UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

MESTRADO EM ECOLOGIA

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE USANDO O ORGANISMO BENTÔNICO *Nitocra* sp (CRUSTACEA: COPEPODA: HARPACTICOIDA)

MARIANA ALICEDA FERRAZ

SANTOS/SP
2013

MARIANA ALICEDA FERRAZ

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE USANDO O ORGANISMO BENTÔNICO *Nitocra* sp (CRUSTACEA: COPEPODA: HARPACTICOIDA)

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação de Rodrigo Brasil Choueri.

SANTOS/SP
2013

Ferraz, Mariana Aliceda
Desenvolvimento e aplicação de um método para
a avaliação e identificação da toxidade usando o organismo
bentônico *Nitocra* sp (Crustacea: Copepoda: harpacticoida)
/ Mariana Aliceda Ferraz. –- 2013.
55 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília,
Programa de Pós-Graduação em Mestrado de Ecologia Marinha,
Santos, SP, 2013.

1. Avaliação e identificação da Toxicidade (AIT). 2.
Nitocra sp. 3.Emissário submarino de Santos-SP.
I. Choueri, Rodrigo Brasil, orient. III. Título.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

AUTORIZAÇÃO DE REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

_____

Assinatura

Santos _____/_____/_____

Dedico esta produção aos meus amáveis pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri pela orientação e dedicação com o nosso trabalho. Á sua esposa Prof. Paloma Gusso Choueri por sua ajuda no laboratório da UNESP.

Aos meus pais que, apesar das dificuldades nestes dois anos (que não foram fáceis), batalharam e me apoiaram em todos os momentos.

Ao meu irmão que apesar de longe sempre esteve nos momentos difíceis.

Aos Profs. Drs. Augusto Cesar, Camilo Dias Seabra Pereira, Aldo Ramos e responsáveis do laboratório Fábio Hermes Pusceddu e Fernando Sanzi Cortez, em especial para a aluna Aline Vecchio Alves, pois sem ela eu nunca teria conseguido realizar todos os ensaios. Na chuva ou no sol, no feriado ou não, no final de semana ou não, 12 horas por dia no laboratório, ela sempre esteve comigo. Muitíssimo obrigada!!!!

Á Marina Cunha Passarelli pelos momentos dentro e fora do laboratório, nos trabalhos das disciplinas, sem contar as horas na academia só discutindo sobre o mestrado onde uma apoiava a outra, a final estávamos no mesmo “barco”.

Ao Pro. Dr. Denis Moledo Abessa que gentilmente cedeu alguns organismos *Nitocra* sp. as quais foram essenciais para a realização deste trabalho, além de abrir as portas do laboratório para o que fosse preciso.

RESUMO

Os métodos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) combinam ensaios de toxicidade e simples manipulações físico/químicas de uma amostra com o objetivo de alterar seletivamente a toxicidade de classes específicas de contaminantes, para assim determinar as causas principais da toxicidade em amostras complexas. O ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico com ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) é comumente utilizado para avaliar amostras de água intersticial marinha (AIM). No entanto, ensaios com organismos bentônicos podem ser mais adequados para avaliar a toxicidade da AIM, já que estes são mais adaptados às condições bentônicas naturais (por exemplo, os níveis de amônia, sulfetos, sólidos em suspensão), minimizando os casos "falsos positivos". O objetivo deste estudo foi desenvolver um método para AIT, por meio de ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo com o organismo bentônico *Nitocra* sp. No desenvolvimento do método foram avaliados preliminarmente: (i) a aptidão dos ensaios de toxicidade com náuplios de *Nitocra* sp. em pequenos volumes de meio de ensaio (2,5 mL); (ii) tempos de exposição diferentes (24h-48h-72h-96h) para os ensaios (n = 3); (iii) a sensibilidade dos náuplios de *Nitocra* sp. e dos embriões do ouriço do mar *L. variegatus* aos reagentes utilizados nas manipulações de AIT: EDTA, tiossulfato de sódio e metanol (n = 3). Uma vez definidas as características ótimas dos ensaios de toxicidade, as manipulações da AIT foram aplicadas em AIM obtidas das amostras de sedimento coletadas no entorno do emissário submarino de Santos e de uma área situada em Bertioga-SP, utilizando-se: (i) a adição de EDTA e; aeração em pH (ii) ácido e (iii) básico; e (iv) passagem da amostra em coluna C18. Os resultados dos ensaios de toxicidade com as amostras brutas e após as manipulações foram comparados pelo teste de Dunnet ($\alpha = 0,05$). O volume da solução-teste de 2,5 mL e tempo de exposição de 48h foram os mais adequados. Definidas as características dos ensaios e manipulações da AIT, o método foi aplicado e, utilizando *Nitocra* sp., foi evidenciada a toxicidade da AIM em amostras do ESS e de Bertioga é principalmente por substância voláteis em pH ácido (provavelmente sulfetos) e básicos (provavelmente amônia), substâncias orgânicas não iônicas e/ou surfactantes, e, não muito clara, contribuição de metais catiônicos. A AIT com *L. variegatus* sugeriu apenas os sulfetos como principais causadores da toxicidade no EES, o que pode ser consequência da necessidade de maior diluição das amostras devido à sensibilidade do organismo aos sulfetos. Estudos pretéritos no local mostram a presença, associada à toxicidade, de metais e orgânicos não iônicos, além de altos níveis de LAS. A aplicação dos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo com náuplios de *Nitocra* sp. foi, portanto, considerada adequada para AIT com água intersticial marinha.

Palavras - chave: Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT); *Nitocra* sp.; Emissário submarino de Santos –SP .

ABSTRACT

Methods of Toxicity Identification and Evaluation (TIE) combine toxicity assays and simple physical/chemical manipulations properties on a sample in order to selectively alter the toxicity of specific classes of contaminants suspected to cause toxicity. The toxicity assay to evaluate chronic effect with sea urchin (*Lytechinus variegatus*) is commonly used to evaluate marine interstitial water (IW) samples. However, assays with benthic organisms may be more appropriate to analyze IW since they are more adapted to the natural benthic conditions (ex.: levels of ammonia, sulphides, suspended solids), minimizing the occurrence of "false positives". The aim of this study was to develop a method for TIE using acute toxicity assays with the benthic organism *Nitocra* sp. It was preliminarily evaluated: (i) the ability of toxicity assay with nauplii *Nitocra* sp. using small volumes of experimental medium (2.5 mL); (ii) different exposure times (24h-48h-72h-96h) (n = 3); (iii) the sensitivity of *Nitocra* sp. nauplii and embryos of sea urchin *L. variegatus* to the reagents used in the TIE manipulations: EDTA, sodium thiosulfate and methanol (n=3). Once defined the optimal characteristics of toxicity, the TIE framework was applied in IW of sediment from the vicinity of SSO and an area located at Bertioga-SP, using: (i) the addition of EDTA and (ii) sodium thiosulfate; (iii) aeration at acidic and basic pH, and (vi) C18 reverse phase chromatography columns. The results of the baseline toxicity assays and the results obtained after the manipulations were compared by the Dunnett test ($\alpha = 0.05$). The volume of test solution of 2.5 mL and exposure time of 48 hours were the most appropriate test conditions. The TIE using Nitocra sp. assays showed that the toxicity of IW from SSO and Bertioga is caused by acid and basic volatile substances (probably sulphides and ammonia, respectively) , nonionic organic substances and/or surfactants, and, although not very clear, the cationic metals. The TIE using *L. variegatus* suggested only sulphides as the main substance responsible for toxicity in the SSO, which may be consequence of the need of the dilution of the raw sample due to the high sensitivity of *L. variegatus* to sulphides. Previous studies showed the presence of metals and non-ionic organics associated to toxicity, beside high levels of LAS in this place. The use of toxicity assays to evaluate acute effect on nauplii *Nitocra* sp. was considered adequate to TIE with marine interstitial water.

Key words: Toxicity Identification and Evaluation (TIE); *Nitocra* sp.; submarine sewage outfall of Santos - SP.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**..... 01
2. **OBJETIVOS**..... 06
3 **MATERIAL E MÉTODO**..... 07
3.1. Adequação dos ensaios de toxicidade agudo com náuplios de *Nitocra* sp..... 07
3.2. Ensaios de toxicidade de desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus*..... 09
3.3. Ensaios de toxicidade com substância de referência 11
3.4. Análises físico-químicas de controle de qualidade dos testes..... 11
3.5. Sensibilidade dos organismos-teste aos reagentes de AIT..... 11
3.5.1. EDTA..... 12
3.5.2. Tiossulfato de sódio ($NA_2S_2O_3$)..... 12
3.5.3. Metanol..... 12
3.6. Área de estudo, coleta, acondicionamento das amostras..... 13
3.7. Extração da água intersticial..... 15
3.8. Avaliação e identificação da toxicidade – AIT..... 15
3.8.1. Adição de EDTA..... 15
3.8.2. Coluna de spe C18..... 16
3.8.3. Manipulações de pH e aeração..... 16
3.9. Análises físico-químicas de controle de qualidade dos testes..... 18
3.10. Caracterização dos sedimentos..... 18
3.11. Forma de análise dos resultados..... 18
4. **RESULTADOS**..... 19
4.1. Sensibilidade dos organismos – teste..... 19
4.2. Definição do melhor tempo de exposição e volume de meio experimental para ensaios com *Nitocra* sp..... 20
4.3. Sensibilidade do *Nitocra* sp. Aos reagentes de AIT..... 22
4.4. Sensibilidade do *L.variegatus* aos reagentes de AIT..... 25
4.5. AIT aplicado em água intersticial utilizando ensaio com *Nitocra* sp..... 29
4.6. AIT aplicado em água intersticial utilizando ensaio com *L. Variegatus*. 38
4.7. Análise físico-químico..... 47
4.8. Caracterização do sedimento..... 47
5. **DISCUSSÃO**..... 49
5.1. Adequação dos ensaios com *Nitocra* sp. E avaliação da sensibilidade dos organismos-teste ao reagente da AIT..... 49
5.2. Aplicação da AIT na água intersticial de sedimento do emissário submarino de esgoto de santos e sedimento de Bertioga..... 53
5.2.1. Caracterização do sedimento..... 53
5.2.2. EDTA..... 53
5.2.3. Coluna de C18..... 55
5.2.4 Aeração com pH modificado..... 57
6. **CONCLUSÕES**..... 61

7. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... 62

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos contaminantes, uma vez introduzidos no meio aquático, tende a se depositarem e acumularem-se nos sedimentos após interações com íons dissolvidos, material particulado em suspensão, matéria orgânica, compostos químicos nos sedimentos ou com a fração fina da matriz sedimentar (CHAPMAN e WANG, 2001; EGGLETON e THOMAS, 2004). Os sedimentos, portanto, exercem o papel de depósito de contaminantes. Porém, sob certas condições ambientais, estes contaminantes podem se ressolubilizar e serem ingeridos pela biota.

Tradicionalmente as avaliações de qualidade de sedimentos são focadas na quantificação das concentrações de contaminantes. No entanto, o uso de análises biológicas em avaliações e monitoramento da qualidade de sedimento e caracterização de material dragado tem sido defendido e recomendado por especialistas desde o final da década de 1970. Atualmente, o uso de testes de toxicidade para este fim é internacionalmente recomendado (LC, 1996; GIPME, 2000; PIANC, 2006; ASTM, 1999; ABNT, 2012; USEPA, 2007) ainda que sejam poucos os países que integram estas técnicas dentro de um marco regulatório (CHOUERI et al., 2010).

O uso de análises químicas e ecotoxicológicas são comumente empregados a fim de identificar quais contaminantes são os responsáveis pelos efeitos ecotoxicológicos observados. De acordo com Choueri et al. (2010), a relação entre contaminação, toxicidade e alterações em comunidades bentônicas, pode não representar uma relação de causa-e-efeito, levando desta forma a um diagnóstico errôneo sobre quais contaminantes são os responsáveis pelos efeitos observados.

A habilidade em se identificar qual classe de contaminantes - ou contaminante específico - é responsável pela toxicidade em misturas complexas, como os sedimentos, é o objetivo dos métodos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT). Aplicados em avaliação da qualidade de sedimentos, estes métodos combinam testes de toxicidade e manipulações químicas simples, permitindo um progressivo estreitamento do foco da investigação sobre a substância suspeita (USEPA, 2007).

A identificação das substâncias que causam a toxicidade em misturas complexas de contaminantes é importante por diversas razões e possui aplicação em diferentes setores: (i) é imprescindível para se planejar estratégias eficientes de remediação dos sedimentos degradados; (ii) é importante para se conhecer com maior exatidão as fontes de

contaminação; (iii) é imperativa para se eliminar casos de “falso-positivo”, quando substâncias naturais dos sedimentos são as causas da toxicidade observada.

A AIT de sedimentos tem se demonstrado uma efetiva ferramenta para identificação de agentes causadores de toxicidade em sedimento integral e água intersticial em avaliações ambientais, quer seja, por exemplo, para avaliação da qualidade de sedimentos marinhos (ex.: KWOK et al., 2005; MACKEN et al., 2008; PICONE et al., 2009; ANDERSON et al., 2010), reservatórios continentais (ARAÚJO et al., 2006), rios (MEHLER et al., 2010), estuários (PERRON et al., 2010; MEHLER et al., 2011), corpos d’água costeiros (PHILLIPS et al., 2012), quer seja para outros propósitos, tais como avaliação de opções de disposição de material dragado (ANKLEY et al., 1992; HO et al., 1997), identificação de fontes de contaminantes urbanas e agrícolas (WESTON e LIDY, 2010), avaliação ambiental em episódio de acidente com óleo (BIEDENBACH e CARR, 2011), identificação da toxicidade de material particulado de rodovias (WATANABE et al. 2013) ou identificação da toxicidade em corpos d’água alvo de programas de remediação ambiental (YING et al., 2009) .

Ensaios de desenvolvimento embriolarval e fertilização do ouriço-do-mar *Arbacia punctulata* foram realizados em estudos de AIT (fase I e fase II) e os resultados sugerem compostos orgânicos, metais e amônia como os causadores da toxicidade de amostras de água intersticial de sedimentos provenientes da Baía de Ostrich e no porto Hadlock localizados nos Estados Unidos (CARR et al, 2001). Em outro estudo, as fases I, II e III da AIT, empregando ensaios de toxicidade utilizando a bactéria marinha *Vibrio fischeri* foram aplicadas em amostras de água intersticial dos sedimentos em Hong Kong e identificaram compostos orgânicos e sulfetos como causadores da a toxicidade, porém através de um efeito sinérgico entre estas classes de substâncias (KWOK et al, 2005).

Macken et al (2008) descrevem que, apesar dos ensaios de toxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri* não necessitarem de grandes volumes de amostra e serem ensaios de pequena duração (características importantes para a aplicação da AIT em água intersticial) este organismo é menos sensível a PCB e PAH quando comparado ao copépodo *Tisbe battaglia.* Em contrapartida, os ensaios com o copépodo *T. battaglia* necessitam de maiores volumes de meio experimental e são de maior duração que o ensaio com a bactéria *V. fischeri* . Devido a alta sensibilidade do copépodo *T. battaglia* aos compostos químicos, os autores indicam a necessidade de novos estudos a fim de

simplificar os ensaios com este copépodo para se tornarem fortes candidatos para as manipulações da AIT.

No Brasil, são escassos os estudos de aplicação de AIT em estudos focados nos sedimentos, sejam ensaios utilizando água intersticial, sedimento integral ou interface sedimento-água. Araújo et al. (2006) utilizou a AIT para identificação das substâncias responsáveis pela toxicidade da água intersticial e elutriatos de sedimentos do Reservatório de Rasgão, localizado na região metropolitana da cidade de São Paulo. Em sedimentos marinhos, Rachid (2002) aplicou um esquema de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) em amostras de água intersticial de sedimentos coletados próximo à saída do emissário submarino na Baía de Santos (SP). Iniciativas recentes vêm sendo desenvolvidas, em âmbito nacional, no sentido de desenvolver AIT utilizando sedimento integral e ensaios com diferentes organismos (ARAUJO, 2013).

É certo que a aplicação da AIT em nível nacional depende de se avaliar não apenas a adequabilidade de ensaios padronizados, mas também, e principalmente, estudar a aplicabilidade de ensaios que utilizem espécies que ofereçam vantagens na confiabilidade dos resultados. Isto contribuiria substancialmente para o desenvolvimento de um protocolo para aplicação de AIT em sedimentos marinhos brasileiros, para por fim avaliar com precisão a qualidade de sedimentos marinhos e identificar com maior segurança as substâncias causadoras de toxicidade.

Apesar de experiências anteriores exitosas ao redor do mundo, a aplicação dos métodos de AIT em água intersticial de sedimentos não possui ainda protocolo padronizado para sua utilização na avaliação do risco ambiental de sedimentos e identificação das substâncias causadoras de toxicidade. Existem variações metodológicas tanto em relação à manipulação dos sedimentos marinhos, quanto aos testes de toxicidade realizados. É comum o emprego de ensaios de toxicidade que utilizem organismos (ou fases de seu ciclo de vida) de hábitos pelágicos para amostras de água intersticial (ex.: USGS, 2011; PICONE et al., 2009; ANDERSON et al., 2006; Naval Facilities Engineering Command, 2000; BURGESS et al. 1993;). A utilização de organismos pelágicos em testes de toxicidade com água intersticial possui, portanto, o inconveniente de se utilizar organismos pouco adaptados às condições bentônicas naturais, podendo facilmente resultar em “falsos-positivos” em testes com água intersticial (PUSCEDDU et al., 2007).

No entanto, amônia e sulfetos são importantes compostos naturais que, em muitas ocasiões, acabam por interferir nos resultados de ensaios de toxicidade (Philips et al.,

1997; ver Postma et al., 2002, para uma revisão). Segundo Ho et al (2002) a maior parte dos estudos de AIT envolvendo água intersticial indicam a amônia como principal responsável pela toxicidade.Trabalhos recentes ainda indicam esta tendência, como Picone et al (2009), que evidenciou a amônia como a causadora da toxicidade em amostra de água intersticial nos organismos testados (células espermáticas do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* e desenvolvimento embriolarval do bivalve *Crassostrea gigas*). Porém, os resultados da fase II, onde houve a remoção da amônia com manipulação de exposição da macroalga *Ulva rigida* antes das demais manipulações, demonstrou que, além da amônia, metais também causavam toxicidade.

O ensaio de toxicidade com o copépode harpacticóide de vida livre *Nitocra* sp., apesar de ainda não utilizado em esquemas de AIT e não possuir norma padronizada pela ABNT, é considerado bastante adequado para ensaios de toxicidade devido a facilidade de seu cultivo, boas taxas de reprodução em laboratório e sensibilidade a diversos contaminantes (LOTUFO & ABESSA, 2002). Outra característica que apoia seu uso potencial em esquemas de AIT é seu pequeno porte, desta forma não exigindo grandes volumes de amostras. Porém, o mais importante é que, por ser um organismo bentônico, fornece resultados mais realísticos em métodos de AIT focado em sedimentos (água intersticial, sedimento integral e/ou interface sedimento água).

Uma das principais fontes conhecidas de contaminantes para a Baía de Santos (SP) é o sistema de lançamento de efluentes domésticos no mar (RACHID, 2002; ABESSA et al. 2005; ABESSA et al. 2008). Através deste sistema, grande parte dos esgotos de Santos e São Vicente são despejados no meio marinho após sofrer apenas um pré-acondicionamento que consiste em filtração e cloração, antes de seu lançamento através do duto que deságua na região central da Baía de Santos.

RACHID (2002), de forma preliminar, aplicou um esquema de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) sobre amostras de água intersticial de sedimentos coletados próximo ao emissário submarino de Santos (SP). No entanto, nos últimos 10 anos, as cidades de Santos e São Vicente passaram por notáveis modificações socioeconômicas, dentre as quais se podem salientar incrementos substanciais do produto interno bruto (PIB), da atividade econômica e da população. Isto certamente se reflete em modificações quantitativas e qualitativas da toxicidade proveniente dos efluentes do emissário na Baía de Santos. Apesar de não ser objetivo principal deste estudo, é um

produto importante a identificação das principais substâncias responsáveis pela toxicidade dos sedimentos sob influência do emissário submarino de Santos.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi desenvolver e aplicar a metodologia para a Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) empregando água intersticial com os náuplios de *Nitocra* sp. Para comparação, foi também utilizado na AIT, além dos ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. desenvolvido no presente estudo, os ensaios de desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* que são comumente utilizados e padronizados (ABNT, 2012).

