0	0	0	3	0
	média	65,3	30,0	0	0	0	4,0	0,7
	dp	15,8	12,1	0	0	0	3,6	0,6
7b	1	6	88	0	0	0	6	0
	2	3	90	0	0	0	7	0
	3	5	87	2	0	0	6	0
	média	4,7	88,3	0,7	0	0	6,3	0
	dp	1,5	1,5	1,2	0	0	0,6	0
8	1	82	13	0	0	0	5	0
	2	84	10	0	0	0	6	0
	3	85	7	0	0	0	8	0
	média	83,7	10,0	0	0	0	6,3	0
	dp	1,5	3,0	0	0	0	1,5	0
9	1	90	5	0	0	0	4	1
	2	82	14	0	0	0	4	0
	3	84	9	0	0	0	7	0
	média	85,3	9,3	0	0	0	5,0	0,3
	dp	4,2	4,5	0	0	0	1,7	0,6
10	1	77	9	0	0	0	14	0
	2	90	5	0	0	0	5	0
	3	84	6	0	0	0	9	1
	média	83,7	6,7	0	0	0	9,3	0,3
	dp	6,5	2,1	0	0	0	4,5	0,6
11	1	30	57	4	1	0	8	0
	2	0	50	33	0	0	16	1
	3	14	69	7	0	0	10	0
	média	14,7	58,7	14,7	0,3	0,0	11,3	0,3
	dp	15,0	9,6	15,9	0,6	0,0	4,2	0,6

** estágios anteriores à mórula, dp = desvio padrão.

TABELA 19 - (continuação).

AMOSTRA	RÉPLICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL						
		PLUTEUS NORMAIS	PLUTEUS PEQUENOS	GÁSTRULA	BLÁSTULA	MÓRULA	DEFORMADOS	OUTRAS DIVISÕES **
12	1	86	5	0	0	0	9	0
	2	88	4	0	0	0	7	1
	3	86	7	0	0	0	7	0
	média	86,7	5,3	0	0	0	7,7	0,3
	dp	1,2	1,5	0	0	0	1,2	0,6
13	1	85	10	0	0	0	5	0
	2	89	10	0	0	0	1	0
	3	86	6	0	3	0	5	0
	média	86,7	8,7	0	1,0	0	3,7	0
	dp	2,1	2,3	0	1,7	0	2,3	0
14	1	87	2	0	0	0	11	0
	2	88	11	0	1	0	0	0
	3	92	8	0	0	0	0	0
	média	89,0	7,0	0	0,3	0	3,7	0
	dp	2,6	4,6	0	0,6	0	6,4	0
15a	1	83	15	0	0	0	2	0
	2	72	27	0	0	0	1	0
	3	77	22	0	0	0	1	0
	média	77,3	21,3	0	0	0	1,3	0
	dp	5,5	6,0	0	0	0	0,6	0
15b	1	0	75	12	1	0	12	0
	2	0	75	4	1	0	20	0
	3	0	74	11	0	0	15	0
	média	0,0	74,7	9,0	0,7	0	15,7	0
	dp	0,0	0,6	4,4	0,6	0	4,0	0
16	1	68	23	0	1	0	8	0
	2	75	14	0	0	0	11	0
	3	85	11	0	0	0	4	0
	média	76,0	16,0	0	0,3	0,0	7,7	0
	dp	8,5	6,2	0	0,6	0,0	3,5	0
17	1	52	39	0	0	0	9	0
	2	20	65	0	1	0	14	0
	3	53	38	0	1	0	8	0
	média	41,7	47,3	0	0,7	0	10,3	0
	dp	18,8	15,3	0	1	0	3,2	0
18a	1	67	28	2	1	0	2	0
	2	79	14	0	0	0	7	0
	3	68	28	2	0	0	2	0
	média	71,3	23,3	1,3	0,3	0	3,7	0
	dp	6,7	8,1	1,2	0,6	0	2,9	0
18b	1	0	77	0	0	0	23	0
	2	48	43	0	5	0	4	0
	3	0	90	2	0	0	8	0
	média	16,0	70,0	0,7	1,7	0	11,7	0
	dp	27,7	24,3	1,2	2,9	0	10,0	0

** estágios anteriores à mórula, dp = desvio padrão.

4.4 - Análises químicas

Os resultados das análises de metais na água intersticial (Tabela 20) apresentaram concentrações de cádmio e mercúrio inferiores ao limite de detecção (0,005mg/L e 0,01mg/L, respectivamente). Já as concentrações dos demais metais apresentaram variação conforme segue: cobre (0,0026 a 0,17mg/L); cromo (<0,01 a 0,079mg/L); chumbo (<0,01 a 0,30mg/L); níquel (0,0035 a 0,33mg/L) e zinco (<0,001 a 56mg/L).

TABELA 20 - Concentrações de metais, expressas em mg/L, na água intersticial das amostras de sedimento coletados na Baixada Santista.

AMOSTRA	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
1	< 0,005	0,013	0,0026	<0,01	0,0046	0,0022	0,33
2a	< 0,005	< 0,01	0,17	<0,01	0,016	0,22	0,16
3a	< 0,005	0,068	0,084	<0,01	0,33	0,3	1,7
3b	< 0,005	0,055	0,12	<0,01	0,29	0,04	1,1
4a	< 0,005	0,029	0,078	<0,01	0,29	0,055	1,8
5a	< 0,005	0,027	0,022	<0,01	0,24	0,028	1,5
5b	< 0,005	0,027	0,024	<0,01	0,24	0,022	1
6	< 0,005	0,03	0,017	<0,01	0,012	0,025	< 0,001
7a	< 0,005	0,023	0,014	<0,01	0,011	0,0014	0
8	< 0,005	< 0,01	0,14	<0,01	0,013	0,15	1,7
9	< 0,005	0,027	0,0062	<0,01	0,0099	0,016	0,022
10	< 0,005	0,023	0,0094	<0,01	0,0035	0,011	0,047
11	< 0,005	0,039	0,0049	<0,01	0,0073	0,027	< 0,001
12	< 0,005	0,03	0,0058	<0,01	0,0061	0,018	0,031
13	< 0,005	< 0,01	0,15	<0,01	0,02	0,16	56
14	< 0,005	0,011	0,16	<0,01	0,041	0,27	0,27
15a	< 0,005	0,02	0,07	<0,01	0,01	0,01	0,02
15b	< 0,005	0,05	0,07	<0,01	0,01	< 0,01	< 0,01
16	< 0,005	0,079	0,026	<0,01	0,026	0,087	0,093
17	< 0,005	0,03	0,09	<0,01	0,03	0,08	0,08
18a	< 0,005	0,029	0,0075	<0,01	0,0088	0,0073	0,36
4b*	< 0,005	0,022	0,023	<0,01	0,24	0,028	1,8

* sedimento referência

As determinações de metais medidas nas amostras da interface sedimento/água estão apresentadas na Tabela 21. Observou-se que as concentrações de cromo e mercúrio estiveram abaixo do limite de detecção do método (0,05mg/L - cromo; 0,0001, 0,0003 ou 0,0004mg/L - mercúrio) Também observou-se variações nas concentrações de cádmio (0,01 a 0,1mg/L), chumbo (0,06 a 1,40 mg/L), cobre (<0,004 a 0,11 mg/L), níquel (0,07 a 0,5 mg/L) e zinco (<0,01 a 0,05 mg/L).

TABELA 21 - Concentrações de metais, expressas em mg/L, na interface sedimento/água, das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

AMOSTRA	Cd	Pb	Cu	Cr	Hg	Ni	Zn
1	0,080	0,57	0,04	<0,05	<0,0003	0,410	0,02
2a	0,100	0,61	0,05	<0,05	<0,0003	0,500	0,02
3a	0,020	1,29	0,10	<0,05	<0,0001	0,150	0,02
4a	0,020	1,31	0,10	<0,05	<0,0001	0,150	0,02
5a	0,020	1,40	0,11	<0,05	<0,0001	0,170	0,05
7a	0,010	0,07	<0,004	<0,05	<0,0003	0,070	<0,01
14	0,100	0,68	0,04	<0,05	<0,0003	0,460	0,02
15a	0,020	1,34	0,11	<0,05	<0,0001	0,170	0,02
18a	0,010	0,06	<0,004	<0,05	<0,0003	0,070	<0,01
água de diluição marinha adicionada sobre o sedimento	0,100	0,63	0,05	<0,05	<0,0004	0,430	0,02

Os resultados das determinações dos metais no sedimento bruto estão apresentados na Tabela 22. Observaram-se concentrações de cobre (0,41 a 90µg/g), cádmio (<0,05 a 1,7µg/g), chumbo (1,8 a 232µg/g), níquel (0,97 a 33µg/g), zinco (5,2 a 878µg/g), cromo (1,5 a 70µg/g) e mercúrio (<0,005 a 0,97µg/g).

TABELA 22 - Concentrações de metais pesados, expressas em µg/g, nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

AMOSTRA	Cr	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Hg
1	23	13	9,9	36	0,52	9,4	0,005
2a	47	27	33	102	0,90	21	0,051
2b	46	32	36	110	0,92	25	0,082
3a	70	33	53	878	1,7	232	0,67
3b	52	19	32	260	0,84	132	0,48
4a	30	11	10	51	< 0,05	13	0,75
5a	11	4,1	6,7	24	< 0,05	10	0,34
5b	6,2	3,0	7,2	15,5	< 0,05	6,7	0,24
6	29	15	90	183	1,3	47	0,20
7a	9,8	4,8	4,4	20	0,74	7,8	0,027
7b	12	7,8	6,1	25	0,65	11	0,37
8	24	13	16	67	0,72	22	0,071
9	33	21	20	59	0,95	26	0,15
10	1,7	1,7	2,4	7,4	0,75	1,8	0,021
11	20	10	13	41	0,85	19	0,97
12	8,1	4,2	4,0	12	0,75	6,4	0,22
13	5,8	2,7	2,2	12	0,58	4,4	0,024
14	1,5	0,97	0,41	5,2	0,41	1,9	<0,005
15a	22	9,0	5,3	27	< 0,05	12	0,065
15b	26	13	11	42	< 0,05	18	0,11
16	9,9	2,9	0,95	11	< 0,05	4,5	0,14
17	9,9	4,3	1,7	14	< 0,05	7,8	0,021
18a	33	17	14	45	0,80	30	0,10
18b	42	21	16	54	0,80	35	0,13
4b*	41	13	14	62	< 0,05	17	0,76

* sedimento referência

Foi efetuada uma avaliação estatística a respeito de qual método apresentaria maior correlação entre os metais presentes na água intersticial

ou interface sedimento/água e aqueles determinados no sedimento. Salienda-se que, após o tratamento estatístico inicial, a base de metais utilizada na correlação canônica não foi a mesma para os dois métodos, e que o número de amostras analisadas para essa classe de contaminantes também foi diferente entre as matrizes, conforme pode ser observado nas Tabelas 22 e 23.

Essas considerações indicam que o resultado dessa análise canônica não pode ser conclusivo. Entretanto, uma avaliação preliminar com base nos dados obtidos indicou maior correlação com a interface sedimento/água (Tabela 23a). Considerou-se, neste caso, que o número de metais e de amostras avaliados foi inferior ao da água intersticial e mesmo assim a correlação foi mais elevada (0,986), embora a significância tenha sido um pouco inferior ao nível estabelecido ($p=0,07$).

TABELA 23 - Correlação canônica entre as concentrações de metais no sedimento bruto e aquelas presentes tanto na interface sedimento/água (a) quanto na água intersticial (b).

Sedimento bruto	Interface Sedimento/água	Correlação Canônica (a)
Ni, Zn, Cd e Pb	Cd, Pb e Ni	0,986 ($p= 0,066$)

Sedimento bruto	Água Intersticial	Correlação Canônica (b)
Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb e Hg	Cr, Cu, Ni, Pb e Zn	0,925 ($p= 0,009$)

Examinando a correlação canônica entre as concentrações de metais na matriz de sedimento bruto e os resultados dos testes de toxicidade,

através dos efeitos nos diferentes estágios embrio-larvais, observou-se que para a água intersticial a correlação não foi significativa (Tabela 24a), diferentemente da interface sedimento/água onde foi evidenciada correlação elevada e significativa (Tabela 24b). Isso foi interessante, pois indicou que a avaliação final da correlação canônica apresentada na Tabela 22 foi coerente, apesar dos problemas levantados.

TABELA 24 - Correlação canônica entre as concentrações de metais no sedimento bruto e os efeitos tóxicos nos diferentes estágios embrio-larvais tanto na água intersticial (a) quanto na interface sedimento/água (b).

Sedimento bruto	Água Intersticial	Correlação Canônica (a)
Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb e Hg	PLUTEUS NORMAIS, PLUTEUS PEQUENOS, GÁSTRULA, BLÁSTULA, MÓRULA, OUTRAS DIVISÕES E DEFORMADOS	0,839 p= 0,4706

Sedimento bruto	Interface Sedimento/água	Correlação Canônica (b)
Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb e Hg	PLUTEUS NORMAIS, PLUTEUS PEQUENOS, GÁSTRULA, BLÁSTULA, MÓRULA, OUTRAS DIVISÕES E DEFORMADOS	0,995 P<0,0001

Com relação aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), verificou-se que das 25 amostras analisadas no sedimento bruto, a maioria apresentou concentrações totais variando de 17,2 a 366,2 µg/. Observou-se, também, que seis amostras estão na faixa variando de 1047,0 a 9625,0µg/kg (2a, 2b, 4a, 5a, 5b e 8), uma amostra com 14.406,0µg/kg (18a) e duas sobressaindo-se fortemente das demais, apresentando 114.600,0 e 126.710,0µg/kg (3a e 3b, respectivamente) (Tabela 25).