Para chegar a este objetivo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

(i) avaliação da adequabilidade de se realizar ensaios com náuplios de *Nitocra* sp.com volume de meio experimental reduzido (2,5 mL);

(ii) avaliação do tempo de exposição mais adequado para o ensaio com náuplios de *Nitocra* sp. no método da AIT (maior exposição, mantendo a aceitabilidade do ensaio);

(iii) avaliação da sensibilidade dos náuplios de *Nitocra* sp. e de *Lytechinus variegatus* em relação aos reagentes da AIT;

(iv) aplicação da metodologia desenvolvida para Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) dos contaminantes causadores da toxicidade em água intersticial extraída de sedimentos das circunvizinhanças do emissário submarino de Santos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. ADEQUAÇÃO DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDO COM NÁUPLIOS DE *Nitocra* sp

O copépodo harpaiticóide *Nitocra* sp. pertence ao Filo Artropoda, Subfilo Crustacea, Classe Maxilipoda, Subclasse Copepoda, Ordem Harpaticoida e Família Ameiridae (BOECK, 1864). Segundo Ruppert & Barnes (2005), os harpacticóides que constituem em 50% dos copépodos, são predominantemente bentônicos e alguns deles vivem entre os grãos de areia e consequentemente os organismos expostos constantemente ao sedimento e a água intersticial..

Os animais deste estudo, cujas matrizes foram obtidas de culturas do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia da UNESP, São Vicente (SP), são cultivados em laboratório em erlenmeyers contendo 800 mL de meio de cultura (Figura 1). Para a este trabalho, os cultivos, originalmente mantidos em salinidade 20, foram gradativamente modificados para salinidade 30, para serem utilizados em amostras marinhas. Os organismos foram mantidos em câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2ºC e 16/08 horas (claro/escuro), foram alimentados 3 vezes por semana com composto de ração de peixe e a manutenção realizada mensalmente.

Figura 1. Cultivos de *Nitocra* sp. mantidos no laboratório de ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília.

As metodologias para o emprego da espécie de copépode *Nitocra* sp. em ensaios de toxicidade recomendam a utilização de 10 organismos adultos (Figura 2) em 10 ml de amostra, em ensaios de tempo de exposição de 96h (LOTUFO e ABESSA, 2002; ISO, 1999).Neste estudo, inicialmente avaliou-se diferentes tempos de exposição (24h, 48h, 72h e 96h), além da adequabilidade de se realizar este ensaio com náuplios (n=10) (Figura 3) (ao invés de adultos) em volume de meio experimental reduzido (2,5mL).

Foram preparadas 4 réplicas para cada diluição e os tratamentos controle. Os ensaios foram realizados em microplacas com 24 compartimentos de volume 2,5 mL (Figura 4). Com o auxílio de uma lupa, os náuplios foram obtidos dos cultivos filtrando-os com o auxílio de malhas de 60µm, e em seguida capturados com o auxilio de uma pipeta automática de 10 - 100µL, finalmente transferidos para as microplacas e inseridos na câmara incubadora com temperatura de 25 ± 2ºC e com fotoperíodo controlado (12/12 horas claro/escuro). O encerramento dos ensaios consistiu na contagem dos organismos vivos observados em lupa de aumento 4x.

Figura 2. Adulto do organismo *Nitocra* sp. (Foto: Alves, A.V.)

Figura 3. Náuplio do organismo *Nitocra* sp. (Foto: Ferraz, M.A.)

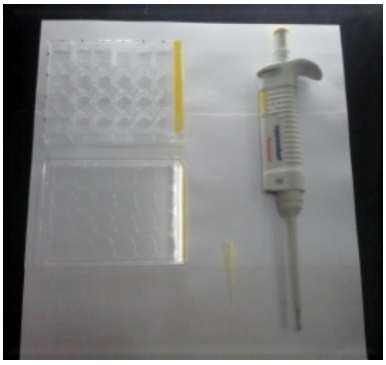


Figura 4. Microplaca com 24 poços e pipeta automática de 10 - 100µL para a captura dos organismos. (Foto: Ferraz, M. A.)

3.2. ENSAIOS DE TOXICIDADE DE DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DE *Lytechinus variegatus*

O ensaio de toxicidade crônico de curta duração (24h) foi realizado com o ouriço-do-mar *L. variegatus* (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) (Lamarck, 1816), seguindo a metodologia proposta por Nilin *et al.* (2008) que adaptou o método da ABNT (NBR 15350/2006) utilizando volume amostral de 2,5mL.

Os indivíduos utilizados neste estudo foram coletados na Ilha das Palmas localizada na Baía de Santos, através de mergulho livre. Após a coleta os organismos foram acondicionados em caixas isotérmicas e cobertos com toalha úmida, em seguida foram levados ao laboratório onde foram mantidos em tanque com aeração constante até o momento da extração dos gametas. Após os ensaios os indivíduos foram devolvidos ao seu habitat natural.

Para a obtenção dos gametas necessários à realização dos ensaios de toxicidade, os ouriços-do-mar foram estimulados através da aplicação de pulsos elétricos de 35V na face aboral dos organismos. Os ovócitos, caracterizados pela coloração amarelo-alaranjados, foram coletados posicionando as fêmeas individualmente apoiadas sobre as bordas de béqueres de 600 mL. Foi verificada então a viabilidade dos óvulos em microscópio óptico comum, avaliando-se quanto ao seu formato (arredondado é desejável e inexistência de micrópila), superfície (desejável superfície lisa) e homogeneidade do tamanho.

O esperma, de coloração branca, foi por sua vez coletado com auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro e acondicionado em béquer de 25mL, mantido em gelo. A suspensão de esperma constitui-se de aproximadamente 1mL de esperma, acrescidos de 24mL de água de diluição. Para a realização da fecundação foram acrescentados de 1mL a 2mL da suspensão espermática ao recipiente contendo os óvulos. Alíquotas de 1mL (n=3) foram então extraídas desta suspensão para quantificação do número de zigotos formados (identificados pela membrana de fecundação a sua volta). Esta contagem foi realizada sob microscópio óptico comum e com o auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter. O intuito deste procedimento foi avaliar o sucesso da fecundação, sendo considerados aptos para os testes lotes com mais de 90% de óvulos fecundados.

Verificada fecundação satisfatória, se estimou a concentração de zigotos na suspensão para que se adicione 300 deles em cada poço das microplacas contendo 2,5mL

da solução teste. Os ensaios foram compostos por 4 réplicas para cada diluição e 4 réplicas por tratamento controle da água de diluição.

Durante o período de exposição os sistemas-teste foram mantidos em câmara incubadora ajustada para 25 ± 2ºC com fotoperíodo controlado (16h/8h claro/escuro) até seu encerramento. Segundo a Norma ABNT NBR 15350/2006, o encerramento dos testes deverá ocorrer após 24 a 28 h, quando pelo menos 80% dos organismos do tratamento controle atingir o estágio de *pluteus* bem desenvolvido, com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo da larva nas amostras controle (Figura 5). Ao final dos testes adicionou-se, a todas as réplicas, 125µL de formol tamponado com bórax 10% para fixação das amostras e posterior leitura dos testes. A leitura considerou os embriões anômalos e normais, até a contagem atingir, no total, 100 larvas.

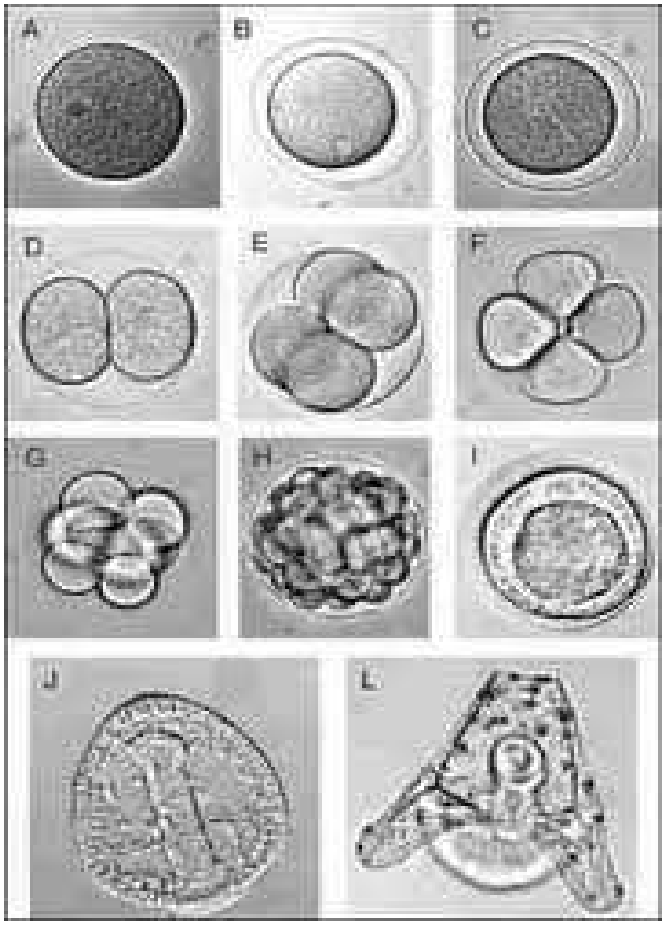


Figura 5. Desenvolvimento embriolarval de ouriços-do-mar (http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-equinodermata/ourico-do-mar-3.php)

3.3. ENSAIOS DE TOXICIDADE COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Os ensaios com substâncias de referência avaliam a sensibilidade relativa da população dos organismos que se pretende usar para estudar toxicidade de substâncias-testes, dando assim precisão e confiabilidade aos dados produzidos nos ensaios de toxicidade. Para a avaliação da sensibilidade os organismos foram expostos à substância de referência sulfato de zinco heptaidratado ($ZnSO_4.7H_2O$).

Os ensaios de sensibilidade ocorreram conforme as condições do ensaio definitivo para o *L. variegatus* e náuplios de *Nitocra* sp. As concentrações de zinco heptaidratado para *L. variegatus* foram 0,02; 0,06; 0,1; 0,14; 0,18 e 0,22mg L^{-1}, enquanto que as concentrações para os ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. foram 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5mg L^{-1}. Os testes foram realizados sempre que na coleta um novo lote de organismos *L. variegatus* e, no caso do *Nitocra* sp., os testes de sensibilidade foram realizados mensalmente.

Para a elaboração das cartas-controles de sensibilidade a substância de referência para ambos os organismos foram calculados a média da CL50 (concentração letal em 50% dos organismos) com no mínimo de 5 ensaios (n=5). A partir das médias de CL50 foi calculado os limites superior e inferior (± 2 vezes o desvio padrão) e considerado válido os ensaios que estivessem dentro dos limites (ABNT, 2012).

3.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CONTROLE DE QUALIDADE DOS TESTES

Análises físico-químicas (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, amônia não-ionizada) foram realizadas nas amostras de água intersticial no início e no final dos testes, a fim de verificar se as condições de teste permaneceram dentro dos padrões mínimos aceitáveis para os náuplios de *Nitocra* sp. e para o *Lytechinus variegatus*, segundo ABNT NBR 15350/2012 (ABNT, 2012). A amônia não ionizada foi quantificada através do eletrodo de verificação de amônia logo após a obtenção da água intersticial.

3.5. SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE AOS REAGENTES DE AIT

Definidas as condições do ensaio com náuplios de *Nitocra* sp (tempo de exposição mais adequado) e atestada a viabilidade de se realizar estes ensaios com volume de meio

experimental de 2,5mL, procedeu-se à avaliação da sensibilidade dos organismos-teste (*L. variegatus* e *Nitocra* sp) para os reagentes utilizados em esquemas de AIT. Foram realizados 3 ensaios (n=3) para cada reagente da AIT a fim de se obter um N amostral para aplicação das analises estatísticas.

3.5.1. EDTA

A adição de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) teve como objetivo a manipulação da toxicidade de metais. Consiste em um agente quelante orgânico que se complexa a metais, removendo-os da fase dissolvida (óxidos ou sulfeto na forma de grânulos). A série inicial de concentrações foi de 3,75; 7,50; 15,00; 30,00; 60,00mg L^{-1} e um controle, para ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. e *L. variegatus*, elaborada a partir de dados de sensibilidade de diversos organismos marinhos apresentados em USEPA (2007).

3.5.2. TIOSSULFATO DE SÓDIO ($Na_2S_2O_3$)

O tiossulfato de sódio nas manipulações do AIT teve como propósito a redução da toxicidade de substâncias oxidantes, como o cloro utilizado no processo de cloração como pré-tratamento dos efluentes. Pode também alterar a toxicidade de alguns metais catiônicos. Neste ensaio a série inicial de concentrações para os ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. foi de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8g L^{-1} e um controle, e para os ensaios com *L. variegatus* foi de 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2g L^{-1} e um controle, a partir de dados de sensibilidade de diversos organismos marinhos apresentados em USEPA (2007).

3.5.3. METANOL

O metanol é utilizado na ativação e eluição da coluna de extração (SPE)-C18 em fase sólida. Colunas SPE C18 são designadas para remover compostos neutros apolares das amostras, incluindo HPAs, PCBs e alguns pesticidas. A manipulação envolvendo esta coluna pode envolver dois passos no esquema de AIT: (i) avaliação da possível redução da toxicidade da amostra após passar pela SPE C18 (e, portanto ter removido compostos

orgânicos apolares); (ii) eluição da coluna SPE C18 com metanol e teste de toxicidade do metanol eluente para confirmar a presença de substâncias orgânicas apolares.

Para este segundo procedimento, é necessário conhecer a toxicidade do metanol. A série inicial de concentrações será de 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5% e um controle, para ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. e *L. variegatus*, elaborada a partir de dados de sensibilidade de diversos organismos marinhos apresentados em USEPA (2007).

O diagrama a seguir (Figura 6) ilustra o esquema de avaliação da sensibilidade dos organismos-teste às manipulações da AIT.

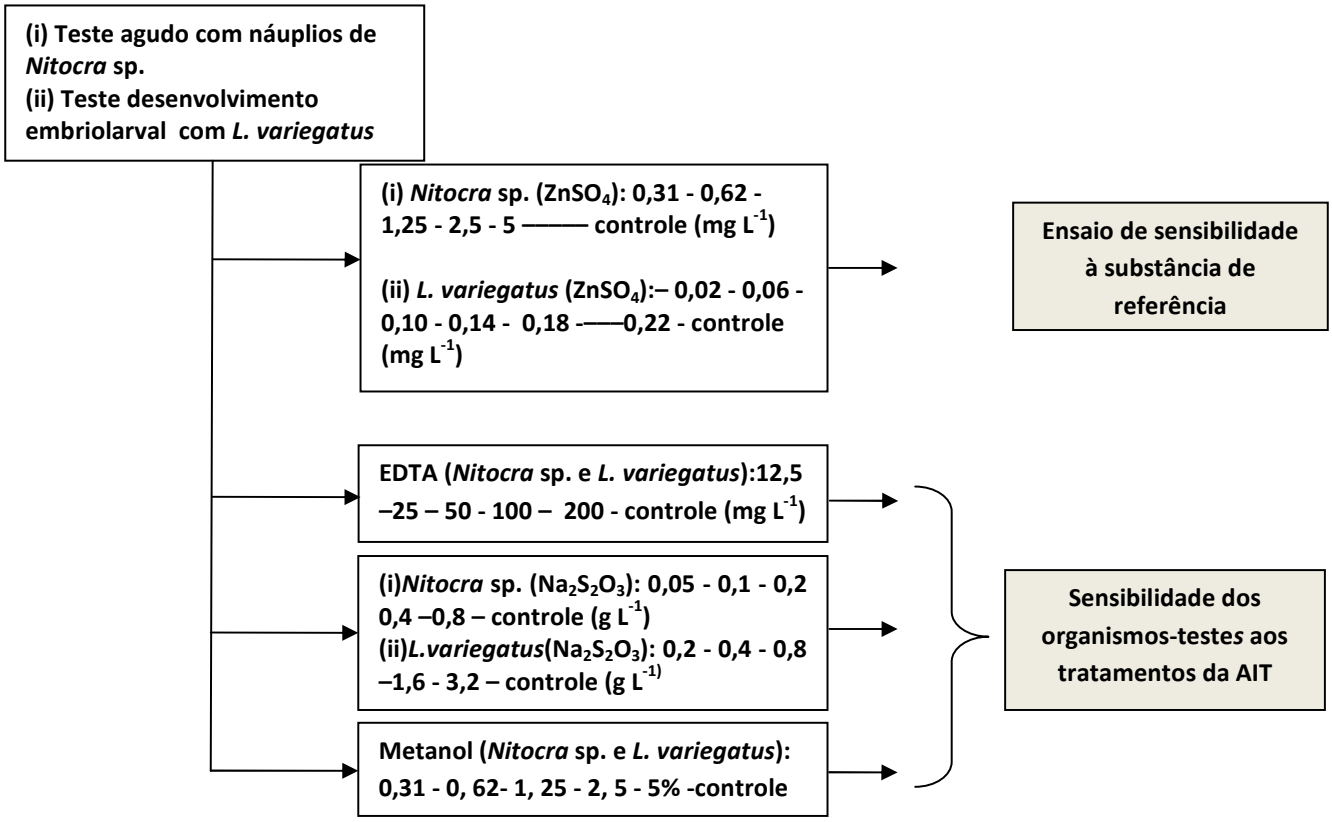


Figura 6. Esquema de avaliação da sensibilidade dos organismos-teste às manipulações da AIT.

3.6. ÁREA DE ESTUDO, COLETA, ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

O Sistema Estuarino de Santos (23º30'5'' a 24º Sul; 46º05' a 46º30' Oeste) é uma ampla região de canais estuarinos envolvidos por ecossistemas manguezais que abriga 43% de toda área de manguezal do estado de São Paulo (LAMPARELLI et al, 2001). Nesta área também se encontra o maior porto da América Latina, o Porto de Santos; além

disso, sua proximidade com a região metropolitana de São Paulo levou à implantação, a partir da década de 1950, de indústrias de base, como, por exemplo, metalúrgicas, petroquímicas e de fertilizantes. Para este estudo, foram selecionadas duas estações para a coleta de sedimentos (Figura 7); (i) a primeira, situada próxima à saída dos difusores do emissário submarino de Santos, (ii) e a segunda, localizada na Praia de São Lourenço, local sob influência estuarina mas afastado da área de maior concentração urbana do município de Bertioga. Apesar deste ponto se localizar próximo a uma urbanização, a administração do empreendimento declara que os efluentes passam por tratamento físico-químico e biológico (http://www.rivieradesaolourenco.com/sustentabilidade/saneamento/).