TABELA 25 - Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos(HPAs), expressos em µg/kg, determinados nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

Ponto	Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Fluranteno	Pireno	Benzo-Antraceno	Criseno	Benzo-b-fluoranteno	Benzo-k-fluoranteno	Benzo-a-pireno	Benzo-ghi-pirileno	Benzeno 1.2.3.cd-pireno	Dibenzeno-an-traceno	Total de HPAs
1	1,1	0,4	1,3	0,5	5,6	2,2	1,3	1,8	1,5	2,9	1,0	1,0	3,8	4,1	4,6	3,3	36,3
2a	55,0	120,0	100,0	140,0	460,0	270,0	560,0	570,0	620,0	530,0	300,0	300,0	510,0	350,0	310,0	170,0	5.365,0
2b	24,0	28,0	10,0	13,0	75,0	30,0	110,0	110,0	110,0	98,0	64,0	64,0	110,0	84,0	75,0	42,0	1.047,0
3a	2.100,0	3.600,0	950,0	1.500,0	8.900,0	5.400,0	26.000,0	22.000,0	18.000,0	18.000,0	2.100,0	1.400,0	1.800,0	500,0	1.400,0	950,0	114.600,0
3b	860,0	3.400,0	1.000,0	4.500,0	21.000,0	11.000,0	27.000,0	20.000,0	13.000,0	13.000,0	3.100,0	2.100,0	2.700,0	750,0	2.000,0	1.300,0	126.710,0
4a	28,0	26,0	11,0	34,0	190,0	78,0	300,0	230,0	130,0	140,0	310,0	260,0	180,0	150,0	130,0	48,0	2.245,0
5a	140,0	140,0	34,0	120,0	250,0	160,0	340,0	450,0	220,0	240,0	1.300,0	870,0	700,0	660,0	440,0	110,0	6.174,0
5b	54,0	180,0	18,0	53,0	380,0	170,0	1.200,0	1.000,0	900,0	860,0	1.600,0	1.000,0	860,0	720,0	450,0	180,0	9.625,0
6	7,2	4,6	9,8	21,0	42,0	9,0	41,0	35,0	43,0	30,0	21,0	21,0	36,0	12,0	17,0	11,0	360,6
7a	2,1	1,1	< 1,0	0,5	5,8	1,6	5,2	6,4	5,6	4,0	7,7	7,7	13,0	10,0	8,7	3,7	83,1
7b	< 1,0	5,3	1,4	2,0	27,0	11,0	68,0	57,0	34,0	33,0	23,0	23,0	38,0	20,0	16,0	7,5	366,2
8	18,0	25,0	8,2	15,0	95,0	38,0	110,0	150,0	140,0	110,0	100,0	100,0	210,0	140,0	130,0	90,0	1.479,2
9	2,7	< 1,0	< 1,0	1,4	10,0	< 1,0	5,8	6,1	10,0	7,3	2,5	2,5	3,3	2,8	1,2	< 1,0	55,6
10	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1,9	< 1,0	6,2	1,6	7,6	5,4	0,6	0,6	0,7	< 1,0	< 1,0	< 1,0	24,5
11	2,9	0,8	0,9	1,1	7,5	1,7	7,7	7,1	3,4	4,1	4,4	4,4	7,3	5,4	5,0	2,0	65,7
12	1,6	0,3	0,3	0,7	3,2	0,9	3,4	2,4	< 1,0	< 1,0	0,8	0,8	1,1	0,8	0,7	0,3	17,2
13	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	4,5	< 1,0	2,4	2,1	1,3	1,3	1,8	1,8	3,0	3,0	4,0	2,3	27,5
14	1,0	1,2	< 1,0	< 1,0	4,2	< 1,0	3,7	4,4	4,1	3,7	5,1	5,1	9,0	8,4	6,6	3,6	60,1
15a	< 1,0	7,4	3,1	6,0	11,0	2,5	6,6	5,0	3,3	3,8	8,9	5,9	4,6	7,6	4,7	2,2	82,6
15b	< 1,0	1,4	0,4	0,9	8,5	2,2	17,0	13,0	6,2	7,6	15,0	9,6	7,5	8,6	6,2	2,8	106,9
16	< 1,0	< 1,0	1,3	< 1,0	6,2	6,2	47,0	27,0	< 1,0	1,9	20,0	13,0	10,0	10,0	5,3	3,1	151,0
17	< 1,0	3,1	0,8	2,4	13,0	3,2	15,0	12,0	5,2	5,3	22,0	14,0	13,0	19,0	13,0	6,6	147,6
18a	440,0	140,0	< 1,0	26,0	2.000,0	550,0	190,0	230,0	2.300,0	1.600,0	1.000,0	1.000,0	1.700,0	1.800,0	1.100,0	330,0	14.406,0
18b	< 1,0	1,4	0,3	0,7	5,9	2,5	4,8	6,4	8,3	5,9	4,7	4,7	8,9	5,6	6,2	3,0	69,3
4b*	11,0	13,0	2,2	5,1	23,0	7,9	31,0	24,0	13,0	15,0	100,0	66,0	60,0	68,0	50,0	16,0	505,2

*sedimento referência

Foi efetuada uma sondagem, baseada nos efeitos tóxicos sobre os diferentes estágios embrio-larvais, para identificar o método que apresentaria maior correlação com os dados de HPAs, determinados nas amostras de sedimento bruto. A correlação canônica foi elevada e significativamente correlacionada com o método da água intersticial (Tabela 26).

TABELA 26 - Correlação canônica entre os efeitos tóxicos observados nos diferentes estágios embrio-larvais, e as concentrações de HPAs determinadas nas amostras de sedimento, coletadas na Baixada Santista

RELAÇÃO DE VARIÁVEIS NOS CONJUNTOS		MÉTODO	CORRELAÇÃO CANÔNICA
PLUTEUS NORMAIS, PLUTEUS PEQUENOS, GÁSTRULA, MÓRULA, BLÁSTULA, OUTRAS DIVISÕES E DEFORMADOS	NAFTALENO, CRISENO FLUORENO, ANTRACENO ACENAFITILENO, FLUORANTENO, BENZO-B-FLUORANTENO, BENZO-A-FLUORANTENO, BENZO-GHI-PIRILENO, DIBENZENO-AN-ANTRACENO	ÁGUA INTERSTICIAL	0,970 (p=0,030)
		INTERFACE SEDIMENTO/ÁGUA	0,956 (p=0,223)

O sulfeto também é considerado um possível interferente nos testes de toxicidade com sedimentos (CARR *et al.*, 2001). A determinação deste parâmetro foi realizada somente na água intersticial e todas as concentrações estiveram abaixo do limite de detecção do método (0,05mg/L). Segundo KNEZOVICH *et al.* (1996), concentrações de 0,09 a 0,13 podem ser tóxicas para embriões do ouriço *Stroglyocentrotus purpuratus*, sendo provável, portanto, que essa substância não tenha exercido influência sobre os efeitos tóxicos observados nos testes de toxicidade na água intersticial, no presente estudo.

4.5 - Granulometria

Com relação à análise granulométrica do sedimento bruto, do total de 25 amostras, onze foram classificadas como areia (44% do total). As demais

receberam classificação de areia siltica (amostras 3a, 8 e 15b), silte arenoso (amostras 2a, 4a e 4b), argila siltica (amostras 9 e 18b), silte argiloso (amostras 2b e 18a), areia siltico argilosa (amostras 1 e 6), areia argilosa (amostras 7b e 11) (Tabela 27 e Figura 9).

TABELA 27 - Resultados das análises granulométricas, expressos em %, das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

AMOSTRA	AREIA	SILTE	ARGILA	CLASSIFICAÇÃO
1	38,15	29,86	31,98	areia siltico argilosa
2a	14,79	70,80	14,41	silte arenoso
2b	2,97	71,51	25,52	silte argiloso
3a	48,48	40,94	10,58	areia siltica
3b	78,05	18,06	3,89	areia
4a	41,08	43,50	15,42	silte arenoso
5a	93,49	4,03	2,49	areia
5b	79,95	14,23	5,81	areia
6	35,28	32,42	32,31	areia siltico argilosa
7a	90,71	4,90	4,40	areia
7b	71,15	13,90	14,94	areia argilosa
8	45,23	32,23	22,54	areia siltica
9	14,03	40,93	45,03	argila siltica
10	97,58	1,29	1,14	areia
11	64,15	12,51	23,35	areia argilosa
12	83,02	15,76	1,23	areia
13	95,15	1,70	3,16	areia
14	99,36	0,54	0,11	areia
15a	81,48	16,92	1,60	areia
15b	73,49	23,11	3,39	areia siltica
16	98,74	0,82	0,44	areia
17	94,01	2,88	3,12	areia
18a	9,88	61,62	28,48	silte argiloso
18b	4,01	43,83	52,15	argila siltica
4b*	37,82	38,64	23,53	silte arenoso

* sedimento referência

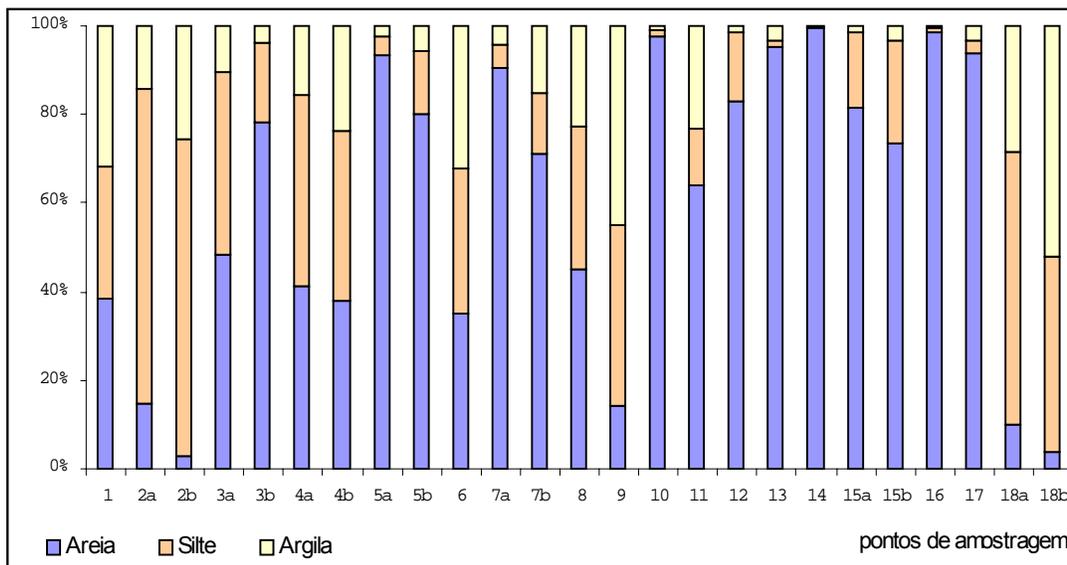


FIGURA 9 - Distribuição das frações granulométricas (%) nas amostras de sedimento da Baixada Santista.

O resultado da correlação canônica entre os parâmetros da análise granulométrica e os testes de toxicidade, através dos diferentes estágios embrio-larvais, está apresentado na Tabela 28. Foi excluída a porcentagem de argila, para evitar problemas de multicolinearidade na aplicação desta técnica estatística e, conforme observado, não foi evidenciada a influência direta da granulometria nos resultados dos testes de toxicidade.

TABELA 28 - Resultado da análise canônica entre as frações granulométricas das amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista e os testes de toxicidade com *L. variegatus*.

RELAÇÃO DE VARIÁVEIS NOS CONJUNTOS		MÉTODO	CORRELAÇÃO CANÔNICA
PLUTEUS NORMAIS, PLUTEUS PEQUENOS, GÁSTRULA, BLÁSTULA, MÓRULA, OUTRAS DIVISÕES E DEFORMADOS	% DE SILTE % DE AREIA	ÁGUA INTERSTICIAL	0,738 (p=0,227)
		INTERFACE SEDIMENTO/ÁGUA	0,691 (p=0,189)

5. DISCUSSÃO

5.1 - Variáveis físicas e químicas controladas durante os testes de toxicidade

A norma CETESB (1999) recomenda que no final dos testes de toxicidade o teor final de oxigênio dissolvido (OD), deve ser maior ou igual a 3,9mg/L. As amostras de água intersticial dos pontos 6, 7b, 11, 15b, 16 e 17 apresentaram valores inferiores a este para esta variável. Entretanto, amostras ambientais podem conter substâncias diversas que promovam o consumo de oxigênio. Isto pode ser observado através da comparação entre o OD inicial, que sempre se apresentou acima de 3,9mg/L e OD final (Tabela 7). De qualquer maneira, não foi possível atribuir o efeito tóxico observado nessas amostras de água intersticial (6, 7b, 11, 15b, 16 e 17) exclusivamente às baixas concentrações de oxigênio dissolvido, pois a presença de alto teor de amônia não ionizada também foi detectada nas mesmas, conforme apresentado no item 5.2.

Por outro lado, as amostras dos testes da interface sedimento/água apresentaram concentrações de oxigênio dissolvido sempre acima da faixa recomendada durante todo o período experimental (Tabela 8). Os efeitos tóxicos observados nas amostras 6, 7b, 11, 15b e 17 nos testes da interface sedimento/água, confirmam que a toxicidade dessas mesmas amostras não foi causada pelos baixos teores de OD nos testes com água intersticial.

Com relação à salinidade, algumas amostras de água intersticial que sofreram salinização (Tabela 9) foram analisadas abaixo da faixa recomendada pela norma CETESB (1999), que é de $34 \pm 2\%$. Apesar disso, a menor salinidade ajustada foi de 30% e, portanto, dentro da faixa de tolerância indicada por NIPPER *et al.* (1991) para *L. variegatus*. Deve ser ressaltado que a referida norma está em processo de revisão e a faixa será expandida para $33 \pm 3\%$ (BERTOLETTI, comunicação pessoal).

Ponderando sobre a questão do ajuste da salinidade, verifica-se que esse procedimento causa uma diluição variável dos constituintes da amostra, sendo que o total da diluição é dependente da salinidade original. Devido a isso, amostras de uma mesma região podem ser testadas em níveis variáveis de diluição, complicando a comparação de resultados de testes de toxicidade entre pontos amostrados (MOORE *et al.*, 1997; CARR *et al.*, 2001), particularmente no caso de amostras de água intersticial, uma vez que nos testes com a interface sedimento/água não são observados esses problemas.

Portanto, outro fator a ser considerado na avaliação dos métodos referiu-se à porcentagem de de água intersticial efetivamente analisada nas amostras, naquelas situações onde foi necessário efetuar a salinização das mesmas e, conforme apresentado na Tabela 9, verificou-se que houve uma variação de 60 a 93% na concentração final analisada.

Se observarmos a amostra 3a, onde ocorreu a maior adição de salmoura para promover a elevação da salinidade para 30‰ e, conseqüentemente menor volume de amostra final (60%), verifica-se que mesmo com essa diluição observou-se efeito tóxico na referida amostra. Fato semelhante não ocorreu com a amostra 4a, que apresentou a mesma faixa de diluição e, entretanto, não foi detectada toxicidade. Salienta-se que em ambos os casos obteve-se efeito semelhante sobre os embriões de *L. variegatus* na interface sedimento/água, indicando que, nesses casos, a diluição parece não ter influenciado a ação tóxica dos eventuais contituíntes presentes nas amostras.

Nos controles preparados para avaliação da qualidade da salmoura (água desionizada e salmoura), adicionada às amostras 3a, 3b; 4a, 4b, 5a e 5b, foi observado efeito tóxico (56% de pluteus normais). Após o início do experimento, foi constatado que o sistema de produção de água desionizada

do laboratório estava com problemas e, conseqüentemente, produzindo água de baixa qualidade. Dessa forma, uma vez que as amostras 4a, 4b e 5a não apresentaram efeito tóxico, possivelmente a toxicidade observada nas amostras 3a e 3b não tenha sido provocada pela salmoura e sim pela presença de outros contaminantes (Tabela 16). Além disso, no teste com a interface sedimento/água onde o processo de salinização não ocorreu, foram observados os mesmos resultados, exceto para o ponto 5b, que também não apresentou efeito adverso sobre os organismos. Com relação aos demais controles de salmoura, paralelos às outras amostras de água intersticial, não se observou toxicidade.

5.2 - Influência da amônia não ionizada sobre o efeito tóxico observado nas amostras de água intersticial e na interface sedimento/água

O conhecimento da concentração de amônia não ionizada nas amostras e a sensibilidade do organismo-teste a essa substância são essenciais para a avaliação dos resultados dos testes de toxicidade com sedimento, uma vez que o efeito tóxico observado pode ser devido à presença de concentrações que são diretamente tóxicas para o organismo-teste (GREENSTEIN *et al.*, 1994; CARR *et al.*, 2001),

No presente estudo, conforme mencionado no item 4.2, optou-se por efetuar o cálculo da CI_{12;24h}, para verificar a influência da amônia não ionizada sobre o desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*, nos testes de toxicidade com as amostras de sedimento. Assim, estabeleceu-se a concentração de 0,05 mg de amônia não ionizada/L a ser utilizada como ponto de corte na caracterização dos efeitos tóxicos das amostras de água intersticial ou da interface sedimento/água. Concentração similar de efeito desta substância (NOEC = 0,05mg/L) foi obtida para o ouriço *Stroglyocentrotus purpuratus* (BAY *et al.* 1993 apud HUNT *et al.*, 1998).

A toxicidade da amônia para outras espécies marinhas pode ser encontrada em USEPA (1989). Os primeiros trabalhos sobre a toxicidade da

amônia indicaram que a forma não ionizada foi responsável pelo efeito tóxico observado na maioria dos testes realizados (WILLINGHAM, 1976 apud GREENSTEIN *et al.*, 1994). Estudos mais recentes têm demonstrado que ou a toxicidade da forma ionizada é maior que a esperada ou a toxicidade resulta da interação entre outros parâmetros (em geral, pH) e a forma não ionizada (THURSTON & RUSSO, 1981; MILLER *et al.*, 1990; BORGMANN, 1994).

GREENSTEIN *et al.* (1994) conduziram um estudo para verificar a toxicidade da amônia sobre embriões de *S. purpuratus*, com o objetivo de subsidiar os resultados obtidos durante a avaliação de sedimentos na Califórnia. Para tanto, investigaram a influência da amônia sobre o tempo de armazenamento das amostras de sedimento, homogeneizadas ou não, e realizaram testes de toxicidade com amônia em diferentes níveis de pH, uma vez que as amostras de sedimento tiveram pH ajustado. Como resultado, observaram que a concentração de amônia na água intersticial pode aumentar com o tempo de armazenamento da amostra de sedimento. Além disso, o aumento da toxicidade associado com elevados níveis de pH indicou que o efeito tóxico sobre os embriões de *S. purpuratus* estava relacionado com a forma não ionizada.

Deve ser salientado que no presente estudo, o pH foi similar nas leituras realizadas no início dos experimentos tanto da água intersticial como na interface sedimento/água (Tabelas 7 e 8). Entretanto, nas leituras finais observou-se que, de maneira geral, ocorreu a diminuição do pH nas amostras da interface. Embora a diminuição tenha ocorrido na faixa de 0,2 a 0,3 unidades, essa queda do pH também contribuiu para a diminuição do teor de amônia não ionizada e, conseqüentemente, para o seu efeito tóxico sobre os embriões. Tomando como exemplo a amostra 2a, cujo pH final foi de 7,8 observou-se que a amônia não ionizada calculada foi de 0,04mg/L (Tabelas 8 e 12). Porém, se o pH tivesse se mantido em 8,1 (conforme determinado no início do experimento - Tabela 8) essa concentração seria de 0,08mg/L, ou seja, pequenas variações no pH podem ser significativas para a determinação da amônia não ionizada.

Comparando os dois métodos, 13 das 24 amostras analisadas (54% do total, sendo 42% tóxicas) apresentaram resultados coincidentes em termos de efeito tóxico sobre as amostras, tanto na água intersticial quanto na interface sedimento/água (2a, 2b; 3a, 3b, 4a, 5a, 6, 7b, 11, 14, 15b, 17 e 18b). Da mesma forma, na comparação direta dos resultados dos testes de toxicidade efetuada em ANDERSON *et al.* (1996), nas duas matrizes de avaliação (interface sedimento/água e água intersticial), foi observado resultado similar, ou seja, 50% das amostras apresentaram o mesmo efeito tóxico.

No presente estudo, apenas as amostras 4a, 5a e 14 (23% das 13 amostras) não apresentaram efeito adverso sobre os organismos (Tabela 16). Dentre essas três, a amostra 14 (água intersticial) apresentou amônia não ionizada abaixo de 0,05mg/L (concentração estimada, a partir da qual se espera efeito sobre embriões de *L. variegatus*), no início do teste e acima deste valor no término do mesmo (Tabela 11). Por outro lado, na interface sedimento/água, a amônia não ionizada manteve-se abaixo desse valor ao longo de todo o período experimental (Tabela 12).

Nas 10 amostras que apresentaram efeito tóxico na água intersticial, a concentração de amônia não ionizada inicial variou de 0,06 a 8,24mg/L, enquanto que a final variou de 0,07 a 4,53mg/L, ou seja, acima de 0,05mg/L. A única exceção observada foi na amostra 17, que apresentou 0,05mg/L no final do experimento (Tabela 11).

Analisando essas mesmas 10 amostras que apresentaram efeito tóxico, no teste da interface sedimento/água, a amônia não ionizada inicial variou de 0,06 a 0,38mg/L, exceto nos pontos 3a, 17 e 18b, onde verificou-se que estiveram abaixo de 0,05mg/L e, provavelmente, outras substâncias devem ter sido responsáveis pela toxicidade observada. Já a leitura final indicou amônia não ionizada variando de 0,06 a 0,32mg/L, sendo que

apenas as amostras 2a, 3a, 17 e 18b apresentaram amônia abaixo desse limite (Tabela 12).

Com relação às 11 amostras que não apresentaram resultados coincidentes entre os dois métodos (pontos 1, 5b; 7a, 8, 9, 10, 12, 13, 15a, 16 e 18a) (Tabela 16), apenas a amostra 16, no teste com água intersticial, apresentou concentração de amônia não ionizada inferior a 0,05mg/L (no término do experimento). Através desse método, estas 11 amostras causaram efeito adverso sobre o organismo-teste. No caso da interface sedimento/água, todas as onze amostras apresentaram amônia \leq 0,05mg/L, exceto o ponto 15a no final do experimento, sendo que através desse método não foi observado efeito adverso sobre embriões de *L. variegatus*.

Essas análises mostraram-se consistentes e confirmaram as informações disponíveis na literatura de que a presença da amônia não ionizada pode interferir nos testes de toxicidade com amostras de sedimento (MOORE *et al.*, 1997; CARR *et al.*, 2001).

Observou-se também que a presença de amônia não ionizada na água intersticial é várias vezes superior àquela presente na interface, tanto no início quanto no término dos experimentos. Isso pode ser observado no quadro abaixo, onde estão discriminados a título de exemplo os três maiores (amostras 6, 15b e 11) e menores (amostras 14, 13 e 1) valores de amônia nas amostras de água intersticial e na interface sedimento/água.

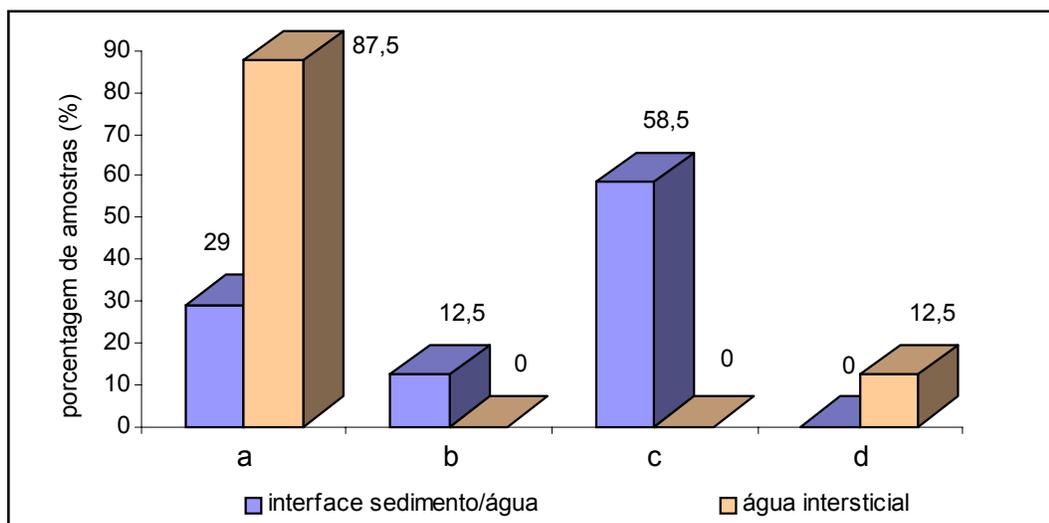
AMOSTRA	AMÔNIA NÃO IONIZADA (mg/L)				(*)
	INTERSTICIAL INICIAL	INTERSTICIAL FINAL	INTERFACE INICIAL	INTERFACE FINAL	
6	8,24	4,53	0,38	0,32	21, 14
15b	2,09	1,71	0,11	0,15	19, 11
11	1,07	0,83	0,22	0,21	5, 4
14	0,04	0,06	0,01	0,01	4, 6
13	0,06	0,10	0,01	0,02	6, 5
1	0,07	0,09	0,02	0,01	3, 9

(*) Número de vezes em que a água intersticial apresenta concentração de amônia não ionizada superior à água da interface sedimento/água (respectivamente no início e fim dos experimentos).

Ressalta-se que as menores concentrações de amônia não ionizada, observadas no teste com a interface, provavelmente são resultado da diluição dessa substância, promovida pela adição da água sobre o sedimento em cada frasco-teste. A amônia não ionizada na água de diluição adicionada sobre as amostras de sedimento variou de 0,0005 a 0,001mg/L.