Resumidamente, os sedimentos superficiais foram coletados com o auxílio de um pegador de fundo do tipo *Van Veen*, acondicionando-os em sacos plásticos. Em laboratório, os sedimentos foram homogeneizados e mantidos a 4ºC, ao abrigo da luz (USEPA, 2001) por um período não superior a 12 semanas. Foram realizadas duas coletas de sedimentos nas duas áreas de estudo, a primeira em fevereiro de 2012, sobre o qual se realizou a AIT com náuplios de *Nitocra* sp. e a segunda em maio do mesmo ano, para realização da AIT com *L. variegatus*,

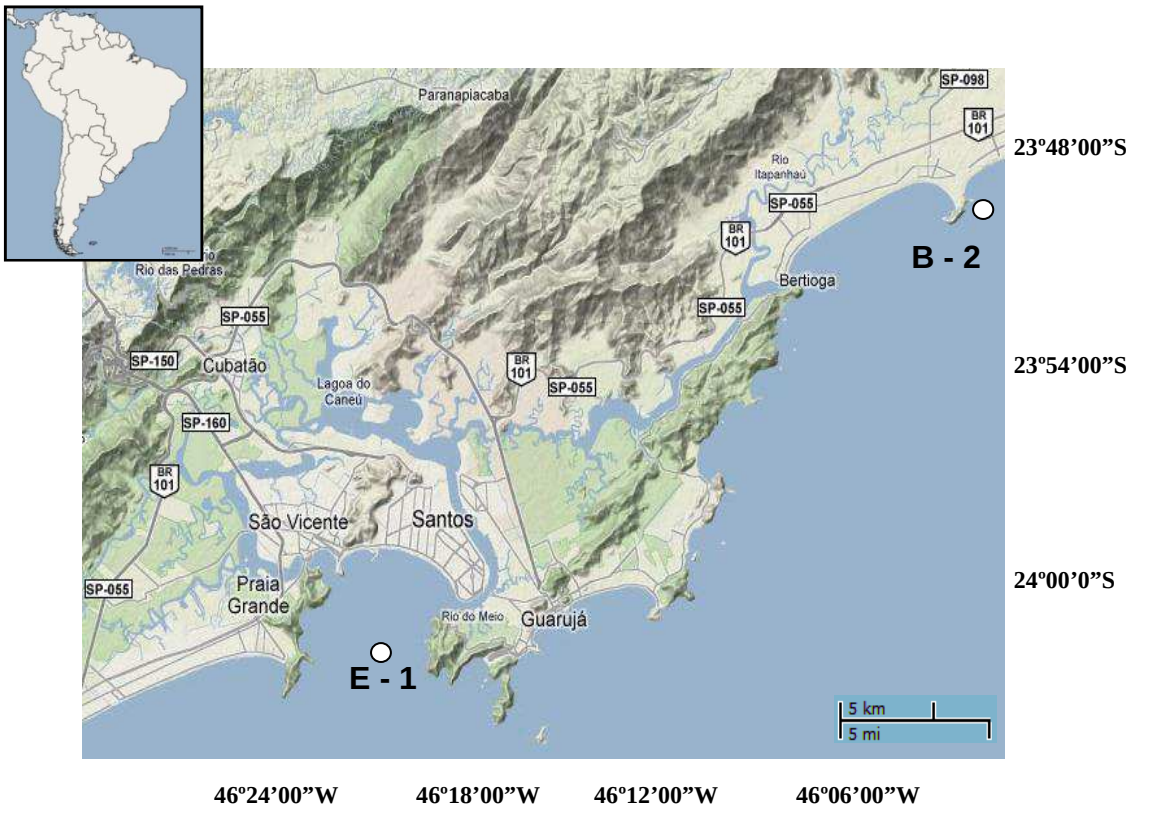


Figura 7. Localização das estações de coleta de sedimento na Baía de Santos. "E-1" corresponde ao ponto localizado próximo à saída do emissário e "B-2" representa a estação de Bertioga. Mapa gerado por i3geo (http://mapas.mms.gov.br/i3geo/)

3.7. EXTRAÇÃO DA ÁGUA INTERSTICIAL

A extração da água intersticial foi feita *ex situ*, empregando-se o método de centrifugação a 4ºC em 2500 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação as amostras de água intersticial foram armazenadas em garrafas âmbar e refrigeradas a 4ºC por no máximo 24 horas até o início das análises ecotoxicológicos e físico-químicos.

3.8. AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE – AIT

Em um primeiro momento, a chamada de "fase de caracterização", as amostras brutas de água intersticial foram submetidas aos ensaios de toxicidade, para se obter seu nível tóxico inicial (toxicidade de linha-de-base). A água intersticial foi diluída com água de diluição[1] em uma série de diluição de 100, 50, 25, 12.5%, e testadas para obtenção da CL50 (concentração do agente tóxico que causa efeito letal a 50% dos organismos-teste). Em caso de sedimentos extremamente tóxicos (CE50<12.5%), para se evitar que a capacidade de alteração da toxicidade das manipulações seja suplantada pela toxicidade inicial, se considerou a diluição de 4 vezes a CE50 como a mais alta concentração de água intersticial a ser utilizada para a realização da Fase I da AIT. Neste caso, a série de diluição foi feita a partir da maior concentração, usando uma razão de diluição de 0.5 (ex.: 4x, 2x, 1x, 0.5x a CE50 obtida no ensaio de linha-de-base). Para todos os testes, um tratamento controle da água de diluição e outro tratamento controle de manipulação (água de diluição submetida aos mesmos tratamentos realizados para amostras de água intersticial) foram realizados concomitantemente com os ensaios.

3.8.1. ADIÇÃO DE EDTA

A manipulação para extração de metais foi realizada através de adição de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), um forte agente quelante com diversos metais. Para os ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. e *L. variegatus*, a concentração final de EDTA foi estabelecida através de testes de tolerância da espécie ao composto. Para os ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. foi adicionado 40µl a partir da solução estoque com concentração de 10000mg L^{-1} de EDTA em cada concentração das amostras (10mL). Já para o *L.*

[1]Ao longo do texto onde for utilizado o termo "água de diluição", se faz referência à água reconstituída de salinidade 30 preparada em laboratório com sal natural marinho Pro Coral Red Sea®.

Variegatus foi adicionado 50µl a partir da mesma solução estoque. Após a adição do EDTA respeitou-se um período minimo de 3 horas para a interação entre o quelante e os metais, para então início dos testes de toxicidade.

3.8.2. COLUNA SPE C18

Colunas SPE C18 são designadas para remover compostos neutros apolares, incluindo HPAs, PCBs e alguns pesticidas. O método para seu emprego em AIT de sedimentos pode ser conceitualmente similar ao desenvolvido para AIT de efluentes. Primeiramente, antes da passagem da amostra através da coluna, condicionou a coluna com metanol (20 mL) e água (15 mL) (USEPA, 1991). O passo seguinte foi a passagem da amostra através da coluna SPE C18 (5mL min^{-1} para a coluna padrão de 6 mL) (RACHID, 2002) e coletou-se a alíquota pós-coluna para os testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* e náuplios de *Nitocra sp*.

3.8.3. MANIPULAÇÕES DE pH E AERAÇÃO

As manipulações utilizando diferentes pH seguidos de aeração são utilizadas considerando que substâncias potencialmente tóxicas nas amostras de água intersticial possuem volatilidade variável com alterações no pH. Especificamente, esta manipulação busca remover amônia (volatilidade maior em pH básico) e sulfetos (maior volatilidade em pH ácido) da água intersticial. Alíquotas das amostras, tiveram seus valores de pH modificados para valores extremos através da adição de HCl (pH final = 2,0) e NaOH (pH final =12,0) e em seguida aerados por um período de tempo padronizado (ex.: t=30min). Após a aeração da amostra sob pHs extremos, o pH foi ser acertado para o valor inicial e a amostra testada quanto à sua toxicidade. Em paralelo foi realizado o mesmo tratamento com água de diluição, uma vez que as manipulações de pH podem promover toxicidade adicional às amostras. A Figura 8 sumariza os procedimentos propostos para o protocolo de AIT fase I, no escopo desta proposta.

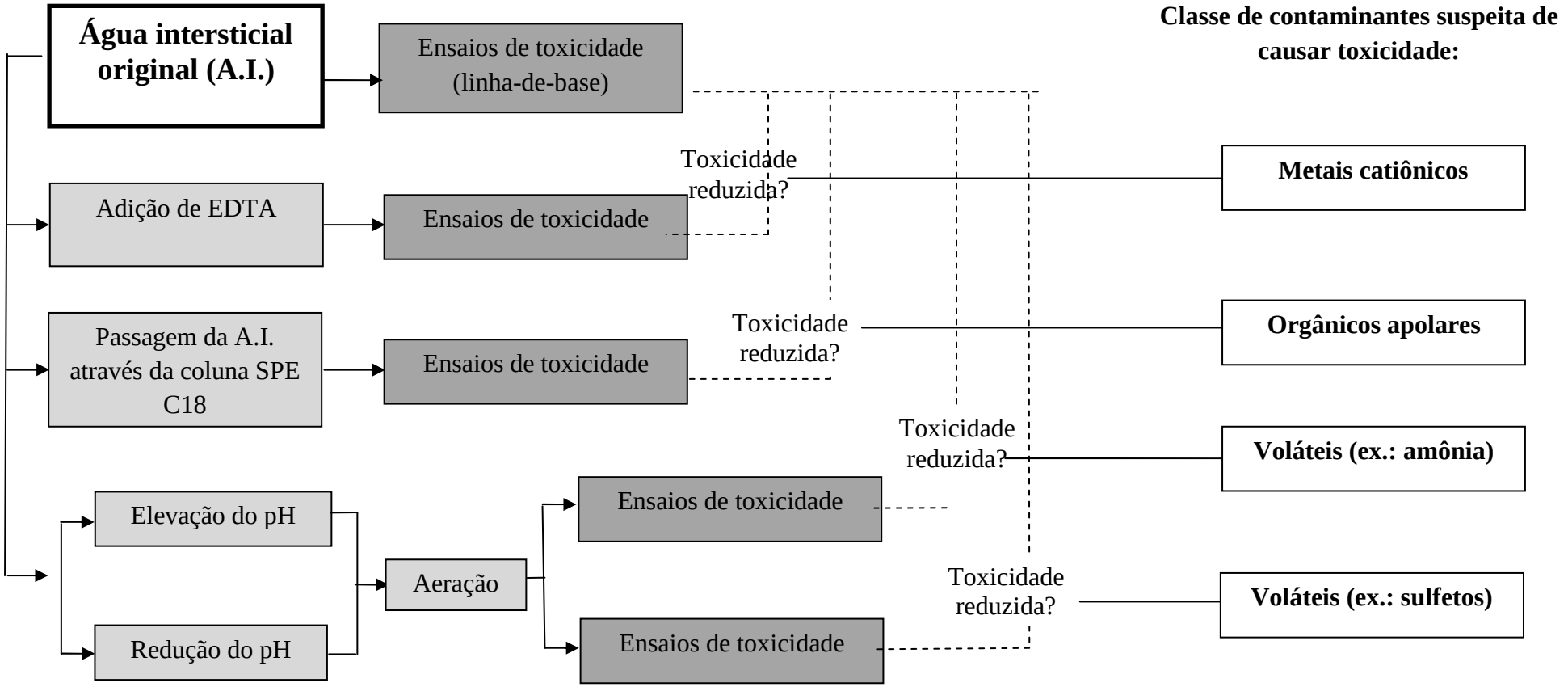


Figura 8. Diagrama esquemático mostrando as manipulações que foram realizadas e quais os contaminantes suspeitos em caso de redução da toxicidade.

3.9. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CONTROLE DE QUALIDADE DOS TESTES

Análises físico-químicas (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, amônia não-ionizada) foram realizadas nas amostras de água intersticial no início e no final dos testes, a fim de verificar se as condições de teste permaneceram dentro dos padrões mínimos aceitáveis para os náuplios de *Nitocra* sp. e *Lytechinus variegatus*, segundo ABNT NBR 15350/2006. A amônia não ionizada foi quantificada através do eletrodo de verificação de amônia logo após a obtenção da água intersticial.

3.10. CARACTERIZAÇÃO DOS SEDIMENTOS

Para melhor interpretação da toxicidade e da relação entre os resultados obtidos em laboratório e o cenário de exposição, os sedimentos foram caracterizados quanto à sua granulometria, seguindo a norma UNE 103-101 (1995) e conteúdo de carbono orgânico total através do método de titulação baseado na oxidação do carbono orgânico a CO_2 utilizando dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

3.11. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados dos ensaios de toxicidade foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade (qui-quadrado). A toxicidade inicial das amostras de água intersticial e concentração de substância de referência que causam efeito para 50% dos organismos testados (CE50 da água intersticial e substância de referência) foram estimadas através do método Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et al., 1977). Análises de Variância (ANOVA, pós-teste de Dunnet) foram utilizadas para se identificar a concentração de efeito não observado (CENO) nos ensaios de sensibilidade dos organismos aos reagentes da AIT, assim como para se determinar a redução da toxicidade após as manipulações de AIT, comparando-se a resposta média dos organismos nos ensaios realizados antes da manipulação e após cada manipulação da AIT, para cada diluição utilizada. Para todos os testes estatísticos, foi utilizado um $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS – TESTE

Ao longo deste estudo, a $CE50_{48h}$ dos náuplios de *Nitocra* sp. (n=6) para $ZnSO_4.7H_2O$ variou entre 0,44 e 0,78 mg L^{-1}(Figura 9a), enquanto que a $CE50_{24h}$ dos embriões de *L. variegatus* (n=8) variou entre 0,10 e 0,22 mg L^{-1} (Figura 9b). Os ensaios de ambos os organismos estiveram dentro dos limites superiores e inferiores.

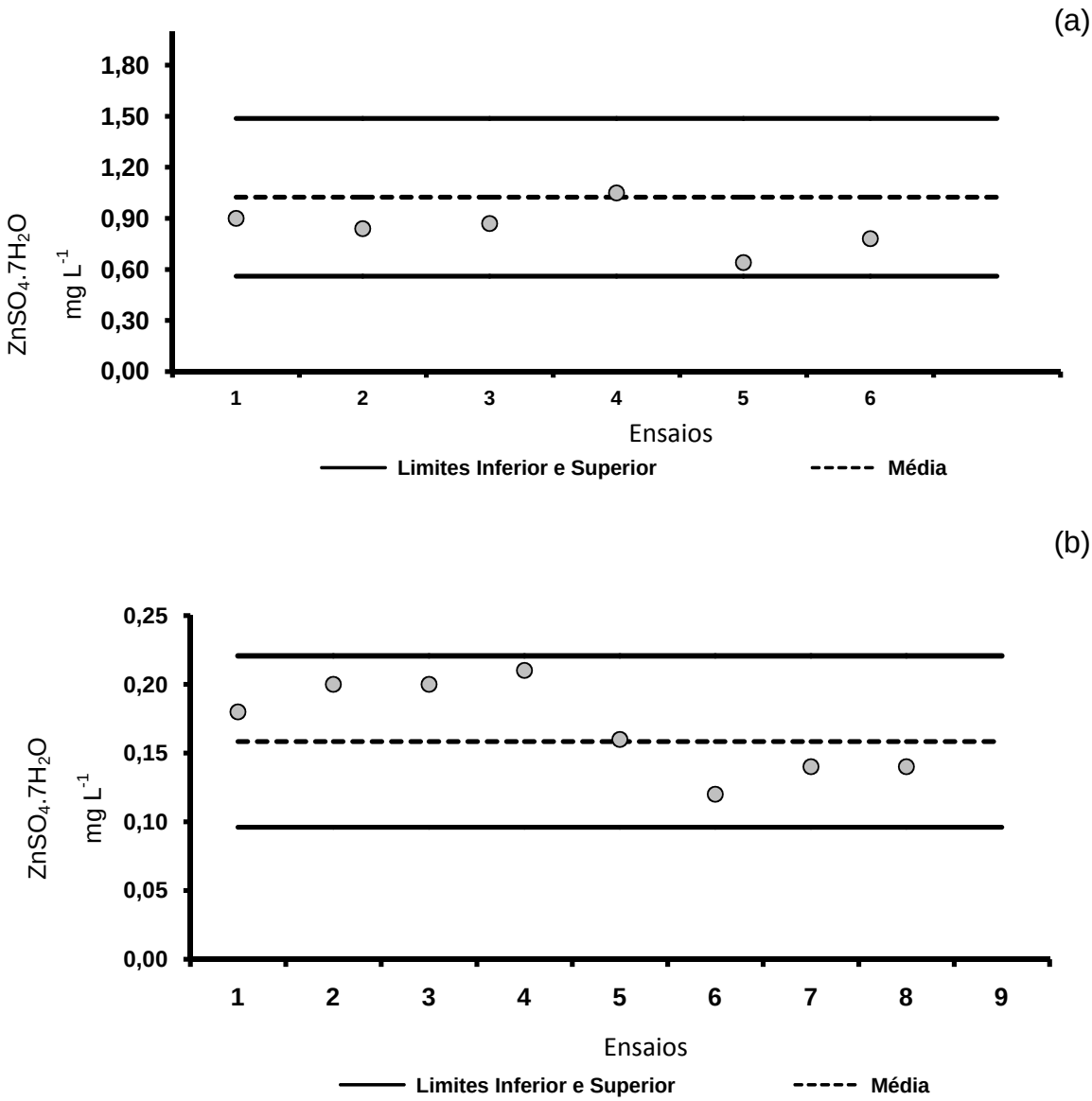


Figura 9. Carta controle dos organismos-teste (a) *Nitocra* sp. e (b) *L. variegatus* para $ZnSO_4.7H_2O$.

4.2. DEFINIÇÃO DO MELHOR TEMPO DE EXPOSIÇÃO E VOLUME DE MEIO EXPERIMENTAL PARA ENSAIOS COM NÁUPLIOS DE *Nitocra* sp.

Os ensaios com náuplios de *Nitocra* sp. de 72h e 96h não apresentaram resultados médios aceitáveis no controle (>70% sobrevivência) (Tabela 1). No entanto, os ensaios de 24h e 48h de exposição mostraram-se adequados, estabelecendo-se, para esquemas de AIT, o tempo de 48h de exposição como o mais adequado (maior tempo de exposição com resultados aceitáveis no controle) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados médios e desvios-padrão de sobrevivência do organismo-teste náuplio de *Nitocra* sp. nos ensaios de sensibilidade com substância de referência sulfato de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$) até 72h e 96h.

Ensaio de sensibilidade com sulfato de zinco com o organismo-teste *Nitocra* sp exposto em 72h.					**96 h**
[ ]	**Ensaio 1**	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**	**Ensaio 4**	**Ensaio 1**
C	6,25 ± 1,71	6,66 ± 1,15	5,75 ± 1,50	7,25 ± 0,96	5,2 5 ± 2,50
0,31	5 ± 1,83	4,5 ± 1,29	4,5 ± 1,29	4,5 ± 0,58	4,25 ± 2, 22
0,62	2,25 ± 0,50	3,5 ± 1,29	3,5 ± 1,29	5 ± 0,82	1,25 ± 1 ,25
1,25	0 ± 0	3,5 ± 1,29	3,5 ± 1,29	1,75 ± 1,71	0 ± 0
2,5	0 ± 0	1 ± 0,82	1 ± 0,82	0,5 ± 0,58	0 ± 0
5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Não foram observadas diferenças significativas na CE50 de $ZnSO_4$ heptaidratado para os diferentes volumes de meio experimental testados (10 e 2,5 mL) (ANOVA, $p<0,05$), sendo portanto utilizado, para o restante do trabalho, o menor volume (Tabela 2 e Figura 10).

Tabela 2. Resultados médios e desvios-padrão de sobrevivência do organismo-teste *Nitocra* sp. nos ensaios de comparação de diferentes volumes de meio experimental (10 mL e 2,5 mL) utilizando a substância de referência sulfato de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$) (sobrevivência).