Por outro lado, a amônia não ionizada diminuiu de 20 a 70% entre o início e o término do experimento para algumas amostras com água intersticial. Entretanto, somente nos pontos 4b, 16 e 17, os teores de amônia diminuíram para níveis onde o efeito tóxico não é esperado ($\leq 0,05\text{mg/L}$). Nos testes com a interface sedimento/água a maioria das amostras apresentaram concentração de amônia não ionizada inferior a 0,05mg/L no início do teste, exceto 2a, 2b, 3b, 6, 7b, 11 e 15b. Nestas amostras aquelas que apresentaram diminuição dessa substância ocorreu decréscimo de 16 a 74% e, somente na amostra 2a observou-se uma concentração inferior a 0,05mg/L.

Na avaliação geral dos 24 sedimentos analisados no presente estudo, 21 amostras no teste com água intersticial e 7 das 10 amostras na interface sedimento/água, que causaram efeito adverso sobre os organismos-teste apresentaram amônia não ionizada em concentrações acima daquela onde se espera efeito tóxico (Figura 10). Com relação às amostras de água intersticial 4a, 5a e 14, todas apresentaram amônia elevada em pelo menos uma das leituras (Tabela 11). No entanto a presença dessa substância não pode ser considerada interferente, uma vez que não foi observado efeito adverso sobre os organismos-teste. Com relação às 14 amostras que não apresentaram efeito tóxico na interface sedimento/água, a presença de amônia foi sempre inferior a 0,05mg/L durante todo o período experimental (Figura 10).



a = % de amostras com concentração de amônia não ionizada > 0,05 mg/L e toxicidade
 b = % de amostras com concentração de amônia não ionizada < 0,05 mg/L e toxicidade
 c = % de amostras com concentração de amônia não ionizada < 0,05 mg/L e sem efeito tóxico
 d = % de amostras com concentração de amônia não ionizada > 0,05 mg/L e sem efeito tóxico

FIGURA 10 - Comparação entre porcentagem de amostras, presença de amônia e efeito tóxico observado nos testes de toxicidade.

Em geral, conforme foi demonstrado, o teste com água intersticial apresentou tanto teores superiores de NH_3 em todas as amostras em relação à interface sedimento/água, quanto maior frequência de concentrações numa faixa onde, isoladamente, pode causar efeito tóxico (>0,05mg/L).

Da mesma forma, no trabalho conduzido por ANDERSON *et al* (1996), também foi demonstrado que os testes de toxicidade com a água intersticial apresentaram efeito adverso aos embriões do ouriço *Stroglyocentrotus purpuratus* para um maior número de amostras, quando comparado à interface sedimento/água, sendo que a amônia foi indicada como a maior responsável pela toxicidade observada.

BURGESS (1990 apud BURGESS & SCOTT, 1992), conduziu um estudo com o ouriço *Arbacia punctulata* para medir a liberação de poluentes

de sedimentos contaminados para a água, na região de Massachusetts, USA. Testes com a água intersticial também foram realizados em paralelo. As condições de exposição foram determinadas para modelar o processo de difusão molecular natural e difusão turbulenta, através da suspensão do sedimento. A toxicidade na coluna d'água foi observada na maioria dos sedimentos contaminados. Nos tratamentos onde a difusão foi natural observou-se menor toxicidade em relação à difusão turbulenta. As classes específicas de substâncias químicas identificadas como causadoras da toxicidade na coluna d'água foram comparadas com aquelas da água intersticial. A comparação indicou que a toxicidade na coluna d'água estava associada à presença de metais e orgânicos, enquanto que na água intersticial essa correlação não ocorreu, mas foi provavelmente devida à presença de amônia e sulfeto (BURGESS, 1990 apud BURGESS & SCOTT, 1992).

A diluição da amostra de água intersticial tem sido utilizada para interpretar resultados de testes de toxicidade, baseando-se no fato dos embriões de ouriço não viverem diretamente nessa água, mas poderem ser expostos à água intersticial diluída que, por difusão, chegue na coluna d'água. Segundo THORNBURG (2000), essa diluição também permite averiguar a influência da amônia, geralmente elevada na água intersticial. Esse mesmo autor, durante a avaliação de amostras de sedimento de San Diego, USA, verificou que na concentração de 100% de água intersticial, todas as amostras apresentaram efeito tóxico. Já nas concentrações de 50 e 25%, onde a amônia apresentou-se em concentrações menores, nenhum efeito adverso foi observado.

Entretanto BAY (1994), durante a avaliação de sedimentos ao redor da Califórnia também utilizou essa técnica da diluição da água intersticial analisando as concentrações de 100, 50 e 25%. Nas concentrações de 100 e 50% e mesmo na maior diluição (25%), muitas amostras apresentaram elevadas concentrações de amônia. A toxicidade foi correlacionada com

essa substância, tornando difícil e possivelmente incorreta a identificação de amostras tóxicas, sendo um indicativo de que essa técnica também não garante a diminuição dessa substância e sua consequente interferência na avaliação dos resultados.

Com relação ao presente estudo, embora tenha sido comprovada a influência da amônia não ionizada sobre os embriões de *L. variegatus* nos dois métodos, e maior nos testes com a interface sedimento/água foi possível excluir, para a maioria dessas amostras, a possível interferência dessa substância sobre o efeito tóxico observado. Dessa forma, um maior número de resultados de testes de toxicidade foi obtido com segurança, pois dentre as amostras analisadas na interface sedimento/água apenas 29% seriam questionáveis, contra 87,5% de amostras da água intersticial.

5.3 - Registro dos diferentes estágios embrio-larvais

O registro dos diferentes estágios do desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus* mostrou-se bastante útil. Foi observado que o resultado final além de oferecer informações a respeito da toxicidade da amostra (tóxica ou não tóxica), possibilitou a verificação da intensidade do efeito tóxico entre as diversas amostras. Naquelas classificadas como tóxicas, quanto maior o número de indivíduos em estágio mais adiantado do desenvolvimento embrio-larval, o efeito adverso sobre os organismos foi considerado menor.

Consequentemente, foi possível ordenar as diversas amostras classificadas como “tóxicas” (Figuras 11 e 12). Observando a ordenação das 10 amostras tóxicas na interface verificou-se que, embora não na mesma posição, 7 delas também apareceram como sendo as mais tóxicas na água intersticial.

A possibilidade de diferenciação entre amostras contaminadas, através da hierarquização de amostras em função da intensidade do efeito

tóxico observado, pode ser bastante interessante, por exemplo, num projeto de remediação de áreas contaminadas. Nesse caso, essa discriminação poderá ser utilizada como ferramenta auxiliar na indicação daquelas áreas que devem ser priorizadas ou mais profundamente avaliadas.

Esse é o caso do sistema estuarino de Santos e São Vicente, onde a hierarquização das amostras contaminadas apresentadas nas Figuras 11 e 12 pode ser utilizada para subsidiar a escolha do destino de sedimentos que necessitam ser dragados.

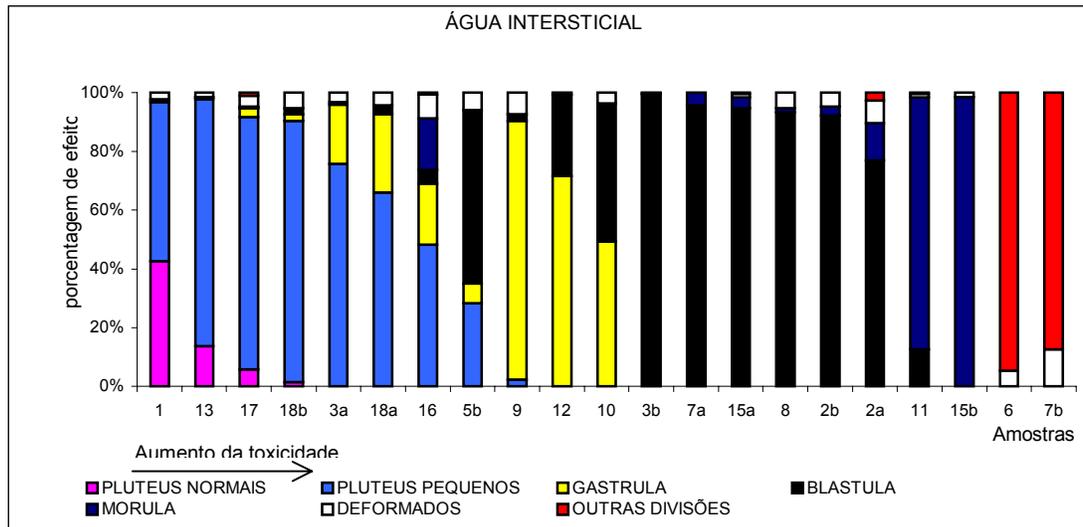


FIGURA 11 - Hierarquização das amostras de água intersticial classificadas como tóxicas, de acordo com o estágio de desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*.

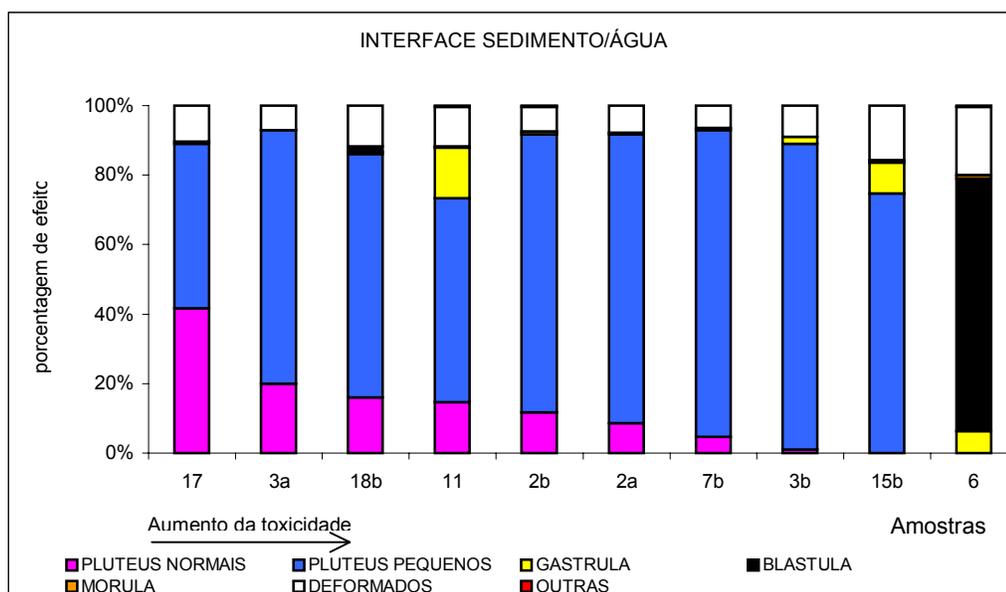


FIGURA 12 - Hierarquização das amostras da interface sedimento/água, classificadas como tóxicas, de acordo com o estágio de desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus*.

5.4 - Análises químicas e granulometria

Os metais nos sedimentos analisados foram detectados, em algumas amostras, em concentrações onde os efeitos tóxicos ocasionais (entre TEL e PEL) podem ocorrer de acordo com o critério numérico de classificação da qualidade de sedimentos apresentado no ENVIRONMENT CANADA (1999) e FDEP (1994) (ANEXO I). Cromo (amostras 3a, 3b); níquel (amostras 2a, 2b, 3a, 3b, 9, 18a, 18b), cobre (amostras 2a, 2b, 3a, 3b, 6, e 9); zinco (amostra 3b e 6); cádmio (amostras 2a, 2b, 3a, 3b, 6, 7a, 8 a 12, 18a e 18b), mercúrio (amostras 3a, 3b, 5a, 5b, 6, 7b, 9, 12, 16 e 18b) e chumbo (6, 18a e 18b). Também foram observadas concentrações acima das quais efeitos severos podem ser encontrados (acima do PEL), isto é, chumbo (pontos 3a, 3b); zinco (amostra 3a) e mercúrio (amostras 4a e 11) (Tabela 21).

Das 24 amostras analisadas, 18 apresentaram contaminação por algum metal. Fazendo uma comparação da referida classificação com as 10 amostras que apresentaram efeito tóxico sobre embriões de *L. variegatus* na interface sedimento/água, em 8 (80%) foram detectados metais entre TEL

e PEL ou acima do PEL. No que se refere às 21 amostras na água intersticial, em 16 amostras (76%) também foram detectados metais nas referidas faixas. Em ambos os casos, portanto, observou-se boa correlação entre os resultados de ambos os métodos e o critério de classificação da qualidade de sedimentos apresentados no ANEXO I.

Resgatando a informação do efeito tóxico observado nas amostras 16 e 17 na água intersticial, que apresentaram as menores concentrações de amônia ao longo de experimentos e também muito próximas do limiar de efeito tóxico para essa substância, observou-se que a presença de outros contaminantes poderiam, também, ter sido responsável pela toxicidade.

Comparando-se as concentrações dos metais determinados na água intersticial (Tabela 19), com os resultados dos testes de toxicidade citados na Tabela 29, obtidos para *L. variegatus* e outras espécies de ouriço, verifica-se que as concentrações de zinco e/ou cobre, nas amostras 1, 2a, 3a, 3b, 5b, 8, 13, 15a, 15b, 16, 17 e 18a, que também apresentaram efeito tóxico, estiveram acima da faixa onde isoladamente podem provocar efeitos adversos sobre *L. variegatus*. Além disso, embora não existam resultados da concentração de efeito do chumbo para o organismo-teste, outras espécies de ouriço são sensíveis em concentrações dessa substância presentes nas amostras. Esse tipo de avaliação é apenas uma tentativa de correlacionar o efeito observado com as substâncias químicas presentes nas amostras, pois se observarmos as amostras 4a, 5a e 14, que não exibiram toxicidade, nota-se que também apresentaram concentrações isoladas de cobre e zinco capazes de provocar efeito tóxico.

TABELA 29 - Resultados dos testes de toxicidade obtidos para *L. variegatus* e outras espécies de ouriço para alguns metais.

Substância	<i>L. variegatus</i> (mg/L)	Outras espécies de ouriços ⁽¹⁾ (mg/L)
Cd	2,7 (n=6) ⁽³⁾	0,5 – 2,0
Cr	3,9 (n=4) ⁽³⁾	1,0 – 5,0
Cu	0,016 (n=1) ⁽²⁾	0,002 – 0,3
Ni	0,5 (n=3) ⁽²⁾	0,6 – 2,0
Zn	0,07 (n=9) ⁽²⁾	0,005 – 0,1
Hg	-	0,01 – 0,03
Pb	-	0,005 – 3,0

⁽¹⁾ retirado de KOBAYASHI (1995), CENO

⁽²⁾ PRÓSPERI, dados não publicados, CI50; 24h

⁽³⁾ retirado de NIPPER & PRÓSPERI (1992), CE50;24h

No que se refere aos resultados das determinações de metais na interface sedimento/água (Tabela 20), as concentrações de chumbo (amostras 3a, 4a, 5a e 15), níquel (amostra 2a) e cobre (exceto 1, 7a e 18a) foram maiores quando comparadas com a água de diluição adicionada sobre o sedimento no início do experimento (Tabela 20). Observou-se, porém, que embora as amostras 1, 4a, 5a, 7a, 15a e 18a tenham apresentado alguns metais acima dos valores mencionados na Tabela 28, essas amostras não apresentaram efeito tóxico, possivelmente por não estarem biodisponíveis.

Quando as substâncias químicas estão disponíveis podem ser capturadas por organismos e dessa forma reagir no mecanismo metabólico. No caso dos metais, a biodisponibilidade no sedimento, e portanto a toxicidade, pode ser afetada pela ligação dos ions metálicos aos constituintes do sedimento. Os metais podem estar na forma livre em solução, complexados à matéria orgânica dissolvida ou coloidal, na água intersticial ou ligados a partículas de sedimento (LAMBERSON *et al.*, 1992).

Estudos sobre efeitos agudos e sub-letais têm demonstrado que sedimentos contaminados podem liberar contaminantes em concentrações

suficientes para causar efeito tóxico para uma variedade de algas, equinodermos e peixes (BURGESS & SCOTT, 1992). No presente estudo também foi interessante observar, através da comparação entre os metais presentes na água de diluição e na interface sedimento/água, que ocorreu o fluxo de metais do sedimento para a coluna d'água. Dessa forma, o efeito adverso observado nos organismos foi provocado provavelmente pelos constituintes tóxicos liberados para a interface sedimento/água, mesmo não sendo necessariamente causado pelos metais, uma vez que não foram analisadas outras substâncias químicas neste compartimento.

Também foi observado que algumas substâncias foram detectadas em concentrações inferiores àquelas determinadas na água de diluição adicionada sobre o sedimento, indicando que provavelmente as mesmas foram adsorvidas pela amostra de sedimento no sistema-teste (Tabela 20).

Na revisão realizada por KOBAYASHI (1971), é evidenciado que exposições de gametas e embriões de equinodermos a metais pesados induzem poliespermia, interrupção do desenvolvimento no estágio de blástula, gástrula e outras anomalias, sendo que a ocorrência desses eventos no presente estudo foi observada (Tabelas 17 e 18).

Dessa forma, as observações referentes aos metais determinados, tanto na água intersticial quanto na interface sedimento/água, indicam que o sedimento dessa região apresenta potencial para causar efeitos tóxicos adversos através dessa classe de contaminantes.

Com relação aos compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes nos ambientes aquáticos, sabe-se que são formados durante a combustão incompleta da matéria orgânica. Processos industriais que produzem HPAs incluem refinaria de petróleo e siderurgia, entre outros. Fontes atmosféricas incluem a queima de combustíveis, atividades

industriais, incineração de resíduos sólidos e incêndios florestais (USEPA, 1997).

Os HPAs podem ser divididos em dois grupos: os de baixo peso molecular, considerados os compostos com 2 e 3 anéis aromáticos fundidos (antraceno, acenafteno, fluoreno, naftaleno e fenantreno), e os de alto peso molecular com 4, 5 e 6 anéis aromáticos fundidos (pireno, fluoranteno, dibenzo(an)antraceno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)pireno e criseno). Os compostos de baixo peso molecular não são considerados carcinogênicos para um grande número de organismos marinhos, porém são muito tóxicos. Já os de alto peso molecular são menos tóxicos, mas apresentam alto potencial carcinogênico (KENNISH, 1997).

Foi verificado que as amostras 3a e 3b (canal de evolução da Cosipa) se sobressaem em relação às demais tanto em termos de compostos individuais quanto HPAs totais, pois apresentam concentrações destas substâncias cerca de 9 vezes acima do maior valor observado dentre todos os demais pontos. Os níveis de HPAs encontrados nestas amostras são muito superiores àqueles determinados em ambientes considerados poluídos. O valor máximo encontrado nessa região ($733.700\mu\text{g.kg}^{-1}$) é quatro vezes superior ao maior valor, em base seca, levantado na literatura (estuário do Hudson-Raritan - 9.900 a $182.000\mu\text{g.kg}^{-1}$) (KENNISH, 1997). Informações detalhadas a respeito da contaminação observada podem ser encontradas em LAMPARELLI *et al.* (2001).

A comparação das concentrações de HPAs presentes nas amostras e aquelas apresentadas no critério de qualidade de sedimento (ANEXO I) indicaram que 10 amostras apresentam hidrocarbonetos policíclicos aromáticos entre TEL e PEL ou acima do PEL. A correspondência dessa avaliação em termos da possibilidade de ocorrência de efeito adverso sobre os organismos aquáticos, com os resultados dos testes de toxicidade na interface sedimento/água, foi verificada somente com cinco amostras que

apresentaram efeito tóxico. Já nos testes com a água intersticial a correlação foi maior, uma vez que 9 amostras apresentaram toxicidade.

Da mesma forma, através de outra abordagem, quando se efetuou a sondagem a respeito de qual, dentre as metodologias testadas, apresentaria maior correlação com os dados de HPAs determinados nas amostras de sedimento bruto, a correlação canônica evidenciou que essas substâncias estiveram significativamente correlacionadas com os resultados de toxicidade obtidos na água intersticial (Tabela 25).

Por outro lado, as outras amostras (4a e 5a na água intersticial e 2a, 4a, 5a, 5b, 8 e 18a na interface), embora tenham apresentado concentrações entre as faixas anteriormente mencionadas, não exibiram efeito tóxico. De qualquer forma, várias amostras de sedimento apresentaram-se contaminadas por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, indicando que o sedimento dessa região apresenta potencial para causar efeitos tóxicos adversos sobre organismos aquáticos através dessa classe de contaminantes.

Resgatando todas as informações a respeito da comparação dos critérios numéricos de qualidade de sedimento (ANEXO I) e o efeito tóxico observado (Tabela 16), as amostras na interface sedimento/água (15b e 17) e na água intersticial (1, 13, 15a, 15b e 17), que também apresentaram efeito tóxico não se correlacionaram tanto com os critérios para HPAs como aqueles para metais, uma vez que nessas amostras não foram verificadas concentrações desses contaminantes no sedimento, nas faixas onde se pode esperar efeito tóxico ocasional ou severo.

Portanto, não se pode perder de vista o fundamento dos testes de toxicidade, que avaliam o resultado da somatória das condições ambientais sobre organismos-teste, onde efeitos antagônicos e sinérgicos podem ocorrer entre as diversas substâncias químicas, fazendo com que a

toxicidade possa ser maior, menor, ou igualar a soma da toxicidade dos seus constituintes (SOARES, 1990).

Conforme observado na Figura 12, a análise granulométrica dos sedimentos mostrou-se heterogênea, com predominância de areia, e mesmo assim, as concentrações de substâncias químicas, determinadas nas amostras de sedimento bruto, apresentaram-se bastante elevadas, em algumas amostras, conforme mencionado anteriormente.

A textura dos sedimentos pode controlar a concentração dos elementos-traço através dos seguintes mecanismos: sedimentos finamente granulados têm uma maior capacidade de remoção e adsorção de substâncias químicas quando comparados aos de maior tamanho de grãos, por causa da sua maior área superficial; essas superfícies são frequentemente mais reativas que a fase mineral carreadora por conterem hidróxidos de ferro (III) e manganês (IV), além de matéria orgânica e minerais específicos (carbonatos, minerais pesados, etc) que podem estar concentrados em certos tamanhos de grãos, dependendo da dinâmica do ambiente sedimentar (BEVILACQUA, 1996).

Baseados nesse princípio, através da técnica de correlação canônica tentou-se verificar a correlação entre a granulometria e o efeito tóxico observado nas amostras, sendo que não se evidenciou a influência direta do tamanho das partículas de sedimento sobre os resultados dos testes de toxicidade.

5.5 - Variabilidade entre réplicas

Outra questão abordada referiu-se à possível variabilidade entre as réplicas de campo (*a* e *b*) coletadas em alguns pontos (2, 3, 4, 5, 7, 15 e 18). Verificou-se que na água intersticial os resultados dos testes de toxicidade para as amostras 5a e 5b apresentaram resultados divergentes, sendo a primeira tóxica e a segunda não tóxica. Nos testes com a interface

sedimento/água as amostras 7a e 7b, 15a e 15b, 18a e 18b também apresentaram resultados divergentes, pois as réplicas “a” foram classificadas como não tóxicas e as réplicas “b” como tóxicas.

Razões específicas para essa diferença não puderam ser diretamente apontadas no presente projeto. No entanto, existem avaliações específicas não realizadas neste estudo, denominadas TIE (Toxicity Identification Evaluation), uma série de manipulações são empregadas na amostra, na tentativa de se chegar a uma resposta dos prováveis fatores responsáveis pela toxicidade observada (BURGESS *et al.*, 1996), que poderão ser realizadas no futuro.

Outro aspecto interessante a ser observado foi a questão da variabilidade entre as réplicas de teste. Essa variabilidade é frequentemente usada para definir a componente variância em testes estatísticos, sendo portanto o fator primário que afeta a capacidade discriminatória entre as amostras (HUNT *et al.*, 1998).

Através da avaliação das médias dos desvios-padrão de todas as amostras que apresentaram pluteus normais nos testes com água intersticial (Tabela 15) e com a interface sedimento/água (Tabela 16), verificou-se que o teste com a água intersticial apresentou menor variabilidade entre as réplicas do laboratório (Figura 13a).

Para a maioria das amostras na interface sedimento/água (79%) foi observada variabilidade entre as réplicas de 1 a 12% (Tabela 16). Apenas cinco amostras (21%) apresentaram desvio acima de 15%, ou seja, fora do padrão apresentado pelas outras. Diante deste fato, dos resultados dos testes com a interface, foram retiradas estas cinco amostras e observou-se que a variabilidade entre as réplicas nos dois métodos foi similar (Figura 13b).

Esse procedimento foi utilizado para medir a consistência da resposta entre as réplicas, sendo que o resultado pode ser considerado satisfatório para ambos os métodos.

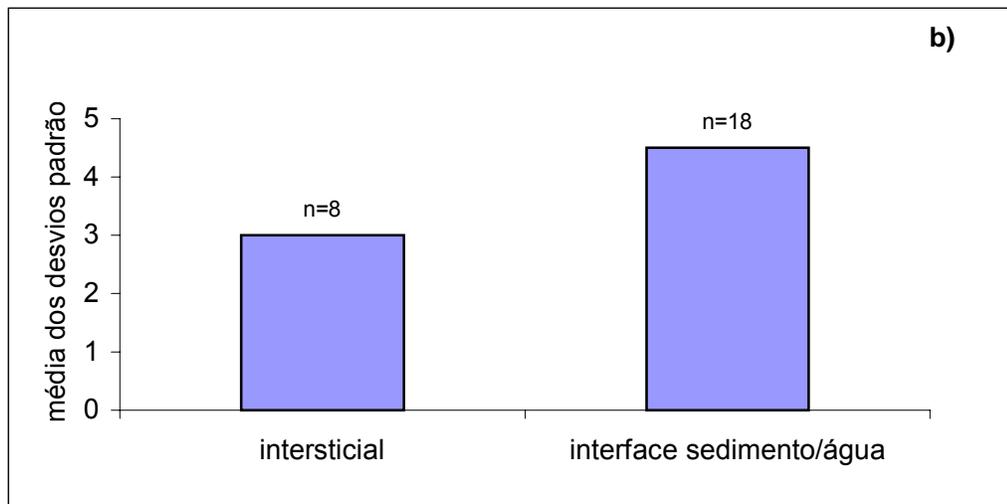
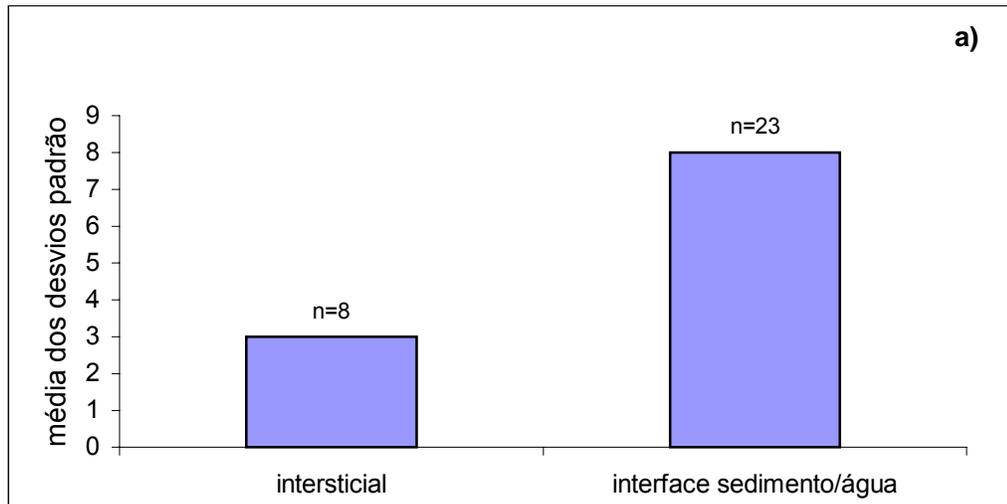


FIGURA 13 - Variabilidade entre réplicas do laboratório no teste de toxicidade com *L. variegatus*. As colunas representam a média dos desvios-padrão das amostras que apresentaram pluteus normais.