	Ensaios com diferentes volumes					
Concentrações (mg L^{-1})	**Ensaio 1 - 10mL**	**Ensaio 2 - 10mL**	**Ensaio 3 - 10mL**	**Ensaio 1 - 2,5mL**	**Ensaio 2 - 2,5mL**	**Ensaio 3- 2,5mL**
Controle	7,75 ± 0,5	7,5 ± 0,58	7 ± 0,82	7 ± 0,82	7,75 ± 0,5	8 ± 1,16
0,31	6,5 ± 0,58	6,75 ± 0,5	5,5 ±0,58	6 ±0,82	6,5 ±0,58	6,25 ±1,71
0,62	5,25 ±0,5	6 ±0,82	5,25 ± 0,96	5,5± 1,3	5,5±0,58	4,5± 1,92
1,25	5,5 ± 1	5,5 ±0,58	4 ±0,82	4,25 ±0,5	4,75 ±0,5	3,5 ± 0,58
2,50	2 ± 0,82	3,5 ±0,58	2 ± 0,82	1,25 ±0,5	3±0,82	0,75 ± 0,96
5,00	0	0	0	0	0	0

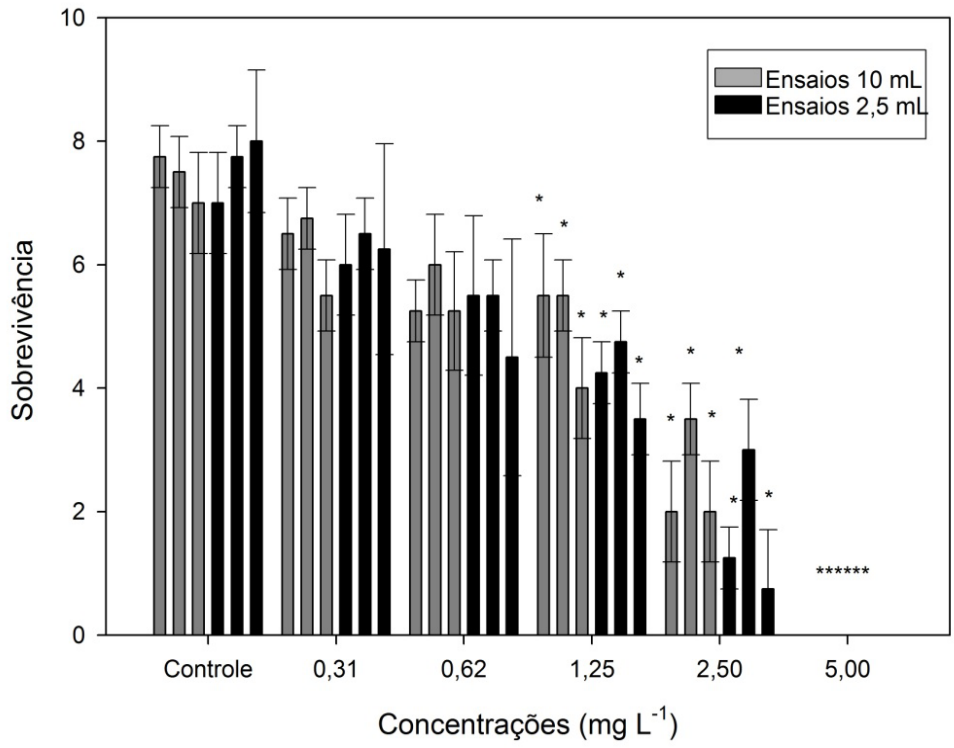


Figura 10. Ensaios de comparação de diferentes volumes de meio experimental (10 ml (barras cinza escuro) e 2,5 ml (barras cinza claro)) utilizando a substância de referência $ZnSO_4.7H_2O$. As barras de erro representam o desvio-padrão e os asteriscos representam as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$).

4.3. SENSIBILIDADE DO *Nitocra* sp. AOS REAGENTES DE AIT

Os valores de CENO obtidos nos ensaios com EDTA foram de 25mg L^{-1} (ANOVA, p>0.05), conforme apresentado na figura 11 (Figura 11). O reagente tiossulfato de sódio apresentou valores de CENO variáveis(entre 0,05 e 0,10g L^{-1}) (p>0,05) para o *Nitocra* sp. conforme demonstrado na figura 12 (Figura 12). O metanol apresentou toxicidade significativa (p<0,05) já na mais baixa concentração (0,31%) testada, não sendo possível a identificação da CENO (Figura 13).

Tabela 3. Resultados médios e desvios-padrão de sobrevivência do organismo-teste *Nitocra* sp. ao reagente EDTA.

Sensibilidade do organismo teste *Nitocra* sp. ao EDTA			
Concentrações mg L^{-1}	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Controle	7,00 ± 0,82	7,25 ± 0,96	9,25 ± 0,96
12,50	6,75 ± 0,50	6,50 ± 0,58	7,50 ±0,58
25,00	5,75 ± 0,50	6,25 ± 0,50	8,25 ± 1,26
50,00	4,75 ± 0,96	4,75 ± 0,50	5,25 ± 1,50
100,00	3,25 ± 0,96	3,50 ± 0,58	5,50 ± 1,00
200,00	2,25 ±0,50	2,50 ±0,58	4,25 ± 0,96

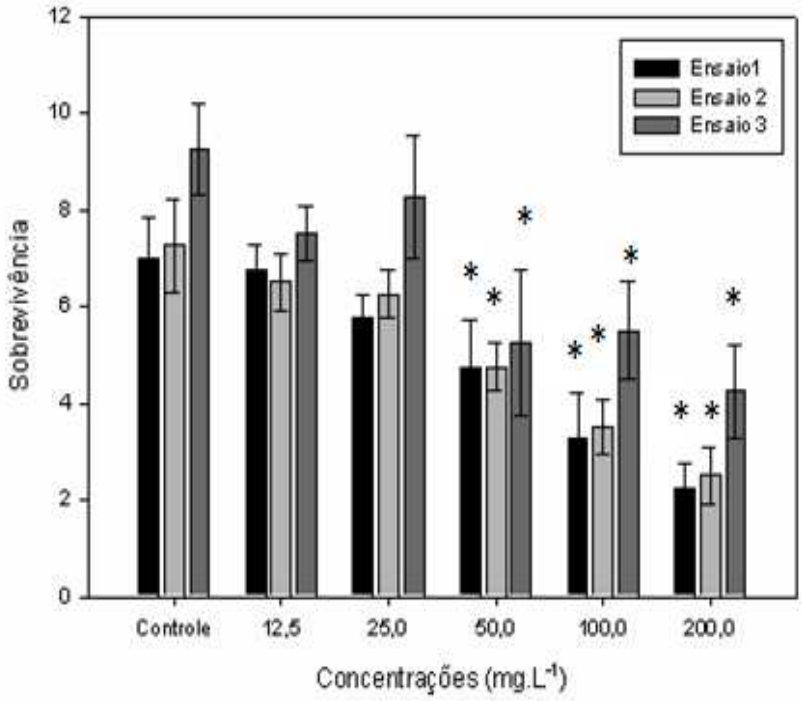


Figura 11. Sobrevivência de *Nitocra* sp. exposto a diferentes concentrações de EDTA, onde foi realizado três ensaios (barra preta (ensaio1), barra cinza clara (ensaio 2) e barra cinza escura (ensaio 3) e as barras de erro representando o desvio-padrão e os asteriscos representando as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$)..

Tabela 4. Resultados médios e desvios-padrão de sobrevivência do organismo-teste *Nitocra* sp. ao reagente tiossulfato de sódio.

Sensibilidade do organismo teste *Nitocra* sp ao tiossulfato de sódio			
Concentrações g L^{-1}	**Ensaio 1**	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**
Controle	8,25 ±1,26	6,75 ± 1,50	5,75 ± 0,96
0,05	5,00 ± 0,82	4,25 ± 2,06	4,25 ± 0,50
0,10	0,00 ± 0,00	2,00 ± 1,83	4,25 ± 0,50
0,20	1,75 ± 1,71	1,00 ± 0,82	3,25 ± 0,50
0,40	0,25 ± 0,50	0,00 ± 0,00	3,25 ± 0,96
0,80	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,75 ± 1,50

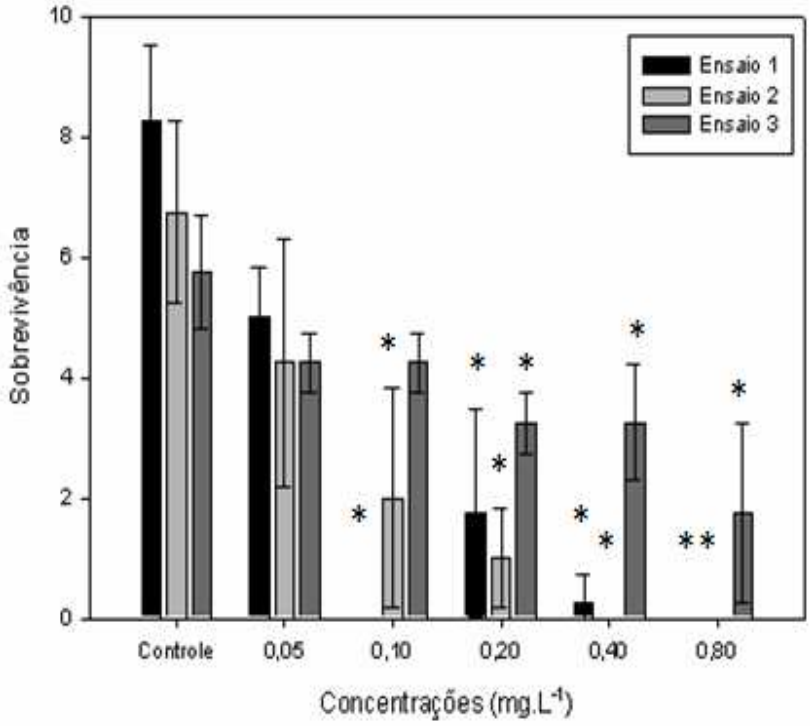


Figura 12. Sobrevivência de *Nitocra* sp. exposto a diferentes concentrações de tiossulfato de sódio, onde foi realizado três ensaios (barra preta (ensaio1), barra cinza clara (ensaio 2) e barra cinza escura (ensaio 3) e as barras de erro representando o desvio-padrão e os asteriscos representando as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$).

Tabela 5. Resultados médios e desvios-padrão de sobrevivência do organismo-teste *Nitocra* sp. ao reagente metanol.

Sensibilidade do organismo teste *Nitocra* sp ao metanol			
Concentrações %	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Controle	8,00 ± 0,82	7,50 ± 0,58	8,00 ± 0,82
0,31	9,00 ± 0,82	6,75 ± 1,26	6,00 ± 0,82
0,62	6,50 ± 0,58	5,25 ± 0,50	5,25 ± 0,50
1,25	7,25 ± 1,50	3,75 ± 0,50	4,25 ± 0,50
2,50	6,25 ± 0,96	1,00 ± 0,82	1,50 ±0,58
5,00	3,00 ± 0,82	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

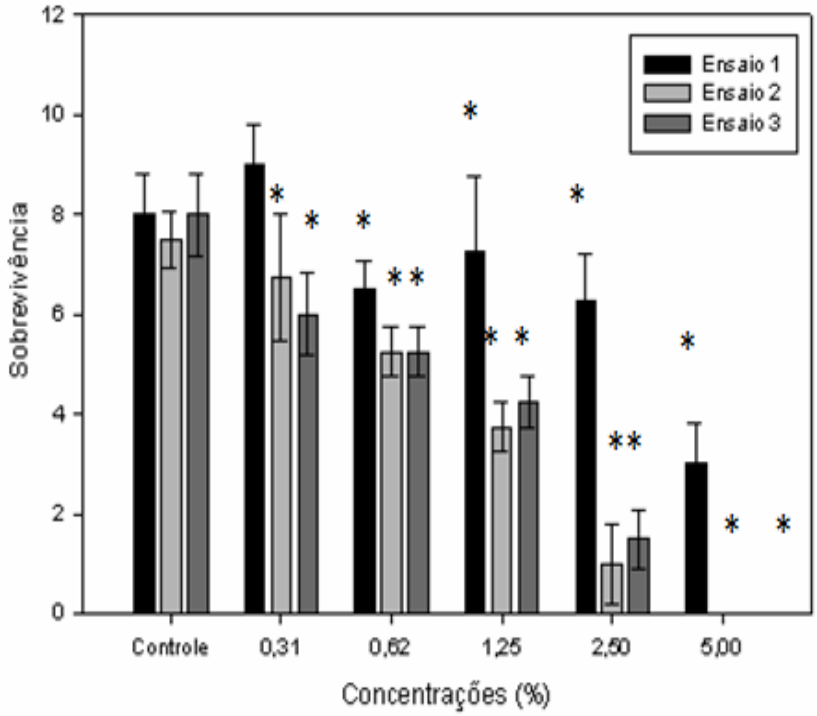


Figura 13. Sobrevivência de *Nitocra* sp. exposto a diferentes concentrações de metanol, onde foi realizado três ensaios (barra preta (ensaio1), barra cinza clara (ensaio 2) e barra cinza escura (ensaio 3) e as barras de erro representando o desvio-padrão e os asteriscos representando as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$).

4.4. SENSIBILIDADE DO *L. variegatus* AOS REAGENTES DE AIT

A exposição do organismo-teste ao reagente EDTA apresentou CENO de 25 mg L^{-1}(ANOVA, $p<0,05$), conforme apresentado na figura 14 (Figura 14), enquanto que para o metanol a CENO foi de 0,31% (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 15). Já os resultados da toxicidade do reagente tiossulfato de sódio, em sua maioria, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, mesmo para as mais altas concentrações testadas ($p>0,05$). A CENO, portanto foi estabelecida em 3,2 g L^{-1} (Figura 16).

Tabela 6. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de sensibilidade do organismo-teste *L. variegatus* ao reagente EDTA (% de desenvolvimento normal).

Sensibilidade do organismo teste *L. variegatus* ao EDTA				
Concentrações mg L^{-1}		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Controle		85,50 ± 2,52	90,50 ± 3,87	93,00 ± 2,94
12,50		76,50 ± 7,14	87,50 ± 3,51	89,75 ± 1,26
25,00		75,75 ± 2,99	83,25 ±4,11	89,75 ± 1,26
50,00		69,50 ± 3,11	83,00 ± 5,60	86,25 ± 2,06
100,00		54,50 ± 10,47	72,25 ± 3,20	66,50 ± 14,06
200,00	36,00 ± 6,58	22,00 ± 7,35	31,75 ± 21,93	

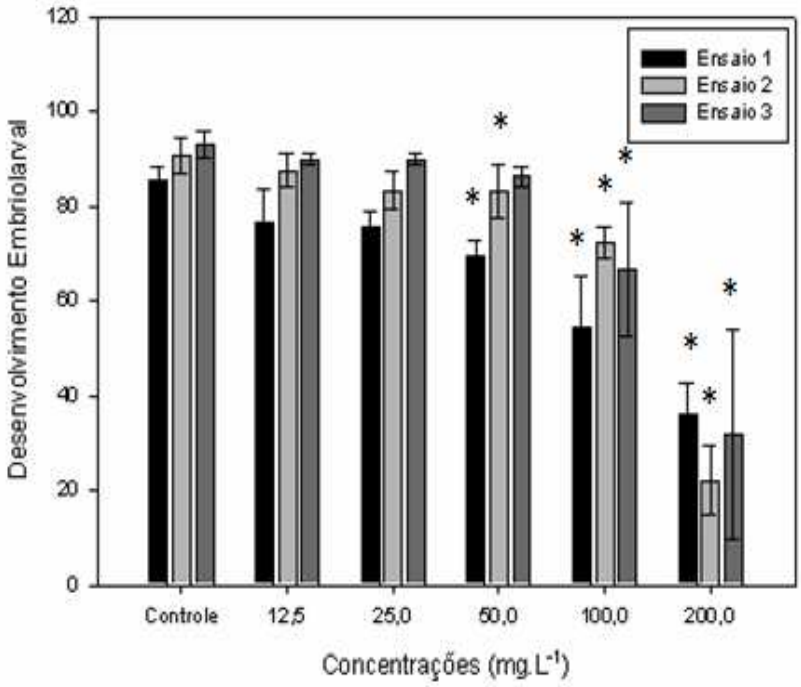


Figura 14. Sobrevivência de *L. variegatus* exposto a diferentes concentrações de EDTA, onde foi realizado três ensaios (barra preta (ensaio1), barra cinza clara (ensaio 2) e barra cinza escura (ensaio 3) e as barras de erro representando o desvio-padrão e os asteriscos representando as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$).

Tabela 7. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de sensibilidade do organismo-teste *L. variegatus* ao reagente tiossulfato de sódio (% de desenvolvimento normal).

Sensibilidade do organismo teste *L. variegatus* ao tiossulfato de sódio			
Concentrações g L^{-1}	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Controle	92,00 ± 2,16	93,25 ± 2,50	90,25 ± 1,71
0,20	89,75 ± 0,96	90,50 ± 4,43	86,75 ± 0,96
0,40	89,75 ± 2,06	89,25 ± 3,77	85,50 ± 0,58
0,80	86,00 ± 2,94	90,00 ± 4,32	85,00 ± 0,82
1,60	87,75 ± 2,75	88,50 ± 2,38	84,75 ± 2,63
3,20	84,25 ± 0,96	86,00 ± 3,74	84,50 ± 0,58

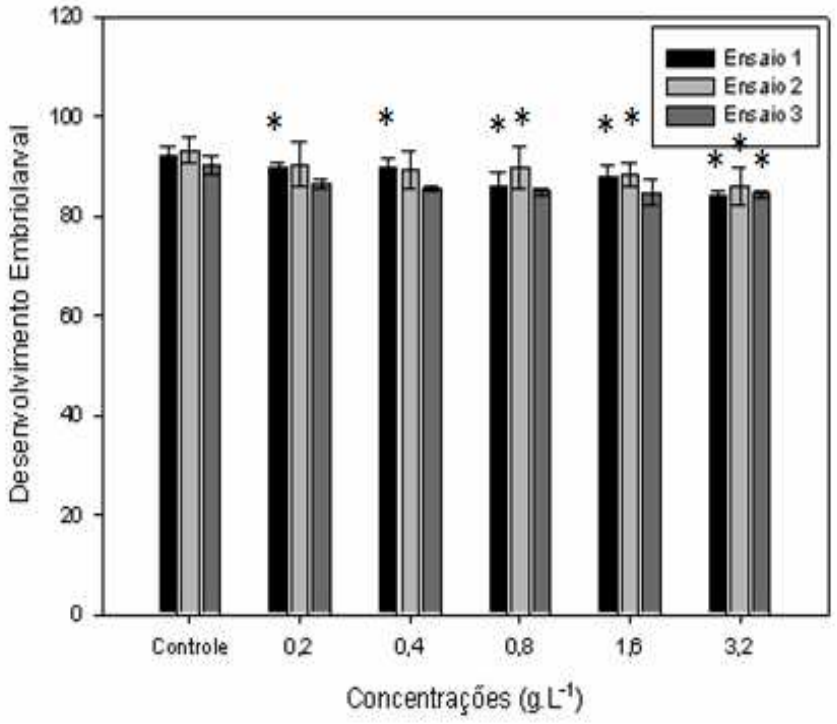


Figura 15. Sobrevivência de *L. variegatus* exposto a diferentes concentrações de tiossulfato de sódio, onde foi realizado três ensaios (barra preta (ensaio1), barra cinza clara (ensaio 2) e barra cinza escura (ensaio 3) e as barras de erro representando o desvio-padrão e os asteriscos representando as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$).

Tabela 8. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de sensibilidade do organismo-teste *L. variegatus* ao reagente metanol (% de desenvolvimento normal).

Sensibilidade do organismo teste *L. variegatus* ao metanol			
Concentrações %	**Ensaio 1**	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**
Controle	92,75 ± 1,26	94,00 ± 1,83	91,00 ± 1,41
0,31	89,25 ± 1,26	91,00 ± 2,16	90,75 ± 0,96
0,62	72,25 ± 6,60	83,00 ± 5,42	87,25 ± 0,96
1,25	20,50 ± 37,11	19,00 ± 10,03	47,25 ± 4,99
2,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

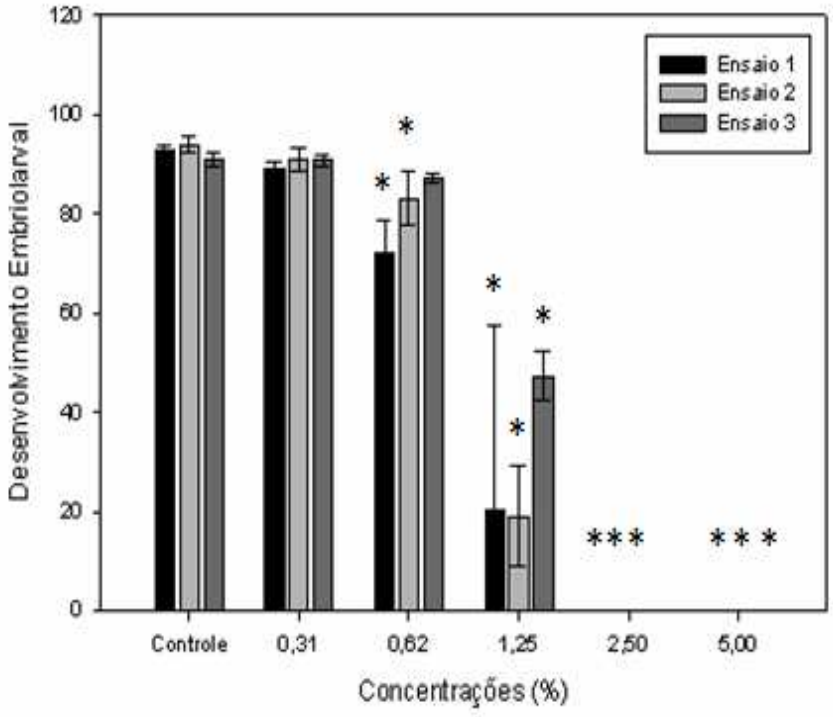


Figura 16. Sobrevivência de *L. variegatus* exposto a diferentes concentrações de metanol, onde foi realizado três ensaios (barra preta (ensaio1), barra cinza clara (ensaio 2) e barra cinza escura (ensaio 3) e as barras de erro representando o desvio-padrão e os asteriscos representando as concentrações que apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,05$).