5.6 - Análise crítica dos métodos utilizados no presente estudo

Após a discussão dos resultados desse estudo, a comparação dos métodos também pode ser realizada através de outros itens citados na Tabela 30, incluindo aspectos metodológicos e práticos, referentes à rotina de trabalho no laboratório.

TABELA 30 - Comparação das metodologias de teste de toxicidade utilizadas no presente estudo.

PARÂMETRO AVALIADO	ÁGUA INTERSTICIAL	INTERFACE SEDIMENTO/ÁGUA
Homogeneização da amostra de sedimento, duração e critério de avaliação do ensaio, organismo-teste, parâmetros de controle do teste e tempo de leitura	Igual para ambos os métodos. A identificação dos diferentes estágios do desenvolvimento embrio-larval ao final do experimento requer especialista.	
Equipamentos específicos para obtenção da amostra a ser testada	Centrífuga com velocidade de 4000 rpm (+)	Nenhum (-)
Tempo (h/h) do técnico para preparo de 1 amostra (3 réplicas)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ média de 15 min. para pesagem de 3 sub-amostras, além de: a) 45 min. para centrifugação (caso se obtenha o volume necessário e a amostra não seja turva - total de 60 min.), ou b) 90 min. para centrifugação (caso seja necessário centrifugar nova subamostra para obtenção do volume necessário na primeira vez e a amostra não seja turva - total 105 min.), ou c) 65 minutos (a + 20 min. para a segunda centrifugação, caso a amostra seja turva - total de 70 minutos) d) 110 min. (b + 20 min. para a segunda centrifugação, caso a amostra seja turva - total de 125min.) (+) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ média de 15 min. para pesagem ▪ média de 15 min. para adição de água ▪ média de 10 minutos para acerto da aeração (-)
Execução do método	Exige prática do técnico, sendo o preparo das amostras mais complicado (+)	Apesar de exigir prática do técnico o preparo das amostras é mais fácil (-)
Salinização da amostra e implicações	Necessária para amostras com salinidade inferior a 30‰. Esse procedimento dificulta a comparação de amostras de uma mesma região em função dos diferentes níveis de diluição, obtidas após a salinização (+)	Não existe necessidade de salinização (-)
Facilidade de obtenção do frasco-teste	Tubos de ensaio com capacidade para 10mL em fornecedores diversos (-)	Béqueres de 1L e confecção de tubo-teste específico somente por encomenda (+)
Espaço físico para manutenção do teste durante todo o período experimental	menor (o teste é preparado em tubos de ensaio, acondicionados em grades, que podem ser mantidas tanto em incubadoras quanto nas bancadas do laboratório que possuam temperatura controlada) (-)	maior (o uso de incubadoras fica inviabilizado em função do espaço requerido, sendo as bancadas do laboratório a melhor opção) (+)
Presença do interferente "amônia"	Presente na maioria das amostras analisadas (87,5%) em concentração suficiente para causar efeito tóxico (+)	Presente na minoria das amostras analisadas (29%) em concentração suficiente para causar efeito tóxico (-)
Relevância ecológica	Menor, pois embriões de ouriço não vivem diretamente na água intersticial, embora possam ser expostos à essa água diluída que por difusão chega à coluna d'água (-)	Maior, pois embriões podem ser similarmente expostos em ambientes naturais quando se deslocam para o sedimento para completar o processo de desenvolvimento antes da metamorfose (+)
Custo geral	Maior (em função de h/h e centrífuga) (+)	Menor (em função do menor tempo de h/h, além de não existir necessidade da centrífuga) (-)
Viabilidade de utilização em monitoramento	Viável, exigindo maior estrutura, esforço e/ou custo (6+)	Viável, exigindo menor estrutura, esforço e/ou custo (3+)

(+) = maior estrutura, esforço ou custo

(-) = menor estrutura, esforço ou custo

Deve ser ressaltado que o método de avaliação da interface sedimento/água não apresenta problemas associados à salinidade e diluição variável da amostra, que podem complicar a avaliação entre pontos de amostragem e minimiza os efeitos tanto da amônia como de sulfetos, que podem ser interferentes importantes durante os testes de toxicidade. Além disso, aumenta a representatividade dos testes embrio-larvais, uma vez que nesse sistema-teste os embriões de ouriço são mantidos numa tela cerca de 1cm acima da superfície do sedimento. Embriões de equinodermos podem ser similarmente expostos em ambientes naturais quando se deslocam da coluna d'água para o sedimento a fim de completar o processo de desenvolvimento através da metamorfose (HUNT et al.,1998).

Essas considerações reforçaram a indicação do método com a interface sedimento/água como o mais adequado nas avaliações da toxicidade de sedimentos marinhos e estuarinos.

6 - CONCLUSÕES

- A concentração de amônia não ionizada é um fator relevante a ser observado na realização de testes de toxicidade com sedimento, tendo em vista que foram obtidas correlações significativas entre os resultados dos testes de toxicidade e a concentração de amônia não ionizada para os dois métodos testados (água intersticial e interface sedimento/água);
- Os estágios de mórula e blástula no método que utiliza a água intersticial, e o de gástrula, no método que utiliza amostra da interface sedimento/água, foram os estágios de desenvolvimento embrionário mais sensíveis ao efeito tóxico da amônia não ionizada;
- Quando comparado com aquele realizado na interface sedimento/água, o método utilizando a água intersticial resultou tanto em teores superiores de amônia não ionizada quanto apresentou maior frequência de concentrações onde, isoladamente, poderiam causar efeito tóxico ($>0,05\text{mg/L}$) a *L. variegatus*;
- O método que utiliza a interface sedimento/água possibilitou o aproveitamento de um maior número de resultados de testes de toxicidade (71%) do que aquele com amostras da água intersticial (12,5%), concluindo-se portanto ser este o método mais adequado nas avaliações da toxicidade de sedimentos marinhos e estuarinos, para minimizar a interferência da amônia não ionizada;
- Houve uma excelente correlação entre a concentração dos metais no sedimento e aquelas determinadas na interface sedimento/água. Entretanto, a confirmação dessa informação somente será possível, caso uma amostragem balanceada entre as duas matrizes seja efetuada;

- Foi verificada uma correlação significativa entre as concentrações de metais nos sedimentos e a intensidade dos efeitos tóxicos, com o uso do método que utiliza a interface sedimento/água;
- Observou-se correlação significativa entre os resultados das concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) determinadas nas amostras de sedimento bruto e a intensidade do efeito tóxico observado com o método que utiliza a água intersticial;
- Não foi evidenciada a influência direta da granulometria nos resultados dos testes de toxicidade para ambos os métodos testados;
- Verificou-se diferença nos resultados de toxicidade entre as réplicas de campo (de 7 amostras, 4 apresentaram resultados divergentes). Razões específicas para essa diferença não puderam ser diretamente apontadas no presente estudo;
- A consistência da resposta entre as réplicas de teste, avaliada através dos desvios-padrão, foi considerada satisfatória;
- O registro dos diferentes estágios embrio-larvais encontrados em cada amostra mostrou-se bastante útil, pois o resultado final além de oferecer informações a respeito da toxicidade da amostra (tóxica ou não), possibilitou a hierarquização em termos da intensidade do efeito daquelas amostras consideradas tóxicas;
- Esse tipo de registro poderá ser utilizado como ferramenta auxiliar em futuros trabalhos de monitoramento ambiental, na indicação daquelas áreas que deverão ser priorizadas ou mais profundamente avaliadas;
- Verificou-se concordância entre os resultados dos testes de toxicidade com *L. variegatus* obtidos para ambos os métodos e os critérios numéricos de qualidade de sedimentos (TEL e PEL).

7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.J.; KIMERLE, R.A. & MOSHER, R.G. (1985). Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 7th Symposium*, STP 854, R.D. Cardwell, R. Purdy & R.C. Bahner (eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials, p. 429-453.
- ALLEN, H. (1971). Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Mar. Poll. Bull.*, v.2, p.138-140.
- ALTIMARI, M.I.S. (1987). *Estudos fisio-farmacológicos com pedicelárias do ouriço do mar Lytechinus variegatus, Lamarck, 1816*. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 102p.
- ANDERSON, B.S; HUNT, J.W.; HESTER, M. & PHILLIPS, B.M. (1996). Assessment of sediment toxicity at the sediment-water interface. In: *Techniques in Aquatic Toxicology*. G.K. Ostrander (ed.), Lewis Publishers, Chapter 33, p. 609-624
- APHA; AWWA; WPCP (1995). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* 19th edition. Washington, DC. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation.
- APHA; AWWA; WPCP. (1989). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* 17th edition. Washington, DC. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation.
- APHA; AWWA; WPCP. (1992). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* 18th edition. Washington, DC. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation.

- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1994). *Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing*. ASTM/E 1391-94, 21p.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1995). *Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos*. ASTM/ E 1563-95, 20p.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1996). *Elements in water by ICP-MS*. ASTM D-5673/96, 12p.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (2000). *Measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. ASTM/ E 1706-00, 117p.
- BADARÓ-PEDROSO, C. (1999). *Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas*. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 249p.
- BARNES, R.D. (1984). *Zoologia dos invertebrados*. Ed. Roca, 4^a ed. São Paulo, 1179p.
- BAY, S.M. *Sediment toxicity on the mainland shelf of the Southern California Bight in 1994*. <http://www.sccwrp.org/pubs/annrpt/94-95/art-15.htm> (25/01/02), 11p.
- BEVILACQUA, J.E. (1996). *Estudos sobre a caracterização e a estabilidade de amostras de sedimentos do rio Tietê, SP*. Tese (doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 137p.
- BIANCONCINI, M.S. (1978). *Atividades de enzimas das vias glicolítica e do fosfogliconato de músculos de lanterna de três ouriços do mar, **Arbacia lixula** (Linn. 1758), **Echinometra lucunter** (Linn. 1758) e **Lytechinus variegatus** (Lamarck, 1816)*. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 92p.

- BORGMANN, U. (1994). Chronic toxicity of ammonia to the amphipod *Hyalella azteca*; importance of ammonium ion and water hardness. *Environ Pollut.*, n.86, p. 329-335.
- BOWER, C.E. & BIDWELL, J.P. (1978). Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. *J. Fish. Res. Board. Can.*, n. 35, 1012-1016
- BRUNGS, W.A. & MOUNT, D.I. (1978). Introduction to a discussion of the use of aquatic toxicity tests for evaluation of the effects of toxic substances. In: *Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life*. ASTM Special Technical Publication 657, p.15-26.
- BURGESS, R.M. & SCOTT, K.J. (1992). The significance of in-place contaminated marine sediments on the water column: process and effects. In: *Sediment toxicity assessment*. G. Allen Burton, Jr (ed.), chapter 7, p. 126-165.
- BURGESS, R.M.; SCHWEITZER, K. A.; MCKINNEY, R.A. & PHELPS, D. (1993). Contaminated marine sediments: water column and interstitial toxic effects. *Env. Tox. Chem.*, v.12, n. 1, p.127-138.
- BURGESS, R.M.; HO, K.T.; MORRISON, G.E.; CHAPMAN, G. & DENTON, D.L. (1996). *Marine toxicity identification evaluation (TIE) phase I guidance document*. USEPA, EPA/600/R-96/054. National Health and Environmental Effects Laboratory, Atlantic Ecology Division.
- CARR, R.S. & CHAPMAN, D.C. (1995). Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests-extraction, storage, and handling techniques. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.28, p. 69-77.
- CARR, R.S., NIPPER, M.G.; ADAMS, W.J.; BERRY, W.; BURTON Jr., G.G.; HO, K.; MACDONALD, D.; SCROGGINS, R & WINGER, P.V. (2001). *Summary of a SETAC Technical workshop porewater toxicity testing: biological, chemical and ecological considerations with a review of methods and applications, and recommendations for future areas of*

research, 18-22 march 2000; Pensacola, FL. SETAC. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. www.setac.org

CARR, R.S.; CHAPMAN, D. C. (1992). Comparison of solid-phase and pore-water approaches for assessing the quality of marine and estuarine sediments. *Chem. Ecology*, v.7, p. 19-30.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1995). CETESB. *Sedimentos - Determinação da distribuição granulométrica*. Norma Técnica L6. 160, 15 p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1989). CETESB. *Água - Determinação do potencial de crescimento algáceo*. Norma Técnica L5.321, 15p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1990a). CETESB. *Água - Teste de toxicidade aguda com peixes - Parte I - sistema estático*. Norma Técnica L5.019-I, 29p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1990b). CETESB. *Água - Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte II – sistema semi-estático*. Norma Técnica L5.019-II, 29p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1991a). CETESB. *Água - Teste de toxicidade aguda com **Daphnia similis***. Norma Técnica L5.018, 33p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1991b). CETESB. *Água - Avaliação de toxicidade crônica, utilizando **Ceriodaphnia dubia** Richard 1894 (Cladocera, Crustacea)*. Norma Técnica L5.022, 25p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1992). CETESB. *Água do mar - Teste de toxicidade aguda com **Mysidopsis juniae**, Silva, 1979*. Norma Técnica L5.251, 19p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (1999). CETESB. *Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta*

duração com **Lytechinus variegatus**, Lamarck, 1816. Norma Técnica L5.250, 20p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. (2000). *Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1999*. Série Relatórios/CETESB, 391p.

CHAPMAN, D.V. (1989). *Concepts and strategies for biological monitoring*. London GEMS Monitoring and Assessment Research Center, 25p.

CHIA, FU-S. (1973). Killing of marine larvae by diesel oil. *Mar. Pollut. Bull.*, v.4, n.2, p.29-30.

DI TORO, D.M.; MAHONY, J.D.; HANSEN, D.J.; SCOTT, K.J.; HICKS, M.B. MYR, S.M. & REDMOND, M.S. (1990). Toxicity of cadmium in sediments: the role of acid volatile-sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.9, n.11, p.1489-1504.

DI TORO, D.M.; ZARBA, C.S.; HANSEN, D.J.; BERRY, W.J.; SWARTZ, R.C.; COWAN, C.E.; PAVLOU, S.P.; ALLEN, H.E.; THOMAS, N.A. & PAQUIN, P.R. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environm. Toxicol. Chem.*, v.10, p.1541-1583.

DINNEL, P.; LINK, J.M. & STOBBER, Q.J. (1987). Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, v.16, p. 23-32.

DINNEL, P.; PAGANO, G.G. & OSHIDA, P.S. (1988). A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: *Proceedings of the sixth International Echinoderm Conference*. Burke, R.D.; MLADENOV, P.V.; LAMBERT, P & PARSLEY, R.L. (eds). Balkema, Rotterdam., p. 611-619.

DINNEL, P.A. & STOBBER, Q.J. (1985). *Methodology and analysis of sea urchin embryo bioassays*. Circular nº 85-3 Fisheries Research Institute, School of Fisheries, University of Washington. 1985, 19p.

DINNEL, P.A.; LINK, J.M.; STOBBER, Q.J.; LETOURNEAU, M.W. & ROBERTS, W.E. (1989). Comparative sensitivity of sea urchin sperm

bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, v.18, p.748-755.

DINNEL, P.A.; STOBBER, Q.J.& JULIO, D.H. (1981). Sea urchin bioassay for sewage and chlorinated seawater and its relation to fish bioassays. *Mar. Environ. Res.*, 5:29-39.

ENVIRONMENT CANADA. (1990a). *Biological test method: Acute lethality using **Daphnia** spp.* Canada. (Report EPS 1/RM/11), 57p.

ENVIRONMENT CANADA. (1990b). *Biological test method: Acute lethality test using rainbow trout.* Canada. (Report EPS 1/RM/9), 51p.

ENVIRONMENT CANADA. (1990c). *Biological test method: Acute lethality test using threespine stickleback (**Gasterosteus aculeatus**).* Canada. (Report EPS 1/RM/10), 45p.

ENVIRONMENT CANADA. (1992a). *Biological test method: Growth inhibition test using the freshwater alga **Selenastrum capricornutum**.* Canada. (Report EPS 1/RM/25), 41p.

ENVIRONMENT CANADA. (1992b). *Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchin and sand dollars).* Canada. (Report EPS 1/RM/27), 97p.

ENVIRONMENT CANADA. (1992c). *Biological test method: Test of larval growth and survival using fathead minnows.* Canada. (Report EPS 1/RM/22), 70p.

ENVIRONMENT CANADA. (1992d). *Biological test method: Test of reproduction and survival using cladoceran **Ceriodaphnia dubia**.* Canada. (Report EPS 1/RM/21), 72p.

ENVIRONMENT CANADA. (1992e). *Biological test method: Toxicity test using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon).* Canada. (Report EPS 1/RM/28), 79p.

- ENVIRONMENT CANADA (1992f). *Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods*. Canada (Report EPS 1/RM/26), 83p
- ENVIRONMENT CANADA (1992g). *Biological test using luminescent bacteria (**Photobacterium phosphoreum**)*. Canada (Report EPS 1/RM/24), 61p.
- ENVIRONMENT CANADA. (1994a). *A framework for ecological risk assessment of contaminated sites in Canada: review and recommendations*. Gaudet, C., Scientific Series n° 199.
- ENVIRONMENT CANADA. (1994b). *Guidance document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological testing*. Ottawa (Ontario). EPS 1/RM/29, 132p.
- ENVIRONMENT CANADA. (1999) *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Summary Tables*. <http://www.ec.gc.ca>
- ENVIRONMENT ONTARIO. (1992). *Laboratory sediment biological testing protocol*. Ontario Ministry of Environment. 26p.
- ERICKSON, W.P. & MCDONALD, I.I. (1995). Tests for bioequivalence of control média and test média in studies of toxicity. *Env. Tox. Chem*, v.14, n.7, p.1247-1256.
- FARMER, J.G. (1991). The perturbation of historical pollution records in aquatic sediments. *Env.Geoch. Health.*, v.13, n.2, p.76-83.
- FDEP. (1994). *Approach to the assessment of sediment quality in Florida coastal waters. Vol. I - Development and evaluation of sediment quality assessment guidelines*. Prepared for Florida Department of Environmental Protection, Office of Water Policy, Tallahassee, FL, by MacDonald Environmental Sciences Ltd., Ladysmith, British Columbia.
- GIESY, J.P.; ROSIU, C. J.; GRANEY, R.L.; HENRY, M.G. (1990). Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environm. Tox. Chem.*, v.9, p.233-248.

- GIORDANO, F. (1986). *Ouriços do Sublitoral Rochoso da Região de São Sebastião/São Paulo - Uma Abordagem Ecológica*. Dissertação (mestrado) apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, 128p
- GIUDICE, G. (1973). *Developmental biology of the sea urchin embryo*. Academic Press, New York, 469p.
- GREENSTEIN, D. J.; ALZADJALI, S. & BAY, S.M. (1994). *Toxicity of ammonia to purple sea urchin (**Strongylocentrotus purpuratus**) embryos*. <http://www.sccwrp.org/pubs/annrpt/94-95/art-07.htm>
- HARGIS, W.J.; ROBERTS, M.H. Jr. & ZWERNER, D.E. (1984). Effects of contaminated sediments and sediment-exposed effluent water on an estuarine fish: acute toxicity. *Mar. Environ. Res.*, v.14, p.337-354.
- HARRIS, H.J. (1990). Ecotoxicology and ecosystem integrity: The Great Lakes examined. *Env. Sci. Tech.*, v.24, n.5, p.598-603.
- HIS, E.; HEYVANG, I.; GEFFARD, O. & DE MONTAUDOUIN, X. (1999). A comparison between oyster (**Crassostera gigas**) and sea urchin (**Paracentrotus lividus**) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research*, v. 33, n. 7, p. 1706-1718.
- HOADLEY, L. (1923). Certain effects of the salts of the heavy metals on the fertilization reaction in **Arbacia punctulacta**. *Biol. Bull.*, v. 44, p. 255-280.
- HOFFMAN, D.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr., G.A. & CAIRNS Jr., J. (eds). (1995). *Handbook of ecotoxicology*. Lewis Publishers.
- HOFSTRA, M.A. (1995). Dealing with polluted sediments in the Netherlands. In: *POSW - Satellite Seminar "Remédiation of Contaminated Sediments" Fifth International FZK/TNO, Conference on Contamination Soil*, p.11-19.
- HUNT, J.W.; ANDERSON, B.S.; PHILLIPS, B.M.; NEWMAN, J.; TJEERDEMA, R.; STEPHENSON, M.; PUCKETT, M.; FAIREY, R.; SMITH, R.W. & TABERSKI, K. (1998). *Evaluation and use of sediment reference sites and toxicity tests in San Francisco Bay. Final report*.

Bays and Estuaries Unit, Division of Water Quality, California State Water. 38p.

JAAGUMAGI, R. & PERSAUD, D. (1995). Sediment Assessment and Remediation - Ontario's Approach. In: *POSW - Satellite Seminar "Remediation of Contaminated Sediments" Fifth International FZK/TNO, Conference on Contaminated Soil*, p. 21-32.

KEMP, P.F. & SWARTZ, R.C. (1988). Acute toxicity of interstitial and particle-bound cadmium to a marine infaunal amphipod. *Mar. Env. Res.*, v.26, p.135-153.

KENNISH, M.J. (1997) *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. CRC Press. Boca Raton. 524 p..

KLEMM, D.J.; MORRISON, G.E.; NORBERG-KING, T.J.; PELTIER, W.H. & HEBER, M.A. (1994). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms* (2nd ed.). U.S.EPA - Environmental Protection Agency, EPA/600/4-91/003. Cincinnati, Ohio, 483p.

KNEZOVICH, J.P.; STEICHEN, D.; JELINSKI, J.A. & ANDERSON, S.L. (1996). Sulfide tolerance of four marine species used to evaluate sediment and pore-water toxicity. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, v.57, p.450-457.

KOBAYASHI, N. (1971). Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, v.18, p.379-406.

KOBAYASHI, N. (1981). Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersants to canadian and japanese sea urchin eggs. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, n.1/3, p. 123-133.

KOBAYASHI, N. (1990). Marine pollution bioassay by sea urchin eggs, an attempt to enhance sensitivity. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, v.34, n.4/6, p.225-237.

- KOBAYASHI, N. (1995). Bioassay data for marine pollution using echinoderms. *In: Encyclopedia of Environmental Control Technology*. P.N. Cheremisinoff (ed.), vol. 9, chapter 16, p.539-609.
- LAMBERSON, J.O.; DEWITT, T.H. & SWARTZ, R.C. (1992). Assessment of sediment toxicity to marine benthos. *In: Sediment toxicity assessment*. BURTON, Jr., G.A. (ed) Lewis Publishers, Inc., Chelsea. p. 183-211.
- LAMPARELLI, M.L.; COSTA, M.P.; PRÓSPERI, V.A.; BEVILACQUA, J.E.; ARAUJO, R.P.A.; EYSINK, G.G.J. & POMPÉIA, S. (2001). *Sistema Estuarino de Santos e São Vicente*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 178p.
- LEWIS, P.A.; KLEMM, D.J.; LAZORCHAK, J.M; NORBERG-KING, T.J.; PELTIER, W.H. & HEBER, M.A. (1994). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. EPA/600/4-91/002, 341p.
- LILLIE, F.R. (1921). Studies of fertilization. The effects of copper salts on the fertilization reaction in **Arbacia** and a comparison of mercury effects. *Biol. Bull.*, v.41, p.125-143.
- LONG, E.R.; BUCHMAN, M.F; BAY, S.M.; BRETELER, R.J.; CARR, R.S.; CHAPMAN, P.M.; HOSE, J.E.; LISSNER, A.L.; SCOTT, J. & WOLFE, D.A. (1990). Comparative evaluation of five toxicity tests with sediments from San Francisco Bay and Tomales Bay, California. *Env. Tox. Chem.*, v. 9, p.1193-1214.
- LONNING, S. & HANGSTRÖN, B.E. (1975). The effects of crude oils and the dispersant Corexit 8666 on sea urchin gametes and embryos. *Norw. J. Zool.*, v.23, p.121-129.
- LOPES, C.F.; MILANELLI, J.C.C.; PRÓSPERI, V.A; ZANARDI, E. & TRUZZI, A.C. (1997). Coastal monitoring program of São Sebastião Channel: assesing the effects of "Tebar V" oil spill on rocky shore populations. *Mar. Pol. Bul.*, v.11, p.923-927.