4.5. AIT APLICADO EM ÁGUA INTERSTICIAL UTILIZANDO ENSAIO COM *Nitocra* sp.

As manipulações de AIT aplicadas na amostra de água intersticial de sedimentos do emissário submarino e sedimentos de Bertioga mostram significativa redução da toxicidade ($p<0,05$) (notadamente nas concentrações de água intersticial mais altas) após os tratamentos de: (i) aeração da amostra em pH básico; (ii) aeração da amostra em pH ácido; (iii) após tratamento da amostra em coluna C18. Para o tratamento com EDTA, apenas água intersticial dos sedimentos de Bertioga apresentaram redução significativa da toxicidade após adição do reagente ($p<0,05$), não sendo observada redução significativa da toxicidade ($p>0,05$) para a água intersticial de sedimentos do emissário de Santos. As figuras 17, 18, 19 e 20 mostram os resultados dos ensaios de toxicidade com *Nitocra* sp. antes e após as manipulações de AIT para amostras de água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos e sedimentos de Bertioga.

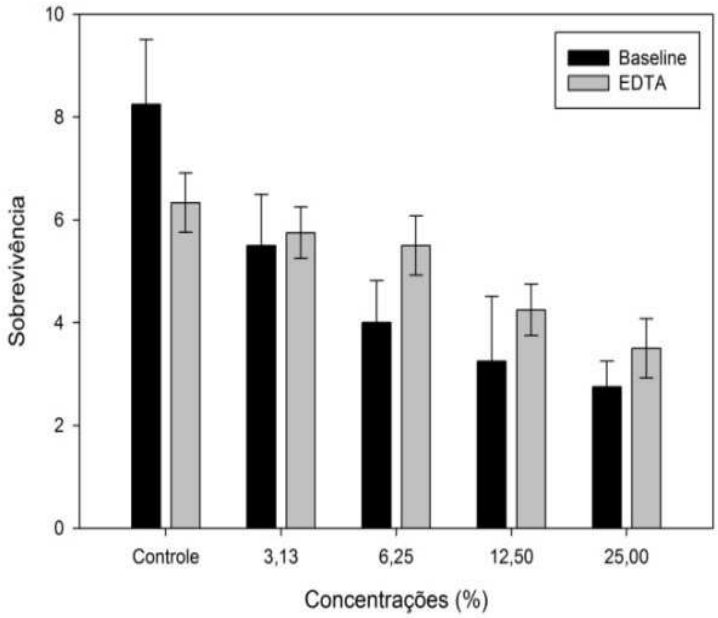
Tabela 9. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após a manipulação com EDTA com amostra do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (baseline e após a manipulação com EDTA) com *Nitocra* sp.				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**EDTA**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,25	1,25	6,33	0,57
12,50	5,50	1,00	5,75	0,50
25,00	4,00	0,81	5,50	0,57
50,00	3,25	1,25	4,25	0,50
100,00	2,75	0,50	3,50	0,57

Tabela 10. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após a manipulação com EDTA com amostra de Bertioga expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (baseline e após a manipulação com EDTA) com *Nitocra* sp.				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**EDTA**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,25	0,95	9,25	0,95
12,50	7,50	1,29	7,50	0,57
25,00	6,75	1,25	6,50	0,57
50,00	5,00	0,81	6,25	0,95
100,00	4,00	0,81	6,00	0,81

(a)


Baseline
EDTA
Sobrevivência
0
2
4
6
8
10
Controle
3,13
6,25
12,50
25,00
Concentrações (%)

(b)

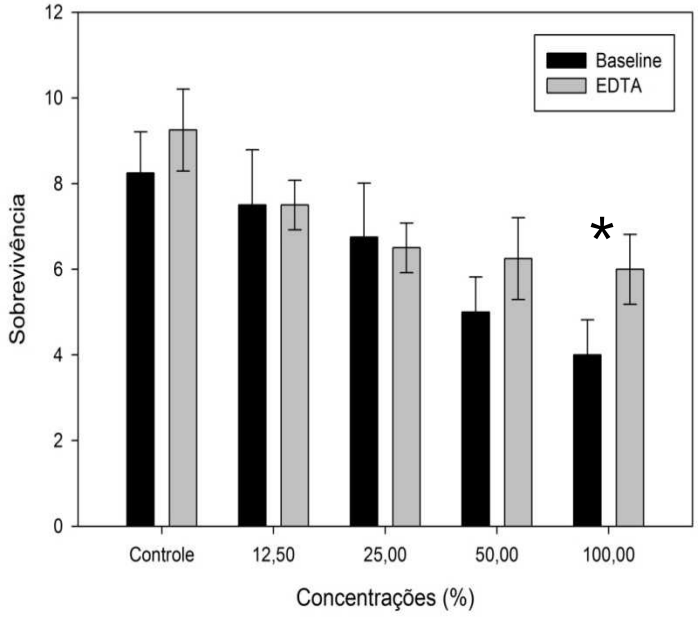

Baseline
EDTA
Sobrevivência
0
2
4
6
8
10
12
*
Controle
12,50
25,00
50,00
100,00
Concentrações (%)

Figura 17. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Nitocra* sp. antes (barras negras) e após manipulações de adição de EDTA (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Tabela 11. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após as a passagem pela C18 com amostras do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

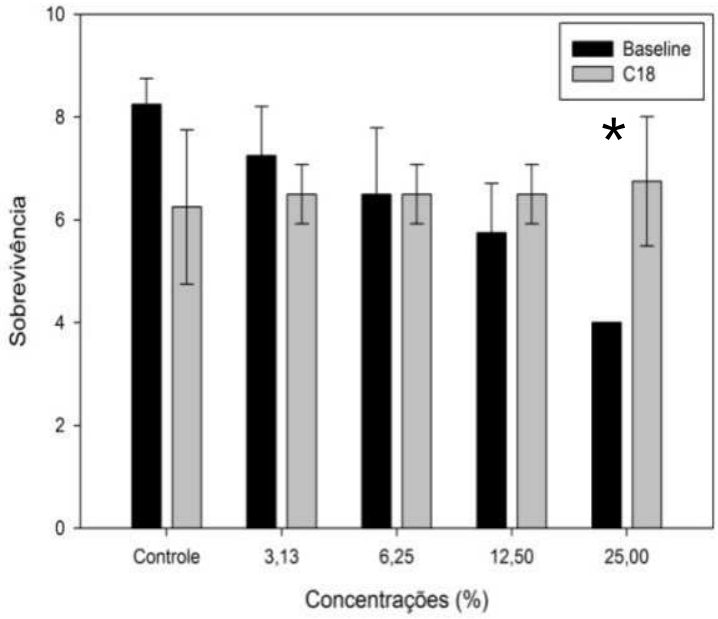
Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (baseline e após a passagem pela C 18) com *Nitocra* sp.

Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**C 18**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,25	0,50	6,25	1,50
12,50	7,25	0,95	6,50	0,57
25,00	6,50	1,29	6,50	0,57
50,00	5,75	0,95	6,50	0,57
100,00	4,00	0,00	6,75	1,25

Tabela 12. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após as a passagem pela C18 com amostras de Bertioga expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após passagem pela C 18) com *Nitocra* sp.

Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**C 18**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,75	0,95	7,75	0,50
12,50	6,75	0,50	6,66	0,57
25,00	5,50	0,57	6,50	0,57
50,00	4,50	0,57	7,00	0,81
100,00	2,75	0,50	5,50	0,57



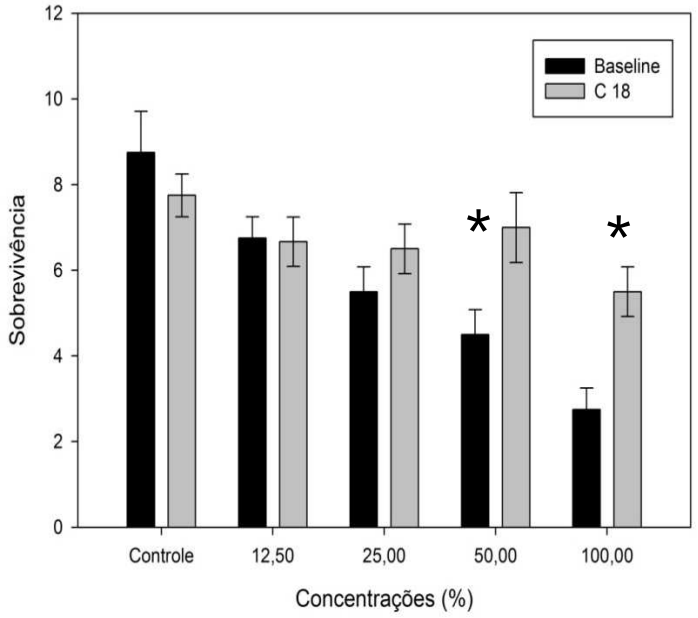


Figura 18. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Nitocra* sp. antes (barras negras) e após manipulações de eluato com C18 (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão. O

asterisco indica a concentração em que se observou diferença significativa entre a toxicidade inicial e a toxicidade após tratamento de AIT (ANOVA, p<0,05)

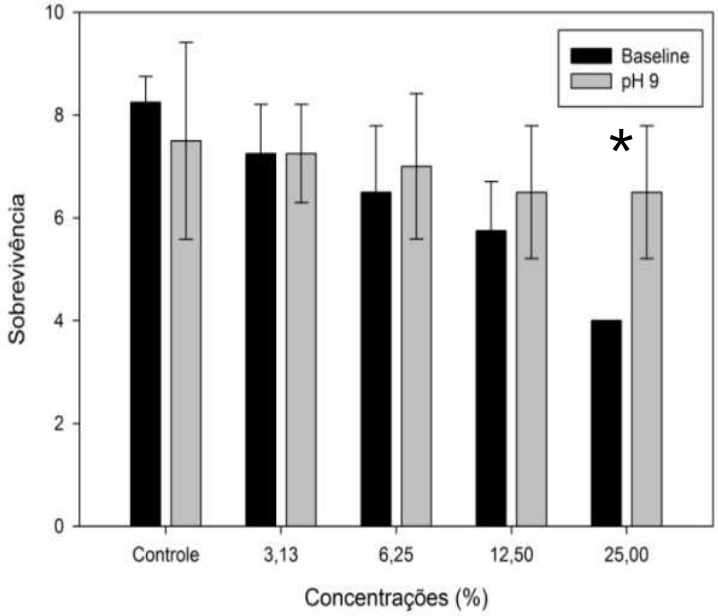
Tabela 13. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após a manipulação com pH 9 com amostras do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (Baseline e após manipulação de pH 9) com *Nitocra* sp.				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH 9**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,25	0,50	7,50	1,91
12,50	7,25	0,95	7,25	0,95
25,00	6,50	1,29	7,00	1,41
50,00	5,75	0,95	6,50	1,29
100,00	4,00	0,00	6,50	1,29

Tabela 14. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após a manipulação com pH 9 com amostras de Bertioga expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após manipulação de pH 9) com *Nitocra* sp.				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH 9**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,75	0,95	7,50	1,73
12,50	6,75	0,50	7,00	0,81
25,00	5,50	0,57	6,75	0,50
50,00	4,50	0,57	6,75	0,95
100,00	2,75	0,50	7,25	0,50

(a)



(b)

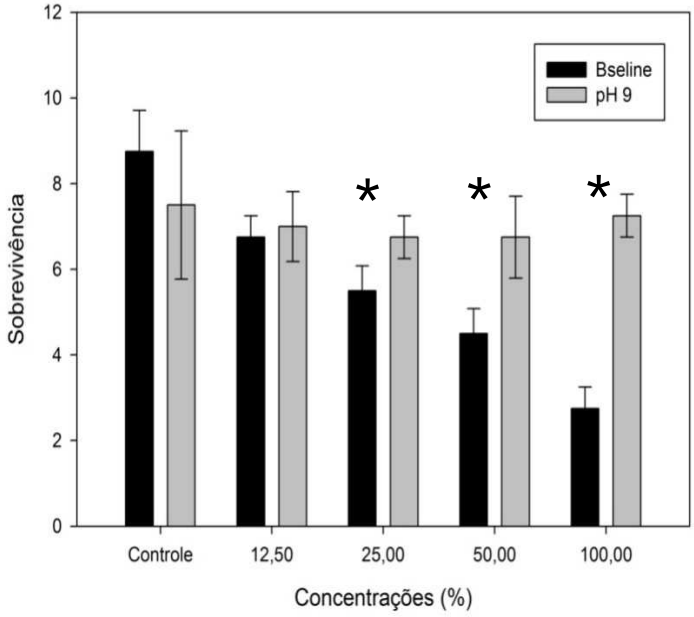


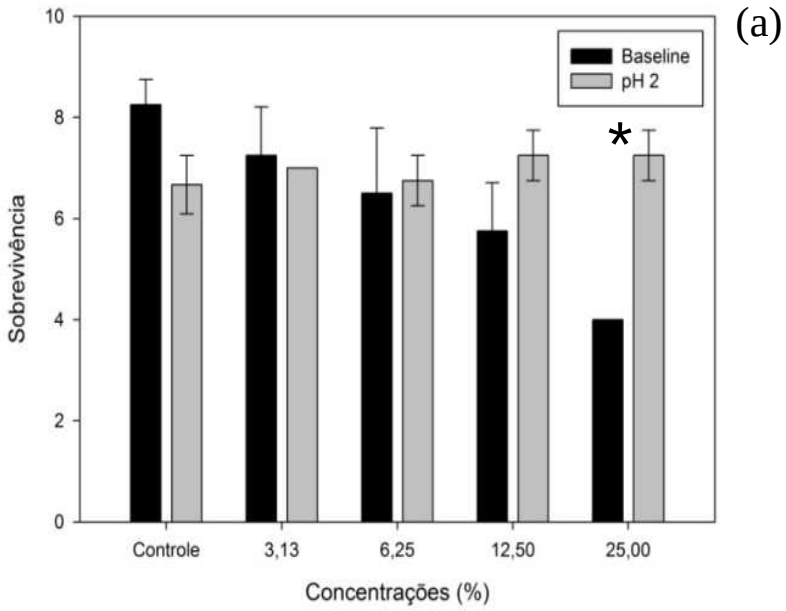
Figura 19. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Nitocra* sp. antes (barras negras) e após manipulações elevação de pH 9 (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Tabela 15. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após a manipulação com pH 2 com amostras do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (Baseline e após manipulação com pH 2) com *Nitocra* sp.				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH2**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,25	0,50	6,66	0,57
12,50	7,25	0,95	7,00	0,00
25,00	6,50	1,29	6,75	0,50
50,00	5,75	0,95	7,25	0,50
100,00	4,00	0,00	7,25	0,50

Tabela 16. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (baseline) e após a manipulação com pH 2 com amostras de Bertioga expondo o organismo-teste *Nitocra* sp (sobrevivência).

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após manipulação com pH 2) com *Nitocra* sp.				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH2**	**Desvio padrão (±)**
Controle	8,75	0,95	6,75	0,50
12,50	6,75	0,50	6,50	0,57
25,00	5,50	0,57	6,50	0,57
50,00	4,50	0,57	5,50	0,57
100,00	2,75	0,50	6,50	0,57



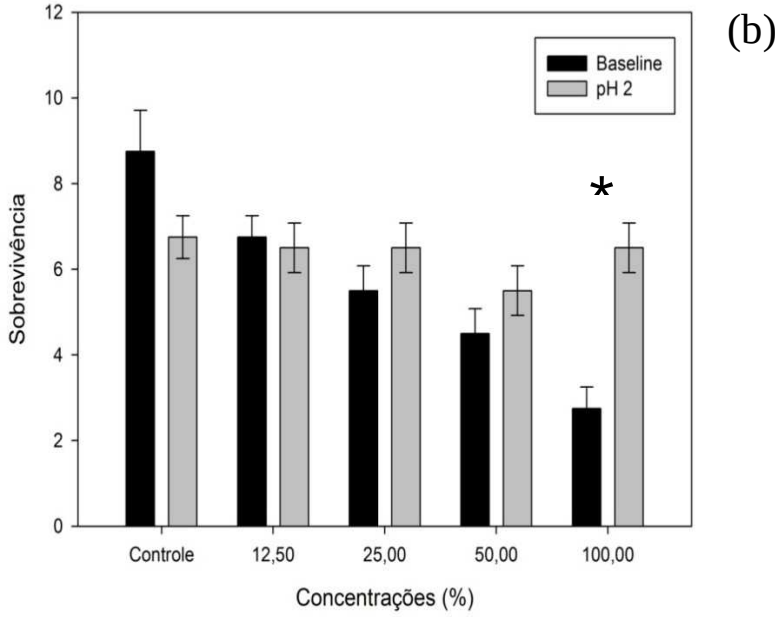


Figura 20. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Nitocra* sp. antes (barras negras) e após manipulações de redução de pH 3 (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

4.6. AIT APLICADA EM ÁGUA INTERSTICIAL UTILIZANDO ENSAIO COM *Lytechinus variegatus*

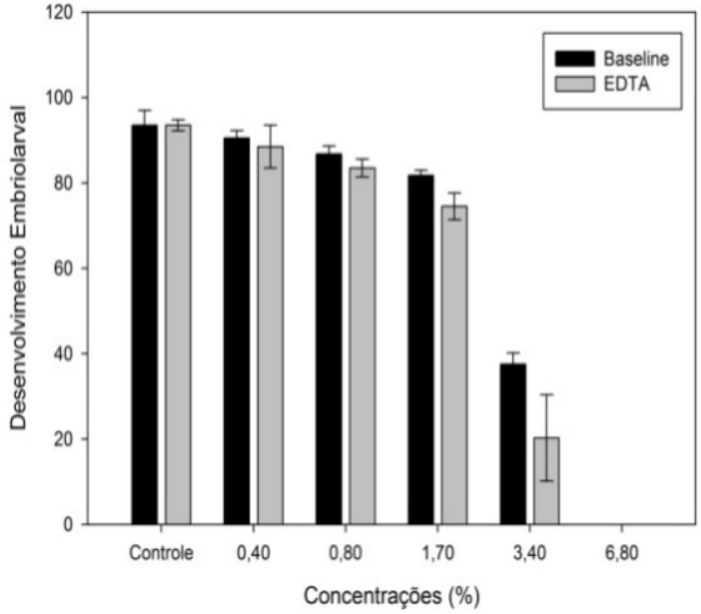
As manipulações de AIT aplicadas em amostra de água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos somente apresentaram redução significativa da toxicidade na manipulação envolvendo aeração da amostra em condição ácida ($p<0,05$). A amostra da água intersticial de Bertioga não apresentou melhora significativa da toxicidade após as manipulações de AIT ($p>0,05$). As figuras 21, 22, 23 e 24 mostram os resultados dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* antes e após as manipulações de AIT para amostras de água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos e sedimentos de Bertioga.