- MACEK, K.J. (1980). Aquatic toxicology: fact or fiction. *Environ. Health Persp.*, v.34, p.159-163.
- MANGIATERRA, M.B.C.D. (1997). *Caracterização, ao nível tecidual, da cinética do processo inflamatório em ouriço-do-mar, Lytechinus variegatus, adulto*. Dissertação (mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 127p.
- MASTROTI, R.R. (1999). *Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar*. Dissertação (mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 111p.
- MEYBECK, M; CHAPMAN, D V. & HELMER, R (1990). Antropogenic Impacts on Water Quality In : *Global Freshwater Quality* Blackwell(eds), London, 306p.
- MILLER, D.C.; POUCHER, S.; CARDIN, J.A. & HANSEN, D. (1990). The acute and chronic toxicity of ammonia to marine fish and a mysid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.19, p.40-48.
- MIX, M.C. (1986). Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical review. *Mar. Env. Res.*, v. 20, p.1-141
- MONROY, A. (1986). A Centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *Biol. Bull.*, v. 171, p. 509-519.
- MOORE, D.W.; BRIDGES, T.S.; GRAY, B.R. & DUKE, B.M. (1997). Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod **Leptocheirus plumulosus**. *Env.Tox. Chem.*, v. 16, n. 5, p. 1020:1027.
- MORRISON, D. (1990) *Multivariate Statistical Methods.*, 3rd ed. McGraw-Hill. New York.
- MUCHMORE, D. & EPEL, D. (1973). The effects of chlorination of wastewater on fertilization in some marine invertebrates. *Mar. Bull.*, v. 19, p. 93-95.

- NAVAS-PEREIRA, D.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P.A. & SASSI, R. (1987). Bioensaios: Um Programa a Serviço do Controle da Poluição - Resultados Iniciais. *Ambiente*, v.1, p.32-36.
- NIPPER, M.G. & PRÓSPERI, V.A. (1992). *Desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos marinhos*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 23p.
- NIPPER, M.G. & PRÓSPERI, V.A. (1993). *Desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos marinhos*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 30p.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.A. & ZAMBONI, A.J. (1993). Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Env. Contam. Tox.*, v. 50, n. 5, p.646-652.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.A.; PEDROSO, C.B.; ZAMBONI, A.J. & JOSE, V.F. (1990). *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos marinhos*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 40p.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.A.; PEDROSO, C.B.; ZAMBONI, A.J. & MELO, S.L.R. (1991). *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos - Vol III - Testes com organismos marinhos*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 28p.
- NIPPER, PEDROSO, C.B.; JOSÉ, V.F.; MELO, S.L.R.; PRÓSPERI, V.A. & ZAMBONI, A.J. (1992). Toxicity testing with southeastern Brazil marine crustaceans and echinoderms. In: *Proceedings SETAC, 13th Annual Meeting*. Abstracts, p.271.
- NOAA - NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (1991). *The potential for biological effects of sediments sorbed contaminants tested in the national status and trends program*. NOAA Technical Memorandum NOS OMA 52, 175p.+ anexos.
- NORBERG-KING, T.J. (1993). *A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (Icp) Approach version 2.0*. National

Effluent Toxicity Assessment Center. Environmental Research Laboratory, Duluth. Technical Report 63-93.

PASCHOAL, C.M.R.B. (1996). *Avaliação da qualidade ambiental de Cubatão*. São Paulo. 144p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo.

PEDDICORD, R.; CHASE, T.; DILLON, T.; McGRATH, J.; MUNNS, W.R.; GUCTHE, VAN DE K.; SCHALIE, VAN DE W. (1995). Workgroup summary report on navigational dredging. In: *Ecological Risk Assessment of contaminated sediments*, chapter 5, p. 41-71. Setac Press Publications series. Ingersoll, C.G, Dillon, T and Biddinger, G.R (eds.), p.45-66.

PETTS, G. & P. CALOW (eds.) (1996). *River Biota: Diversity and dynamics*. Blackwell Science, Inc., Cambridge, MA. 264p.

POWER, E.A. & CHAPMAN, P.M. (1992). Assessing sediment quality. In: *Sediment toxicity assessment*. G. Allen Burton, Jr (ed.), chapter 1, p.1-18.

PRÓSPERI, V.A. & NIPPER, M.G. (1989a). Avaliação do efeito de agentes tóxicos sobre a fecundação e o desenvolvimento embrio-larval de equinodermos. In: *VII Mini-Simpósio de Biologia Marinha*, Resumos, p.28.

PRÓSPERI, V.A. & NIPPER, M.G. (1989b). Desenvolvimento de metodologia para avaliação de efeitos de agentes tóxicos sobre a fertilização de **Lytechinus variegatus** e **Arbacia lixula** (Echinodermata: Echinoidea). *Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia*. vol. II, suplemento especial, publ. N° 4.11.

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

- PRÓSPERI, V.A. (1998). *Desenvolvimento de metodologia de cultivo e testes de toxicidade com organismos marinhos*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 25p. + anexos.
- PRÓSPERI, V.A.; EYSINK, G.G.J.; VALENT, G.U. (1998). *Avaliação do grau de contaminação do sedimento ao longo do Canal de navegação do Porto de Santos, São Paulo*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 26p. + anexos.
- PRÓSPERI, V.A.; NIPPER, M. G.; ZAMBONI, A. J.; BADARÓ-PEDROSO, C. (1996). *Monitoramento da qualidade das águas e sedimento do Canal de São Sebastião através de testes de toxicidade*. São Paulo, Relatório Técnico CETESB, 30p+ anexos.
- PRUEL, R. J.; QUINN, J. G. (1985). Geochemistry of organic contaminants in Narragansett Bay sediments. *Est. Coastal Shelf Sci.*, v.21, p.295-312.
- RACHID, B.R.F. 1996. *Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos*. Dissertação (mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 106p.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. (ed) (1985). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing - Washington, USA. 666pp.
- REIDEL, G.F.; SANDERS, J.G. & OSMAN, R.W. (1989). The role of three species of benthic marine invertebrates in the transport of arsenic from contaminated estuarine sediment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.13, p.143-155.
- REISH, D.J. (1987). The use of toxicity testing in marine environmental research. *In: Marine organisms as indicators*. Soule, D.F. and Kleppel, G.S. (eds). Springer-Verlag, NY., p.231-241.
- REUBER, B.; MACKAY, D.; PATTERSON, S.; STOKES, P. (1987). A discussion of chemical equilibria and transport at the sediment water interface. *Env. Tox. Chem.*, v.6, p.731-739.

- SALOMÃO, L.C. (1978). *Estudo de algumas respostas osmóticas de Perna perna*, Linné, 1758 (Mollusca: Bivalvia), 175 p. Tese (dDoutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- SALOMONS, W.; ROOJI, N.M.; KERDIJK, H. & BRIL, J. (1987). Sediments as a source for contaminants. *Hydrobiologia*, v. 149, p. 13-30.
- SANTSCHI, P.; HOHENER, P.; BENOIT, G. & BRINK, M. B. (1990). Chemical process at the sediment-water interface. *Mar. Chem.*, v. 30, p. 269-315
- SARDA, N. & BURTON, G.A. Jr. (1995). Ammonia variation in sediments: spatial, temporal and method-related effects. *Environm. Toxicol. Chem.*, v. 14, p. 1499-1506.
- SAWAYA, M.I. (1987). Diferenças na atividade colinomimétrica de homogeneizados de cabeças e pedúnculos de pedicelárias globíferas do ouriço do mar **Lytechinus variegatus**, Lamarck, 1816. *Ciência e Cultura*, v.39, n.7, supl., p.799-800.
- SAWAYA, M.I. (1989a). Eliminação da secreção de pedicelárias globíferas do ouriço do mar **Lytechinus variegatus**. In: *Reun. Na. Fed. Soc. Biol. Experim., 4º Cong. Bras. Farmacol. Therapeut. Experimen., 7º Cong. Bras. Fisiol., 24º Cong Bras. Invest. Clin., 5º Cong. Bras. Immunol.* 1989, Ribeirão Preto, SP, Resumos, p. 344, res. 13.31.
- SAWAYA, M.I. (1989b). Papel da secreção de pedicelárias na comunicação química do ouriço do mar **Lytechinus variegatus**. In: *Reun. Na. Fed. Soc. Biol. Experim., 4º Cong. Bras. Farmacol. Therapeut. Experimen., 7º Cong. Bras. Fisiol., 24º Cong Bras. Invest. Clin., 5º Cong. Bras. Immunol.* 1989, Ribeirão Preto, SP, Resumos, p. 502, res. 23.3.
- SOARES, A.M.V.M. (1990). Ecotoxicologia e Determinação de Riscos Ecológicos. Prática e Perspectivas. *2ª Conferência Nacional Sobre a Qualidade do Ambiente*. Vol 1. Lisboa, p.B43-B52.

- SPRAGUE, J.B. (1973). The ABC's of pollutant bioassay using fish. *In: Biological Methods for the Assessment of water quality*. Cairns, J.R. and Dickson, K.L. (eds). American Society for Testing and Materials., p.6-30.
- STATSOFT, Inc. (1998). *STATISTICA for Windows* (computer program manual).
- STEARNS, L.W. (1973). *Sea urchin development celular and molecular aspects*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., p.11-72.
- STRAUGHAN, P. (1976). Sublethal effects of natural chronic exposure to petroleum in the marine environment. *API. Publ.*, v.4280, p.73-77.
- SUGUIO K. (1973). *Introdução à sedimentologia*. Editora Edgard Blucher Ltda. EDUSP, 317p.
- THORNBURG, T.M. (2000). *State water quality control board, San Diego Region. Peer review document*. www.swrcb.ca.gov/rwgcb.
- THURSBY, G.B.; HELTSHE, J. & SCOTT, K.J. (1997). Revised approach to toxicity test acceptability criteria using a statistical performance assessment. *Environm. Toxicol. Chem.*, v.16, p.1322-1329.
- THURSTON, R.V. & RUSSO, R.C. (1981). Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on toxicity of the un-ionized ammonia species. *Environ. Sci. Technol.*, v.15, p.837-840.
- TOMMASI, L.R. (1979). *Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos (SP)*. vol I, 247p. Tese (Livre-docência) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- TYLER, A. (1949). A simple, non injurious method for inducing repeated spawning in sea urchins and sand dollars. *Collectin Net*, v. 19, p.19-20.
- USEPA. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1989). *Ambient water quality criteria for ammonia (saltwater)*. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standards Division. EPA-440/5-88-004.

- USEPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY & USACE - U.S. ARMY CORPS OF ENGINEERS. (1991). *Evaluation of dredged material proposed for ocean - testing manual*, EPA - 503/8-91/001. Office of Water (WH-556F).
- USEPA. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994a). Method 3051- *Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils* U.S. Environmental Protection Agency .
- USEPA. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994b). *Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods (SW-846)*. CD-ROM USEPA, Revision 2 – september, 1994. Method 8270B – Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS): capillary column technique.
- USEPA. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994c). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. EPA/600/R-1994/024, 133p.
- USEPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1994d). *Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods*. U. S. Environmental Protection Agency. EPA 600/R-94/025.
- USEPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1994e). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. U. S. Environmental Protection Agency. EPA 600/R-94/024. 133p.
- USEPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1995). Purple urchin, **Stroglyocentrotus purpuratus** and sand dollar, **Dendraster excentricus**; larval development test method. *In: Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms*. EPA/600/R-95/136. www.epa.gov/neleerd/westmethman.htm.

- USEPA. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997). *The incidence and severity of sediment contamination in surface waters of the United States*. Volume 1: National Sediment Quality Survey. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Science and Technology Washington, DC., EPA 823-R-97-006.
- VAN CAPPELLEN, J. & WANG, Y. (1995). Metal cycling in surface sediments: modeling the interplay of transport and reaction. *In: Metal contaminated aquatic sediments*. ALLEN, H.E. (ed). Ann Arbor Press, Inc., chapter 2, p. 21-64.
- WEBER, C.I. (1993). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. EPA/600/4-90/027F, 293p.
- WEST, Inc. & GULLEY, D. (1996). *Toxstat workgroups* – version 3.5.
- WHITEMAN, F.W.; ANKLEY, F.W.; DAHL, M.D.; RAU, D.M. & BALCER, M.D. (1996). Evaluation of interstitial water as a route of exposure to ammonia in sediment test with macroinvertebrates. *Environm. Toxicol. Chem.*, v.15, p.794-801.
- ZAMBONI, A.J. (1993). *Avaliação da qualidade de água e sedimentos do canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com **Lytechinus variegatus** (Echinodermata: Echinoidea)*. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ANEXO I - Critérios utilizados para avaliação da qualidade de sedimentos marinhos e estuarinos.

	POLUENTE	TEL ⁽¹⁾	PEL ⁽¹⁾
Metais pesados e Arsênio (µg/g)	Arsênio	7,24	41,6
	Cádmio	0,7	4,21
	Chumbo	30,2	112
	Cobre	18,7	108
	Cromo	52,3	160
	Mercúrio	0,13	0,696
	Níquel ⁽²⁾	15,9	42,8
	Zinco	124	271
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos PAHs - (µg/Kg)	Acenafteno	6,71	88,9
	Acenaftileno	5,87	128
	Antraceno	46,9	245
	Benzo-a-antraceno	74,8	693
	Benzo-a-pireno	88,8	763
	Criseno	108	846
	Fenantreno	86,7	544
	Fluoranteno	113	1494
	Fluoreno	21,2	144
	Naftaleno	34,6	391
	Pireno	153	1398

⁽¹⁾ ENVIRONMENT CANADÁ (1999)

⁽²⁾ FDEP (1994)

TEL (Threshold Effect Level): Nível limiar abaixo do qual não ocorre efeito adverso à comunidade biológica.

PEL (Probable Effect Level): Nível provável de efeito adverso à comunidade biológica (freqüentemente associado a efeitos biológicos)