Tabela 17. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação com EDTA com amostra do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (Baseline e após manipulação com EDTA) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**EDTA**	**Desvio padrão (±)**
Controle	93,50	3,51	93,50	1,29
0,40	90,50	1,73	88,50	5,00
0,80	86,75	1,89	83,50	2,08
1,70	81,75	1,25	74,50	3,10
3,40	37,50	2,64	20,25	10,14
6,80	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 18. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação com EDTA com amostra de Bertioga expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após manipulação com EDTA) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**EDTA**	**Desvio padrão (±)**
Controle	91,00	3,55	79,75	5,56
6,25	91,75	2,50	81,00	5,59
12,50	94,00	3,74	86,00	6,78
25,00	87,25	0,95	81,50	2,64
50,00	70,25	3,94	74,25	7,08
100,00	4,25	4,19	15,25	2,21



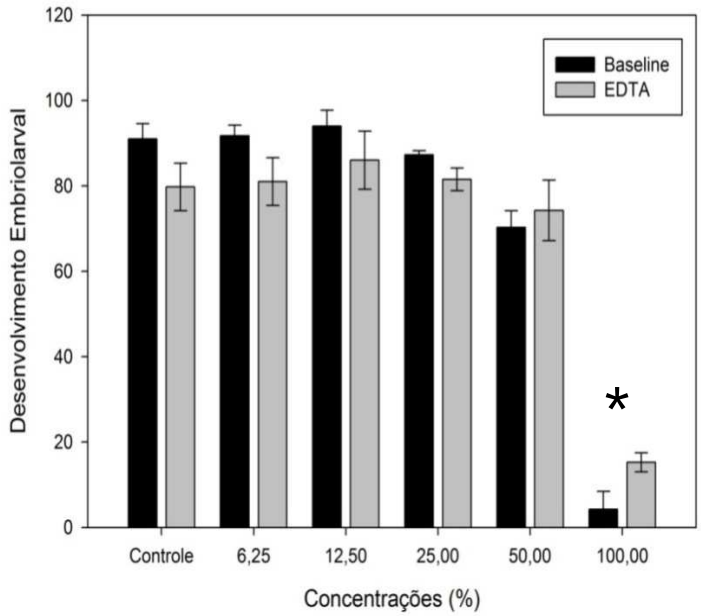


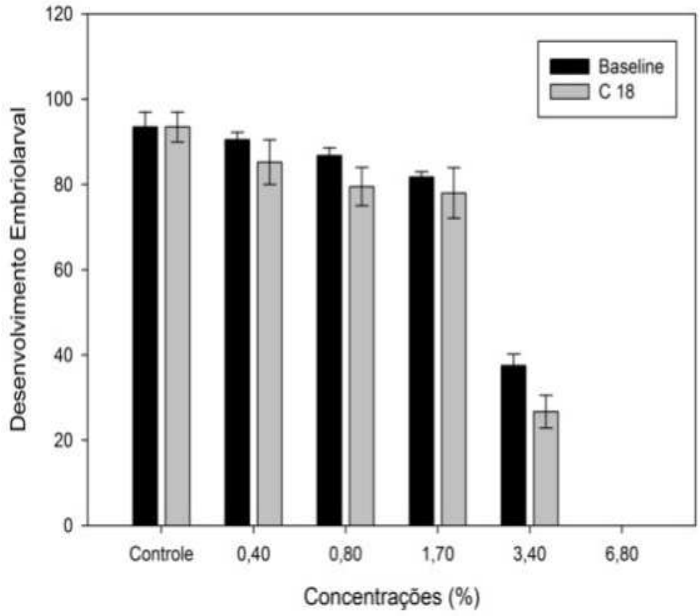
Figura 21. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* antes (barras negras) e após manipulações de adição de EDTA (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Tabela 19. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação em passagem pela coluna de C18 com amostra do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (Baseline e após passagem pela coluna de C 18) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**C 18**	**Desvio padrão (±)**
Controle	93,50	3,51	93,50	3,51
0,40	90,50	1,73	85,25	5,25
0,80	86,75	1,89	79,50	4,50
1,70	81,75	1,25	78,00	5,94
3,40	37,50	2,64	26,75	3,86
6,80	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 20. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação em passagem pela coluna de C18 com amostra de Bertioga expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após passagem pela coluna de C 18) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**C 18**	**Desvio padrão (±)**
Controle	91,00	3,55	91,75	1,25
6,25	91,75	2,50	89,50	0,57
12,50	94,00	3,74	91,25	3,77
25,00	87,25	0,95	81,75	6,65
50,00	70,25	3,94	29,50	13,00
100,00	4,25	4,19	0,75	0,95



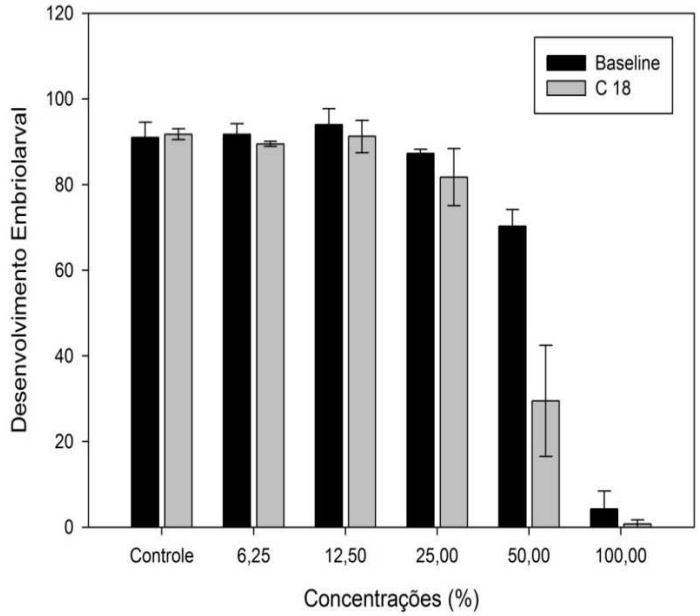


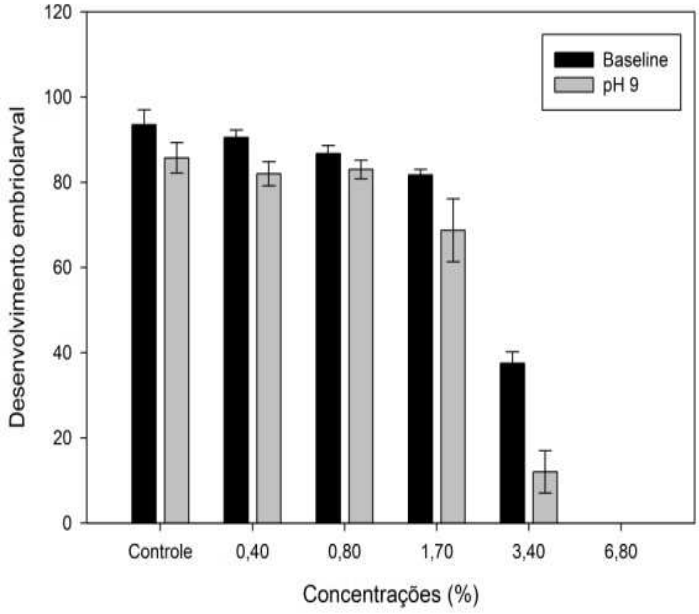
Figura 22. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* antes (barras negras) e após manipulações de C18 (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Tabela 21. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação com pH 9 com amostra do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

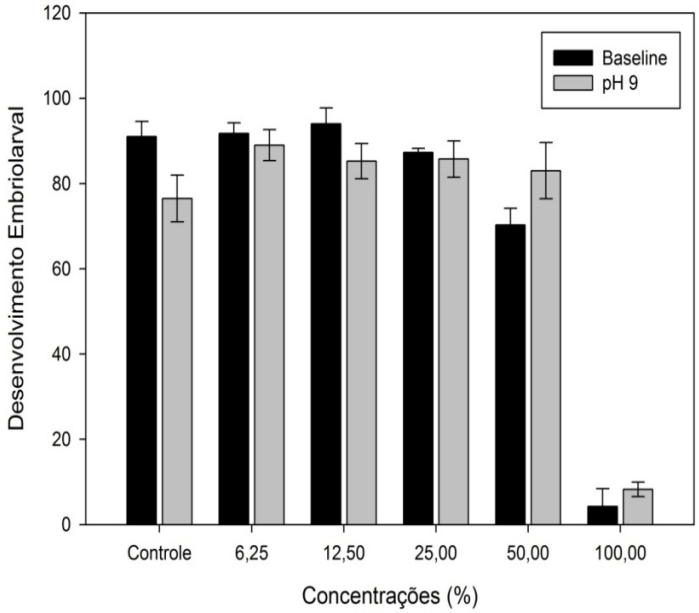
Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (Baseline e após manipulação com pH 9) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH 9**	**Desvio padrão (±)**
Controle	93,50	3,51	85,75	3,59
0,40	90,50	1,73	82,00	2,82
0,80	86,75	1,89	83,00	2,160
1,70	81,75	1,25	68,75	7,41
3,40	37,50	2,64	12,00	4,96
6,80	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 22. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação com pH 9 com amostra de Bertioga expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após manipulação com pH 9) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH 9**	**Desvio padrão (±)**
Controle	91,00	3,55	76,50	5,44
6,25	91,75	2,50	89,00	3,65
12,50	94,00	3,74	85,25	4,11
25,00	87,25	0,95	85,75	4,27
50,00	70,25	3,94	83,00	6,58
100,00	4,25	4,19	8,25	5,44



(a)



(b)

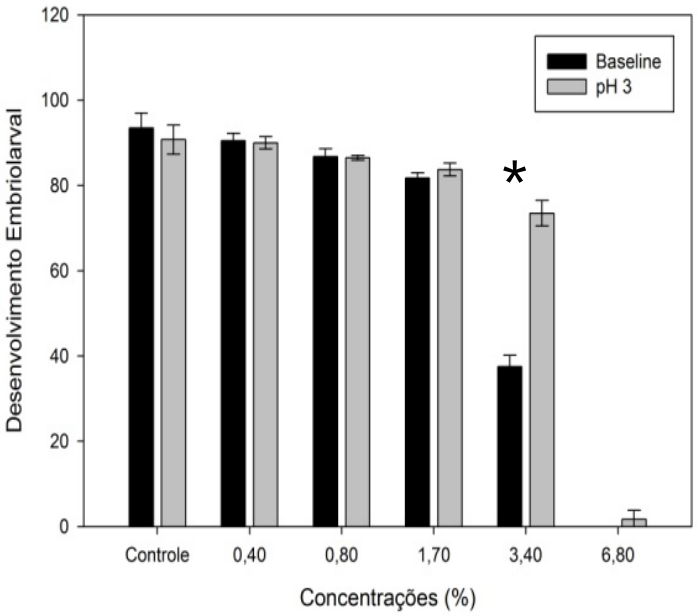
Figura 23. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* antes (barras negras) e após manipulações aeração da amostra em pH 9 (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Tabela 23. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação com pH 3 com amostra do emissário submarino de Santos expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras do emissário submarino de Santos (Baseline e após manipulação com pH 3) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH 3**	**Desvio padrão (±)**
Controle	93,50	3,51	90,75	3,40
0,40	90,50	1,73	90,00	1,41
0,80	86,75	1,89	86,50	0,57
1,70	81,75	1,25	83,75	1,50
3,40	37,50	2,64	73,50	3,00
6,80	0,00	0,00	1,75	2,06

Tabela 24. Resultados médios e desvio padrão dos ensaios de toxicidade inicial (Baseline) e após manipulação com pH 3 com amostra de Bertioga expondo o organismo-teste *L. variegatus (% de desenvolvimento normal).*

Média e desvio padrão das amostras de Bertioga (Baseline e após manipulação com pH 3) com *L. variegatus.*				
Concentrações mg L^{-1}	**Baseline**	**Desvio padrão (±)**	**pH 3**	**Desvio padrão (±)**
Controle	91,00	3,55	91,00	3,55
6,25	91,75	2,50	90,75	6,18
12,50	94,00	3,74	89,00	3,91
25,00	87,25	0,95	83,00	3,46
50,00	70,25	3,94	74,00	6,68
100,00	4,25	4,19	1,25	2,50



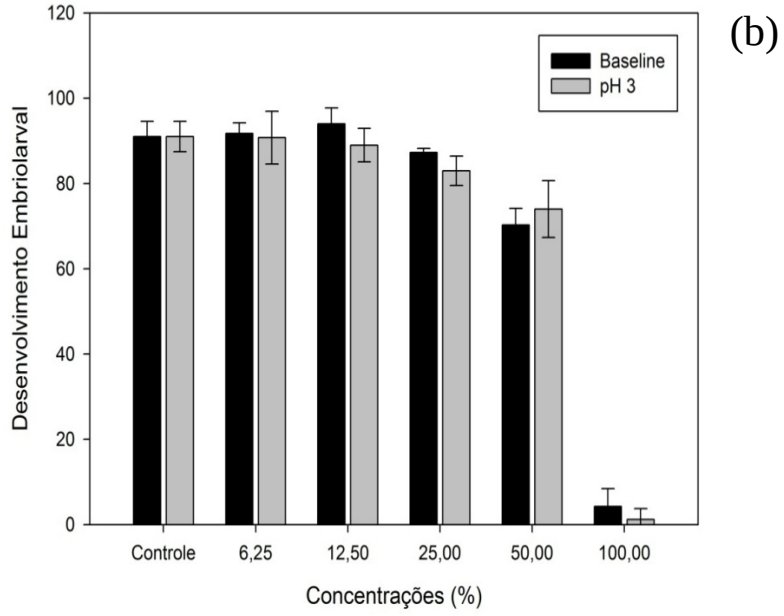


Figura 24. Resultados do ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* antes (barras negras) e após manipulações de aeração da amostra em pH 3 (barras cinza) aplicadas à água intersticial de sedimentos do emissário submarino de Santos (a) e Bertioga (b). Barras de erro representam o desvio-padrão.

4.7. ANÁLISE FÍSICO-QUIMICAS

Na tabela abaixo (Tabela 25) resultados das análises físico-químicas (temperatura inicial e final, salinidade inicial e final, oxigênio dissolvido inicial e final, pH inicial e final e amônia) das amostras da água intersticial proveniente dos sedimentos do emissário submarino de Santos e de Bertioga. A concentração de amônia não ionizada (NH_3) na amostra do emissário submarino de Santos para o *L. variegatus* foi de 13,02 mg L^{-1}, considerado um valor incomum em amostras ambientais.

Tabela 25. Resultados da análise físico-química das amostras de água intersticial dos sedimentos proveniente do emissário submarino de Santos e de Bertioga.

EMISSÁRIO SUBMARINO DE SANTOS									
	T (i) ºC	**T (f)ºC**	**Sal (i)**	**Sal (f)**	**OD (i)**	**OD (f)**	**pH (i)**	**pH (f)**	**NH_3 (mg L^{-1})**
***Nitocra* sp**	25	25	30	30	7,1	5,8	8,26	8,15	1,10
Lytechinus variegatus	25	25	34	33	5,7	4,7	7,53	8,16	13,02
BERTIOGA									
	T (i) ºC	**T (f)ºC**	**Sal (i)**	**Sal (f)**	**OD (i)**	**OD (f)**	**pH (i)**	**pH (f)**	**NH_3 (mg L^{-1})**
***Nitocra* sp**	25	25	30	30	7,6	5,2	8,36	8,15	0,07
Lytechinus variegatus	25	25	33	33	5,2	5,3	7,60	7,73	0,07

4.8. CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO

A granulometria apresentou frações de finos (lama) nas amostras do emissário submarino de Santos de 45,98% e Bertioga de 16,85% testados com o organismo-teste *Nitocra* sp. Já nas as amostras testadas com o organismo-teste *L.variegatus* continham 39,45% de finos (lama) nas amostras do emissário submarino de Santos e 10,94% nas amostras de Bertioga.

Os carbonatos de cálcio ($CaCO_3$) presentes nas amostras do emissário submarino de Santos e Bertioga testadas com o organismo-teste *Nitocra* sp. apresentaram 25,1% e 11,8% respectivamente. Já nas amostras testadas com o organismo-teste *L.variegatus* os carbonatos estiveram presentes nas amostras do emissário submarino de Santos com 18,8% e 11,5% nas amostras de Bertioga. Já o

carbono orgânico total (COT) esteve presente na amostra do emissário submarino de Santos com 5,11% e na amostra de Bertioga com 1,30%.

5. DISCUSSÃO

5.1. ADEQUAÇÃO DOS ENSAIOS COM *Nitocra* sp. E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE AO REAGENTE DA AIT

A redução no volume de 10mL para 2,5mL com o organismo-teste *Nitocra* sp da amostra de água intersticial foi especialmente importante para a aplicação do AIT, uma vez que Macken et al (2009) já havia sugerido a necessidade de desenvolvimento de métodos que viabilizem a utilização de pequenas quantidades de amostra de água intersticial, já que a extração das mesmas requer grande esforço, além de requisitarem grandes quantidades de sedimento.

Os ensaios realizados no presente estudo foram conduzidos em microplacas de 24 poços, representando uma alternativa de redução de quantidade de meio experimental e espaço ocupado pelos ensaios, o que é bastante positivo na aplicação do AIT, uma vez que estas manipulações requisitam a realização de diversos ensaios concomitantemente (USEPA, 2007),

No presente estudo optou-se pelo emprego de ensaios utilizando náuplios de *Nitocra* sp. ao invés de se utilizar organismos adultos como empregado nas metodologias nacionais e internacionais (LOTUFO e ABESSA, 2002; ISO, 1999). Para a AIT, é imprescindível a observação de toxicidade inicial (Linha-de-base), sendo mais adequada a utilização de organismos sensíveis, ou as fases de vida mais sensíveis dos organismos - teste. Verriopolous e Maraitou-Apostolopoulou (1982) demonstraram que náuplios do organismo-teste *Tisbe holothuriae* (CRUSTACEA: COPEPODA: HARPACTICOIDA) com um dia de vida, expostos aos metais cobre e cádmio, são mais sensíveis ($CL50_{48h}$) do que outros estágios de vida. Já Forget et al. (1998) observaram que náuplios do organismo-teste *Tigriopus brevicornis* (CRUSTACEA: COPEPODA: HARPACTICOIDA) são de duas a quatro vezes mais sensíveis a inseticidas (Carbofuran, Diclorvos, Malation) e metais (arsênio e cádmio) do que os estágios de vida copepodito e adulto. Em estudo mais recente, Diz et al. (2009) realizaram ensaios de toxicidade aguda expondo *Tisbe battagliai* (CRUSTACEA: COPEPODA: HARPACTICOIDA) a sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) e sulfonatos alquilbenzeno lineares (LAS), e as respostas letais foram mais intensas em náuplios em comparação aos adultos, para ambos os contaminantes testados.

Os resultados positivos observados nos ensaios avaliando o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, também realizadas com volume de meio experimental reduzido em microplacas (24 poços), corroboram os resultados obtidos por Nilin *et al*. (2008). Estes autores observaram que os testes de desenvolvimento embriolarval do organismo *L. variegatus* realizado em microplacas foram viáveis e bem sucedidos.

Outros estudos com aplicação da AIT, propondo novos organismos e novas técnicas também foram recentemente elaborados. Biales et al (2013) avaliaram a expressão gênica do anfípodo *Ampelisca abdita* em conjunto com as manipulações de AIT de fase I, estreitando os compostos causadores da toxicidade como uma fase II. Já em estudo de Custer e Burton Jr (2008) foi desenvolvido o método de AIT *in situ* com uma espécie nativa, o macroinvertebrado bentônico *Isonychia* spp., que demonstrou sensibilidade similar à do organismo *Chironomus tentans* cultivado em laboratório. Porém os resultados da AIT *in situ* são mais realísticos em relação ao cenário de exposição analisado, uma vez que é prescindida a coleta, manipulação e armazenamento dos sedimentos *ex situ*. Ensaios padronizados, porém nunca antes utilizados em AIT, também estão sendo aplicados como o ensaio de toxicidade aguda para a ostrácoda bentônica *Heterocypris incongruens* (ISO, 2012), utilizado com o fim de identificar a toxicidade de sedimento integral proveniente de corpos d'água sob influência de de material particulado de rodovias de uma área com grande tráfego em Tokyo (Watanabe et al, 2013); o desenvolvimento de ensaios de toxicidade do nematodo terrestre *Caenorhabditis elegans* para o esquema de AIT em amostras marinhas, onde foram obtidos resultados positivos e sua utilização foi recomendada (Wang et al, 2008). Além disso, ensaios ecotoxicológicos simples, rápidos e de baixo custo têm sido buscados para fins de AIT, como os ensaios de atividade da bactéria *Rhizobium meliloti* (BOTSFORD, 2000), fluorescência de clorofila-a da alga marinha *Isochrysis galbana* (STROM et al., 2009), ou crescimento da alga de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata*, imobilizada em alginato de cálcio (ZHANG et al., 2012), apenas para citar alguns exemplos recentes.

Os métodos de AIT objetivam a remoção ou indisponibilização de classes de compostos suspeitos de causarem toxicidade, a partir de manipulações físicas e químicas nas amostras. Algumas manipulações químicas requerem a adição de determinados reagentes. Para se constatar se a manipulação causa redução da

toxicidade da amostra, a toxicidade dos reagentes empregados nas manipulações deve ser conhecida. Isso permite que, em caso de que a manipulação produza alguma toxicidade, esta possa ser estimada e separada da toxicidade causada pelos contaminantes presentes na amostra, ou, ainda melhor, que se evite que seja utilizada uma concentração de reagente que cause toxicidade (USEPA, 2007).

Neste estudo, a sensibilidade dos organismos aos reagentes das manipulações do AIT foi avaliada inicialmente, tomando-se como base as concentrações de reagentes sugeridas em ampla revisão bibliográfica apresentada no documento da USEPA (2007). Esta adequação de protocolos de AIT também foi aplicada no estudo de Hogan et al. (2005), onde se constatou que a alga unicelular marinha *Nitzschia closterium* demonstrou uma CENO de 35mg L^{-1} para o EDTA em contradição à CENO de 60mg L^{-1} indicada pelos protocolos da USEPA (1996), mostrando a importância da realização dos ensaios de sensibilidade dos organismos-teste às manipulações às quais as amostras testadas serão submetidas.

Ainda que o ideal seja a utilização dos reagentes em concentrações que não aportem qualquer toxicidade à amostra, no presente estudo os organismos-teste *Nitocra* sp. e *L.variegatus* apresentaram CENO relativamente baixa para o reagente EDTA (25mg L^{-1}). No estudo de Resgalla et al (2012), a CENO de EDTA para o desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar *Arbacia lixula* foi de 100mg L^{-1}. No entanto, há que se considerar que nos ensaios com *L. variegatus* do presente estudo, concentrações mais altas de EDTA (de até 50mg L^{-1}), apresentaram mais de 80% dos organismos desenvolvendo-se normalmente, apesar de estatisticamente serem classificadas como “tóxicas” (resposta significativamente diferente do controle). Desta forma, no esquema de AIT utilizando *L. variegatus*, optou-se pela adição de 50mg L^{-1} para assim melhor evidenciar uma possível redução da toxicidade evidenciada pelos metais catiônicos na amostra após a adição de EDTA.

Estudos de sensibilidade de copépodos ao EDTA não foram encontrados na literatura. Entretanto, em estudo realizado por Macken et al (2009), o reagente EDTA foi utilizado para quelar metais presentes em amostras ambientais em conjunto com ensaios de toxicidade com copépode *Tisbe battagliai*. Neste estudo foi utilizado uma concentração de 43,61mg L^{-1}, aproximadamente duas vezes a CENO da sensibilidade ao EDTA para o *Nitocra* sp. do presente estudo, e não foi atribuída toxicidade ao EDTA. Devido a não redução da toxicidade da amostra com a

concentração de 25mg L^{-1} de EDTA, foi adicionado 40mg L^{-1} de EDTA nos ensaios de AIT utilizando o organismo-teste *Nitocra* sp., e esta concentração considerada intermediária entre 25mg L^{-1} e 50mg L^{-1} e segura pois não foi evidenciado toxicidade no controle da AIT do presente estudo.

O metanol é um reagente importante em procedimentos de AIT para confirmação de suspeita de toxicidade relacionada a compostos orgânicos apolares. Este reagente é utilizado para promover a eluição dos compostos orgânicos apolares que ficam retidos na coluna C18 após passagem da amostra, e posterior utilização deste eluato em ensaios de toxicidade. Os ensaios testando a sensibilidade dos organismos ao metanol foram realizados e os resultados mostraram que, devido à alta toxicidade deste composto, sua utilização no esquema de AIT deste estudo apenas seria possível se fosse realizada uma manipulação extra com as amostras para promover a evaporação do metanol, conforme sugerido por Hogan et al (2005). Considerando que o ensaio com o eluato da coluna C18 apenas fornece informações secundárias (para confirmação ou retificação das respostas obtidas com o tratamento de coluna C18), e que o objetivo deste estudo é desenvolver um método de AIT de rápida execução, optou-se por não se incluir o ensaio de eluato da C18 no método de AIT desenvolvido no presente estudo. Vazquez (2013) também relatou alta toxicidade em 100% do reagente metanol para o ouriço havaiano *Tripneustes gratilla* e o procedimento de eluato, considerado como a fase II, não pode ser realizada.

O reagente $Na_2S_2O_3$ não apresentou toxicidade nas concentrações testadas para *L. variegatus*. Assim mesmo, este reagente não foi utilizado na AIT do presente estudo pelo fato de que os resultados de CENO para o ensaio com *Nitocra* sp. variaram substancialmente (entre 0,05 e 0,10g L^{-1}), sendo necessários ensaios futuros para melhor definir as concentrações seguras de $Na_2S_2O_3$ para sua utilização em AIT com *Nitocra* sp. A sensibilidade ao $Na_2S_2O_3$, semelhante à observada para o *Nitocra* sp. no presente estudo, já havia sido reportada para outro copépodo harpacticoide (*Tisbe battagliai*) em estudo de Macken et al (2009). Neste estudo, foi adicionado 34µL de $Na_2S_2O_3$ a 94,7mmol L^{-1} em 10mL de amostra (50,90mg L^{-1}), onde observou-se um incremento da toxicidade da água intersticial em 20% (tempo de exposição de 24h) quando comparado com a toxicidade inicial testada (baseline).

Após a definição das características adequadas para realização dos ensaios com *Nitocra* sp. e *L. variegatus* adaptados para os procedimentos de AIT e a avaliação da sensibilidade dos organismos-teste para os reagentes de AIT, procedeu-se a aplicação deste método (com exceção do tiossulfato de sódio) em água intersticial dos sedimentos de dois locais com níveis de toxicidade diferentes.

5.2 APLICAÇAO DA AIT NA ÁGUA INTERSTICIAL DE SEDIMENTO DO EMISSÁRIO SUBMARINO DE ESGOTO DE SANTOS E SEDIMENTOS DE BERTIOGA

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO

A granulometria nas amostras do emissário submarino de Santos apresentou alta porcentagem de finos em comparação com sedimentos de Bertioga. Predominância da fração lamosa em sedimentos do emissário de Santos foi observada em trabalhos anteriores (ABESSA, 2002; HEITOR, 2002; ABESSA et al, 2005; FERREIRA et al, 2007). Estes sedimentos sempre apresentam esta característica granulométrica e altas concentrações de compostos de N e S, provenientes da grande quantidade de esgoto despejada através dos difusores do emissário (ABESSA et al, 2005). Isso também explica a maior porcentagem de matéria orgânica dos sedimentos do emissário de Santos quando comparados aos sedimentos de Bertioga.

Segundo Burton & Landrum (2003), os contaminantes tendem a se acumular nos grãos menores que se encontram na parte superficial do sedimento e, conseqüentemente, onde há também maior concentração de matéria orgânica. Portanto, tanto as características granulométricas do sedimento, quanto seu teor de COT influencia na acumulação e biodisponibilidade de contaminantes no ambiente aquático.

5.2.2 EDTA

A toxicidade da água intersticial do sedimento coletado no emissário submarino de Santos, para os dois organismos testados neste estudo, não

apresentou redução significativa após as manipulações do AIT utilizando EDTA. Ainda assim, importante notar que houve uma tendência de redução da toxicidade da água intersticial de sedimentos do emissário de Santos, na AIT empregando *Nitocra* sp. Este resultado sugere que as concentrações de metais catiônicos contidos na amostra podem contribuir com a toxicidade, mas não são os principais responsáveis pela toxicidade verificada no emissário submarino de Santos, nas diluições utilizadas.

De acordo com os resultados apresentados por Abessa (2002), existem apenas concentrações eventuais de metais nesta área. Cesar et al. (2007) evidenciaram toxicidade nas amostras de sedimento coletadas no emissário submarino de Santos para o organismo-teste *Tiburonella viscana,* a qual foi associada à presença de HPA no sedimento, mas com possível contribuição de níquel. Contudo, Choueri et al. (2009; 2010), associando análises de estrutura de comunidade de macrofauna bentônica aos resultados de mortalidade de anfípodo, encontraram efeitos biológicos mais fortemente associados ao metal. Na Baía de Santos, trabalhos pretéritos mostram alguns metais (Hg, Ni, Cu), em concentrações limiares aos estabelecidos internacionalmente (ex.: CCME, 2002) na baía de Santos e, em alguns casos, o pólo industrial de Cubatão e o emissário submarino sendo considerados importantes contribuintes de contaminação química por metais na Baía de Santos (LAMPARELLI et al., 2001; CAZZOLI Y GOYA, et al., 2007; ABESSA et al., 2008).

O presente estudo verificou uma redução da toxicidade nas amostras de água intersticial de sedimentos coletados em Bertioga para os náuplios de *Nitocra* sp. após a adição de EDTA. Estes resultados sugerem a presença de metais catiônicos nesta região, causando toxicidade. Em estudo de Zaroni (2006) avaliando a quantificação de metais (Cd, Pb, Cu, Cr e Zn) em amostras de sedimentos proveniente do canal de Bertioga, apresentou concentrações de cádmio acima dos valores de TEL (*Threshold Effect Level)*. A mesma autora afirma que os pontos que apresentaram cádmio acima dos valores de TEL estão localizados próximos a centros urbanos que contribuem com a descarga de esgoto doméstico, e a balsa que possui um frequente tráfego de embarcações. Contudo, o local de coleta do sedimento de Bertioga do presente estudo pode não ter contribuição do canal de Bertioga devido a sua localização e sua evidência de metais deve ser investigada

mais detalhadamente com a realização da fase II da AIT e avaliações dos compostos químicos.

5.2.3 COLUNA C18

A coluna de C18 é um método comumente utilizado para detectar a presença de compostos orgânicos apolares nas amostras de água intersticial. Estes compostos, quando presentes nas amostras, são transferidos para a coluna C18 e desta forma é observada uma redução da toxicidade (HO e BURGUESS et al, 2009). No presente estudo foi verificada a redução da toxicidade para os náuplios de *Nitocra*, sp após passagem da amostra de água intersticial do sedimento do emissário submarino de Santos através da coluna de C18, sugerindo que compostos orgânicos apolares estariam causando toxicidade nesta amostra.

Rachid (2002), em trabalho realizado também com água intersticial de sedimentos coletadas nas circunvizinhanças do emissário submarino de Santos, encontrou redução da toxicidade após passagem da amostra por coluna C18. Segundo Cesar et al (2007) sedimentos coletados na saída do emissário submarino de Santos foram considerados degradados, associado a mortalidade de anfípode *Tiburonella viscana* nos ensaios de toxicidade às concentrações de PAH (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Os PAH são produzidos da combustão incompleta da matéria orgânica e uma das principais fontes para o meio ambiente é o esgoto doméstico (LAMPARELLI et al, 2001). Em estudo mais recente, entretanto, Choueri et al. (2009), utilizando a abordagem de peso-de-evidências integradas por análise multivariada, não observaram associação entre níveis de PAH ou PCB e respostas tóxicas (mortalidade de anfípodes) em sedimentos coletados na saída do emissário de Santos.

Trabalhos pretéritos concordam que o emissário submarino é fonte importante de PAH para a Baía de Santos (CESAR et al., 2007; CHOUERI et al., 2009), apesar de nem sempre estarem associados à toxicidade aguda. Ensaios com o copépodo estuarino *Schizopera knabeni* cultivado em laboratório, avaliando sua sensibilidade a concentrações de PAH, demonstraram efeitos subletais (reprodução e sucesso da prole (náuplios e copepoditos) como mais sensíveis do que respostas letais (mortalidade em adultos) (LOTUFO, 1997), sugerindo também que organismos em

seus primeiros estágios de vida, como os utilizados no presente estudo, podem ser mais sensíveis a PAH do que organismos adultos.

Além disso, compostos surfactantes também podem ser removidos em tratamento com coluna C18 (RACHID, 2002). Sendo efluentes domésticos reconhecidamente ricos nestas substâncias (ABESSA et al. 2005; FIELD et al. 1995; MARCOMINI et al., 1987) e sabendo-se que elas podem acumular-se nos sedimentos (FYTIANOS et al., 1998; STOLL et al., 1997), é possível que ao menos parte da toxicidade observada seja causada pelos surfactantes. Bosquilha (2002) obteve concentrações de detergentes na água de fundo ao emissário de Santos, variando entre 0,15 e 0,26 mg L^{-1} sendo estas concentrações tóxicas, por exemplo, para os embriões de *L. variegatus* (MASTROTI et al, 2001). Abessa (2002) também evidenciou alta concentração de tensoativos aniônicos (LAS) em amostras de sedimento coletados na saída dos difusores do emissário submarino de Santos. O autor atribui esta alta concentração (13,68µg g^{-1} sedimento) ao esgoto doméstico descartado pelo emissário submarino de Santos e à intensa ocupação de favelas nas margens do Canal de São Vicente.

Outros compostos considerados de mesma característica dos contaminantes orgânicos, como por exemplo, substâncias de almíscar sintético, que estão presentes em produtos largamente utilizados pela população (ex.: detergentes, produtos de limpeza de casa e higiene pessoal), chegam até os efluentes domésticos ou diretamente ao ambiente (WOLLENBERGER et al, 2003). Wollenberger et al (2003) testaram quatro substâncias de almíscar sintético (MK, HHCB, AHTN e ACBI) avaliando o desenvolvimento larval (náuplio e copepodito) do copépodo *Acartia tonsa*, onde em baixas concentrações já apresentaram alta toxicidade subletal. Vazquez (2013) utilizando a coluna C18 em amostra de efluente doméstico verificou a redução da toxicidade do ouriço *Tripneustes gratilla* e atribuiu uma possível contribuição de piretróides, fármacos, produtos para cuidados pessoais, e surfactantes. Substâncias como estas podem estar presentes nos sedimentos na área de influência do emissário submarino de Santos e, no entanto, atualmente poucos métodos foram desenvolvidos para detectar sua toxicidade em AITs (WALLER et al., 2005).

Para se confirmar o papel de contaminantes orgânicos e/ou surfactantes na toxicidade da água intersticial do emissário de Santos, outros métodos de AIT para

evidenciar compostos orgânicos podem ser aplicados, como em um estudo de Anderson et al (2010), onde foi aplicado ensaios de AIT com amostra de água intersticial utilizando resina Ambersorb 563 e ensaios de toxicidade aguda com anfípode *Eohaustorius estuarius*. Depois de confirmado a presença dos compostos na fase I, foi então realizada a fase II do AIT sugerindo que o método de remoção de compostos orgânicos foi eficiente, e que pesticidas foram os causadores da toxicidade dos sedimentos do porto de São Diego – EUA. Macken et al (2008) sugerem, a eliminação da toxicidade da amônia antes de se realizar as demais manipulações, desta forma permitindo que se revele a toxicidade de outros compostos presentes.

De acordo com USEPA (1993), após a redução da toxicidade da phase I através da aeração e coluna de C18, pode ser aplicado a phase II que comprova a presença dos surfactantes. A phase II consiste em uma aeração na amostra onde as bolhas provenientes deste processo liberam os agentes tensoativos que por sua vez aderem na parede do frasco de vidro utilizado; em seguida o mesmo frasco pode ser lavado com um solvente (ex.: metanol) e sua sensibilidade testada para o organismo-teste utilizado.

Segundo Kwok et al. (2005), a fase II do AIT mostrou maior eficiência na identificação dos agentes causadores de toxicidade da amostra de água intersticial (em ensaios com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*) quando, ao invés de ser aplicada apenas uma manipulação, se promove a combinação de diferentes manipulações, como, por exemplo, uso da coluna de C18 combinada a manipulação do pH (3 e 9). Ainda no trabalho de Kwok et al. (2005), estas manipulações combinadas foram eficientes em apontar os sulfetos como causador da toxicidade, e a toxicidade deste composto foi ainda confirmada na fase III do AIT.

5.2.4 AERAÇÃO EM pH MODIFICADO

A amostra de água intersticial do sedimento do emissário submarino e de Bertioga mostram significativa redução da toxicidade ($p<0,05$) após os tratamentos de aeração da amostra em pH básico e aeração da amostra em pH ácido testados com o organismo-teste *Nitocra* sp. Já na amostra de água intersticial de sedimento do emissário submarino de Santos testada com o organismo-teste *L. variegatus*

somente foi observada redução significativa da toxicidade na manipulação envolvendo aeração da amostra em condição ácida ($p<0,05$). Alguns estudos mostram que alguns interferentes naturais presentes nos sedimentos, como por exemplo, a amônia e sulfeto, podem causar toxicidade, o que em muitos casos deve ser considerado como resultados falso-positivos nos testes de toxicidade (ANDERSON et al., 2001; STRONKHORST et al., 2003). Tais resultados são mais freqüentemente observados quando são utilizados organismos-teste não adaptados e muito sensíveis aos interferentes naturais do sedimento/água intersticial (CARR et al., 2006).

No presente estudo, há evidência de amônia, sulfeto e/ou cloro identificada através da redução da toxicidade da água intersticial do sedimento coletado no emissário submarino de Santos após as manipulações envolvendo aeração das amostras em pH básico e ácido, respectivamente, com o organismo-teste *Nitocra* sp. Rachid (2002), aplicando o AIT em amostras de água intersticial do sedimento coletadas nas proximidades do emissário submarino de Santos, também atribuiu a toxicidade das amostras para estas mesmas substâncias (amônia, sulfeto e/ou cloro). O mesmo autor verificou que as manipulações com a alga *Ulva* lactuca e pH foram eficientes para evidenciar a presença de amônia nas amostras. A atividade bacteriana, que se acredita ser intensa na amostra de sedimento do emissário devido à alta carga orgânica dos efluentes domésticos, pode ser responsável pela produção de amônia e sulfetos fazendo com que estes compostos não devam ser considerados apenas interferentes naturais, mas sim parte dos contaminantes presentes na amostra em resultado ao aporte de esgoto doméstico.

O esgoto descartado através do emissário submarino de Santos é previamente acondicionado na estação de pré-condicionamento (EPC), onde é realizada adição de cloro para desinfecção do efluente. Uma vez utilizado cloro para tratamento de desinfecção do esgoto, este composto pode causar toxicidade no ambiente e, ainda mais grave, combinado com a matéria orgânica, pode formar subprodutos como os organoclorados e trihalometanos, ainda mais tóxicos para a vida aquática (Brungs, 1973, Aquire, 1992 e Rachid, 2002). Ainda que a toxicidade do cloro proveniente da cloração de esgotos domésticos seja mais importante para a coluna d'água do que para sedimento, onde, de acordo com USEPA (2007), este composto é improvável de ocorrer, no presente estudo não se descarta a possibilidade do cloro ser, ao

menos parcialmente, responsável pela toxicidade proveniente de substâncias voláteis. Estudos posteriores devem considerar a quantificação do cloro residual total, que deve ser medido imediatamente quando a amostra é coletada, pois o cloro se dissipa rapidamente (USEPA, 1999).

Em outros trabalhos, a amônia também foi considerada a substância responsável como a inibição de crescimento da alga unicelular marinha *Nitzschia closterium* após serem aplicadas as manipulações de pH integrantes do AIT (HOGAN et al, 2005). Em estudo de Montero et al (2013) a amônia também foi o principal composto responsável pela toxicidade com anfípodo *Corophium multisetosum* e desenvolvimento embriolarval do ouriço *Paracentrotus lividus* em que foi aplicado AIT nas amostras de sedimento coletadas no estuário de Oiartzun (norte da Espanha onde está localizado o porto de Pasaia).

De acordo com ensaios realizados por Burguess, et al (2003), uma concentração de 25mg L^{-1} de amônia não ionizada (NH_3) é completamente eliminada de uma amostra após aeração constante por 96 horas e pH 10.

Os valores de amônia não ionizada para os ensaios com náuplios de *Nitocra* sp estiveram acima de 0,05mg L^{-1}, níveis considerados tóxicos para alguns organismos-teste, como o *L. variegatus*. Segundo estudo de Ward et al (2011), a menor concentração de efeito observado de amônia total para mortalidade de adultos de *Nitocra* sp. foi >20mg L^{-1}. Rose et al (2006) realizaram ensaios expondo o copépodo *Acartia sinjiensis* a diferentes concentrações de amônia total onde obtiveram valores de $CE50_{48h}$ entre 6 e 15mg L^{-1}, e apenas 5% da amônia total adicionada se transformou em amônia não ionizada à temperatura de 27ºC e pH 7,8. Sabe-se que é a fração não ionizada da amônia a responsável pela toxicidade deste composto, e sua concentração em relação à amônia total dissolvida é função do pH e temperatura. Em estudo de Sousa et al (2012), ensaios com adultos de *Nitocra* sp. sugerem $CL_{50\text{-}96h}$ de 1,7mg L^{-1} para amônia não ionizada, e portanto valor próximo ao do presente estudo na amostra de água intersticial do emissário submarino de Santos (1,10 NH_3). Porém, a $CL_{50\text{-}96h}$ de 1,7mg L^{-1} encontrada por Sousa et al (2012) pode ser tóxica para os organismos de fase mais jovem, como os náuplios utilizado no presente estudo, assim há a necessidade de mais estudos a fim de verificar concentrações limites (CEO – concentração de efeito observado e CENO –

concentração de efeito não observado) para os organismos *Nitocra* sp. (náuplios, copepoditos e adultos) expostos a amônia não ionizada.

Uma observação relevante a se fazer, em se comparando a AIT realizada com *Nitocra* sp. e *L. variegatus*, é que a utilização do ensaio com embriões/larvas de ouriço só foi possível a partir de uma substancial diluição inicial das amostras de água intersticial de sedimentos do emissário de Santos. Identificado o sulfeto como a principal substância responsável pela toxicidade nestas amostras, pode-se concluir que a necessidade de diluição da amostra inicial se deu principalmente devido a esta substância. Essa diluição pode ocasionar uma possível ocultação de alguns compostos importantes presentes e que poderiam causar toxicidade na amostra de água intersticial se testada a 100%. A possível ocultação da toxicidade de outros contaminantes não ocorreu com o emprego de ensaios utilizando náuplios de *Nitocra* sp., provavelmente devido à sua maior tolerância aos sulfetos, o que possibilitou revelar importante toxicidade causada também por outras classes de compostos, como a amônia e compostos orgânicos apolares e/ou surfactantes, além de possível contribuição de metais catiônicos.

6. CONCLUSÕES

(i) O ensaio de toxicidade aguda com náuplios de *Nitocra* sp. mostrou-se adequado para sua utilização em esquema de AIT de água intersticial.

(ii) O ensaio com náuplios de *Nitocra* sp. empregando volume de meio experimental reduzido (2,5 mL) não apresentou resposta diferente em relação ao ensaio realizado com 10mL de meio experimental;

(iii) O tempo de exposição mais adequado para o ensaio de *Nitocra* sp., no procedimento da AIT (maior exposição, mantendo a aceitabilidade do ensaio), foi estabelecido em 48h;

(iv) Os resultados da aplicação de AIT com *Nitocra* sp. sugerem que a amônia, sulfetos, cloro, compostos orgânicos apolares e surfactantes são os supostos causadores da toxicidade nas amostras de água intersticial do emissário submarino de Santos e Bertioga.

(v) Os resultados da aplicação de AIT com *Lytehcinus variegatus* sugerem os sulfetos e cloro como os principais causadores da toxicidade das amostras do emissário submarino de Santos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.M.S; CARR, R.S.; SOUSA, E.C.P.M.; RACHID, B.R.F.; ZARONI, L.P.; GASPARRO, M.R.; PINTO, Y.A.; BÍCEGO, M.C.; HORTELLANI, M.A.; SARKIS, J.E.S; MUNIZ, P. **Integrative ecotoxicological assessment of contaminated sediments in a complex tropical estuarine system. In: HOFER, T.N. (Ed.) Marine Pollution: New Research.** Nova Science Publishers, Inc, 2008.

ABESSA, D.M.S.; CARR, R.S.; RACHID, B.R.F.; SOUSA, E.C.P.M.; HORTELANI, M.A.; SARKIS, J.E. **Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments.** Marine Pollution Bulletin, v. 50, p. 875-885, 2005.

ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos**, SP, Brasil. Tese de doutorado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 2002.

ABESSA, D.M.S.; SOUSA, E.C.P.M.; RACHID, B.R.F. E MASTROTI, R.R. **Toxicity of sediments from Santos Estuary (SP, Brazil): Preliminary Results.** Ecotoxicology and Environmental Restoration. v. 4. Nº1. 2001.

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar** (Echinodermata:Echinoidea). ABNT-NBR no. 15350, 2012.

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar** (Echinodermata:Echinoidea). ABNT-NBR no. 15350, 2006

ANDERSON, B.S.M; PHILLIPS, B.M.; HUNT, J.W.; CLARK, S.L.; VOORHEES, J.P.; TJEERDEMA, R.S.; CASTELINE, J.; MEKEBRI, A.**Evaluation of methods to determine causes of sediment toxicity in San Diego Bay, California, USA.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 73, n. 4, p. 534-540, 2010.

ANDERSON, B.S.; HUNT, J.W.; PHILLIPS, B.M.; TJEERDEMA, R.S. **Navigating the TMDL Process: Sediment Toxicity. Alexandria, VA.** Water Environment Research Foundation (WERF). 2006.

ANDERSON, B.S.; HUNT, J.W.; PHILLIPS, B.M.; FAIREY, R.; ROBERTS, C.A.; OAKDEN, J.M.; PUCKETT, H.M.; STEPHENSON, M.; TJEERDEMA, R.S.; LONG, E.R.; WILSON, C.J.; LYONS, J.M. **Sedimentquality in Los Angeles Harbor, USA: a triad assessment**. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 20 p.359-370, 2001.

ARAUJO, G.S. **Using whole sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) to assess impacts in a Marine Protected Area: implications from the choice of test-organism.** Trabalho apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, com habilitação em Gerenciamento Costeiro, da Universidade Estadual Paulista – Campus Experimental do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do titulo de Bacharel.

ARAÚJO R.P.A.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R; SILVERIO, P.F., ALMEIDA, F.V.; RODRIGUES, P.F; UMBUZEIRO, G.A.; JARDIM, W.F.; MOZETO, A.A. **Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contamined water reservoir in a southeastern Brazil.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25 n.2 p. 581-588, 2006.

BIALES, D.A.; KOSTICH, M.; BURGUESS, M.R.; HO, K.T.; BENCIC, D.C.; FLICK, R.L.; PORTIS, M.L.; PELLETIER, M.C.; PERRON, M.M.; REISS, M. **Linkage of Genomic Biomarkers to Whole Organism End Points in a Toxicity Identification Evaluation (TIE).** Environmental Science Technology., 47. p. 1306−1312. 2013.

BIEDENBACH, J.M., CARR, R.S. **Sediment pore-water toxicity test results and preliminary toxicity identification of post-landfall pore-water samples collected following the Deepwater Horizon oil release, Gulf of Mexico, U.S.** Geological Survey Open-File Report 2011–1078, 72011, 2011.

BOSQUILHA, G.E. **Estudo da distribuição de surfactantes aniônicos e de polifosfatos no Sistema Estuarino de Santos/São Vicente e Baía de Santos (SP, Brasil) e avaliação das metodologias aplicadas** [dissertação]. São Paulo: USP, Instituto Oceanográfico; 2002. 179 p.

BOTSFORD, J.L. **A simple, inexpensive, and rapid method to determine toxicity using a bacterial indicator organism.** Proceedings of the Conference on Hazardous Waste Research. 2000.

BRASIL, **Conselho Nacional do Meio Ambiente, resolução Nº. 354 de 13 de dezembro de 2004.** Ministério do Meio Ambiente, 2004.

BRASIL. Portaria n° 685/98. Diário Oficial da União, Brasília. Seç. 1, pt.1, p. 1415-1437, 24 set 1998.

BRUNGS, W. A. **Effect of residual chlorine on aquatic life**. Journal Water Pollution Control Federation. v. 45. No. 10. P. 2180 – 2193.1973.

BURGESS, R.M.; PELLETIER, M.C.; HO, K.T.; SERBST, J.R.; RYBA, S.A.; KUHN, A.; PERRON, M.M.; RACZELOWSKI, P. e CANTWELL, M.G. **Removal of ammonia toxicity in marine sediment TIEs: a comparison of Ulva lactuca, zeolite and aeration methods.** Marine pollution bulletin. V. 46, p. 607 – 618. 2003.

BURGESS, R. M., K. A. SCHWEITZER, R. A. MCKINNEY AND D. K. PHELPS. **Contaminated marine sediments: Water column and interstitial toxic effects.** Environmental Toxicology Chemisphere. v. 12. p. 127-138. 1993.

BURTON, G.A., e P.F. LANDRUM. Txicity of sediments. **In Ecnyclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks, G.V. Middleton, M.J. Chrurch, M. Corigilo, L.A. Hardir, and F.J. Longstaffe (eds.).** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 748-751.2003.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT (CCME), **Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, Canadian Environmental Quality Guidelines,** Summary Tables, 2002. Retrieved from: http://www.ccme.ca/publications/ceqg rcqe.html?category id=124.

CARR, R. S.;BIEDENBACH, J. M. E NIPPER, M. **Influence of Potentially Confounding Factors on Sea Urchin Porewater Toxicity Tests.** Arch. Environ. Contam.Toxicol.51, 573–579, 2006.

CARR, R. S.; NIPPER, M.; BIEDENBACH, J. M.; HOOTEN, R. L.; MILLER, K. E SAEPOFF, S. **Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Studies at Marine Sites Suspected of Ordnance Contamination.** Arch. Environ. Contam.Toxicol.41, 298–307, 2001.

CAZZOLI Y GOYA, S.; TESSLER, M. G.; FIGUEIRA, R.; MAHIQUES, M. M.; FUKUMOTO, M.M. e REQUENA, R. **Comparação entre níveis de metais nos sedimentos de fundo da Baía de Santos e da plataforma continental adjacente.** In: XI Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 2007, Belém. ANAIS XI Congresso da ABEQUA.

CESAR, A. ; PEREIRA, C.D.S. ; SANTOS, A. R. ; ABESSA, D.M. ; FERNÁNDEZ, N. ; CHOUERI, R.B. ; CASILLAS, T.A.D.V. **Ecotoxicology assessment of sediments from Santos and São Vicente Estuarine System Brazil.** Brazilian Journal of Oceanography, v. 54, p. 55-63, 2006.

CESAR, A.; CHOUERI, R.B., RIBA, I.; MORALES-CASELLES, C.; PEREIRA, C.D.S.; SANTOS, A.R.; ABESSA, D.M.S. E DELVALLS, T.A**. Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system).** Environment International. v. 33, p. 429 - 435. 2007.

CHAPMAN, P.M. E WANG, F. **Assessing sediment contamination in estuaries.** Environmental Toxicology and Chemistry. V. 20, nº 1. p. 3-22. 2001.

CHOUERI, R. B.; CESAR, A.; ABESSA, D.M.S.; TORRES, R.J.; RIBA, I; PEREIRA, C.D S.; NASCIMENTO, M.R.L.; MORAIS, R.D.A.; MOZETO, A.; DELVALLS, T.A. **Harmonised framework for ecological risk assessment of sediments from ports and estuarine zones of North and South Atlantic**. Ecotoxicology v. 19 n. 4 p. 678–696, 2010.

CHOUERI, R.B.; CESAR, A.; TORRES, R.J.; MORAIS, R.D.; ABESSA, D.M.S.; PEREIRA, C.D.S.; NASCIMENTO, M.R.L.; MOZETO, A.A.; DELVALLS, T.A. **Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil**. Ecotoxicology Environmental Safety, v. 72 p. 1824-1831, 2009.

CUSTER, K.W; BURTON JR, G.A. **Isonychia spp. and macroinvertebrate community responses to stressors in streams utilizing the benthic in situ toxicity identification evaluation (BiTIE) method.** Environmental Pollution. v. 151. p. 101 - 109. 2008.

DIZ, F.R.; ARAÚJO, V.M.C.; MORENO-GARRIDO I.; HAMPEL, M. e BLASCO, J. **Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod Tisbebattagliai:Lethal and reproductive endpoints.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 72. p. 1881–1886. 2009.

EGGLETON, J. e THOMAS, K.V. **A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events.** Environment International, v. 30 p. 973– 980, 2004.

FIELD, J.A., FIELD, T.M., POIGER, T., SIEGRIST, H. e GIGER, W. **Fate of secondary alkane sulfonate surfactants during municipal wastewater treatment.** Water Research 29 (5), (1995) 1301–1307.

FERREIRA, J.A.; MARTINS, C.C.; BÍCEGO, M.C.; MONTONE, R.C. e PIRES-VANIN, A.M.S. **Utilização de anelídeos Polychaeta, marcadores químicos e metais pesados como indicadores de contaminação na baía de Santos-SP,**

Brasil. XII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar. Florianópolis, 15 a 19 de abril de 2007.

FYTIANOS, K., VOUDRIAS, E., MOURATIDOU, T.H., **The sorption-desorption behaviour of linear alkybenzenesulfonate in marine sediments.** Chemosphere. v. 36, nº 9, p. 2067–2074. 1998.

FORGET, J.; PAVILLON, J. F.; MENASRIA, M. R.; BOCQUENE, G. **Mortality and LC_{50} Values for Several Stages of the Marine Copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) Exposed to the Metals Arsenic and Cadmium and the Pesticides Atrazine, Carbofuran, Dichlorvos, and Malathion.** Ecotoxicology and environmental safety. v. 40, p. 239 – 244. 1998.

Global Investigation of Pollution in the Marine Environment (GIPME).**Guidance on assessment of sediment quality**. International Maritime Organization, London, UK, 2000.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. **Trimmed Spearman-Karber method for stimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.** Environmental Science and Technology, v. 11, p. 714-719, 1977.

HEITOR, S.R. **Composição e distribuição da macrofauna bentônica em áreas sob influência da disposição oceânica de esgotos municipais na Baixada Santista e no Canal de São Sebastião, São Paulo, Brasil** [tese]. São Paulo: USP; 2002. 245p.

HO, K.T.; BURGESS, R.M. **Marine Sediment Toxicity Identification Evaluations (TIEs): History, Principles,Methods, and Future Research.** HdbEnvChem Vol. 5, Part T: 75–95, 2009.

HO, K.T.; BURGUESS, RM..; PELLETIER, M.C.; SERBSTA, J.R.; RYBA, S.A.; CANTWELL, M.G.; KUNH, A.; RACZELOWSKI, P. **An overview of toxicant**

identification in sediments an dredged materials. Marine Pollutin Bulletin. 44. p. 286 – 293. 2002

HOGAN, A. C.; STAUBER, J. L.; PABLO, F.; ADAMS, M. S. E LIM, R. P. **The Development of Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Procedures Using the Unicellular Alga Nitzschia closterium.** Arch. Environ. Contam.Toxicol.48, 433–443, 2005.

HOSTIM, L.M.; SANDRINI-NETO, L.; OLIVEIRA, V. **Estrutura da macrofauna bêntica nos canais de acesso aos terminais portuários do complexo estuarino de Paranaguá (Paraná) sujeitos à dragagem.** XII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar – XII COLACMAR. Anais XII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar – XII COLACMAR. Florianóplis, 15 a 19 de abril. 2007.

ISO. **Water Quality - Determination of Fresh Water Sediment Toxicity to Heterocypris incongruens (Crustacea, Ostracoda).** Internal Standard. ISO14371. 2012.

ISO, **Water quality—determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea).** ISO 14469. 1999. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.

KWOK, Y.C.; HSIEH, D.P.H.; WONG, P.K. **Toxicity evaluation (TIE) of pore water of contaminated marine sediments collected from Hong Kong waters**. Marine Pollution Bulletin, v. 51 n.8-12 p.1085–91, 2005.

LAMPARELLI, M.L.; COSTA, M.P.; PRÓSPERI, V.A.; BEVILÁQUA, J.E; ARAÚJO, R.P.A.; EYSINK, G.G.L.; POMPÉIA, S. Sistema **Estuarino de Santos e São Vicente**. Technical report. CETESB, São Paulo, SP, 2001.

London Convention (LC).**Specific guidelines for assessment of dredged material**. International Maritime Organization, London, UK, 1996.

LOTUFO, G.R. **Toxicity of sediment – associated PAHs to an estuarine copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behavior.** Marine Environmental Research, vol. 44, nº 2 p. 149 – 166. 1997.

LOTUFO, G. R.; ABESSA, D. M. S. Testes de toxicidade com sedimentos total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.M.; NIPPER, M.G. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**, Artes Gráficas e Indústria Ltda: São Paulo, p.151-162, 2002.

MACKEN, A.; GILTRAP, M.; FOLEY, B.; MC GOVERN, E.; MC HUGH, B.; DAVOREN, M. **An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: validation of established marine bioassays for the monitoring of Irish marine sediments.** Environmental International v. 34 p.1023–1032, 2008.

MACKEN, A.; GILTRAP M.; FOLEY, B.; MCGOVERN, E.; MCHUGH, B.; DAVOREN, M. **An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments Application of porewater Toxicity Identification Evaluation (TIE) to Irish marine sediments.** Environment International v. 35 p. 98 – 106, 2009.

MARCOMINI, A., Capri, S.; Giger, W. **Determination of linear alkylbenzenesulphonates, alkylphenol, polyethoxylates and nonylphenol in waste water by high perfomance liquid chromatography after enrichment on octadecylsilica.** Journal of Chromatography 403, (1987) 243–252.

MASTROTI, R.R., SOUSA, E.C.P.M., ABESSA, D.M.S. **Toxicidade de tensoativos aniônicos sobre embriões de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.** In: Moraes R, Crapez M, Pfeiffer W, Farina M, Bainy A, Teixeira V, editors. Efeitos de Poluentes sobre Organismos Marinhos. São Paulo: Arte & Ciência Villipres;. p. 207-16. 2001

MONTERO, N.; BELZUNCE-SEGARRA, M.J; GONZALEZ, J-L.; MENCHACA, I.; GARMENDIA J.M.; ETXEBARRIA, N.; NIETO O.; FRANCO J**. Application of Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedures for the characterization and**

management of dredged harbor sediments. Mar. Pollut. Bull. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.038

NAVAL FACILITIES ENGINEERING COMMAND. **Development of marine sediment toxicity for ordnance compounds and toxicity identification evaluation studies at select naval facilities.** Washington, DC 20374-5066 NFESC Contract Report CR 01-002-ENV. 2000.

NILIN, J.; CASTRO, C.B.; PIMENTEL, M.F.; JUNIOR, W.F.; MATOS, R.F.G.; LOTUFO, L.V.C**. Evaluation of the viability of a microscale method for the short-term chronic toxicity test using *Lytechinus variegates* embryos.** Panamjas, Pan-American Journal of aquatic sciences, v. 3 n. 2, pg. 122-129, 2008.

Permanent International Association of Navigation Congresses (PIANC).**Biological assessment guidance for dredged management**.PIANC Envi Com Working group 8, 2006.

PERRON, M.M.; BURGESS, R.M.; KAY, T.H.O.; PELLETIER, M.C.; CANTWELL, M.G.; SHINE, J.P. **Bioavailability assessment of a contaminated field sediment from Patrick Bayou, Texas, USA: Toxicity identification evaluation and equilibrium partitioning,** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 29 n. 3 p. 742-750, 2010.

PHILLIPS, B.M.; ANDERSON, B.S.; HUNT, J.W. **Measurement and distribution of interstitial and overlying water ammonia and hydrogen sulfide in sediment toxicity tests.** Marine Environmental Research. v. 44. No 2. p. 117 – 126. 1997.

PICONE, M.; BERGAMIN, M.; VOLPATO, E.; DELANEY, E. TURETTA, C. RANALDO, M. CAPODAGLIO, G.; NASCI, C. **Sequential toxicity identification evaluation (TIE) for characterizing toxicity of Venice Lagoon sediments: comparison of two different approaches**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 72 n. 2 p. 538-545, 2009.

POSTMA, J. F.; VALK, S. DE; DUBBELDAM;, M.; MAAS, J. L.; TONKES, M.; SCHIPPER, C. A.; E KATER, B. J. **Confounding Factors in Bioassays with Freshwater and Marine Organisms.** Ecotoxicology and Environmental Safety. Environmental Research, Section B, v. 53, p. 226 – 237. 2002.

PUSCEDDU, F.H.; ALEGRE, G.F.; PEREIRA, C.D.S.; CESAR, A. **Avaliação da Toxicidade do Sedimento do Complexo Estuarino de Santos Empregando Ouriços-do-mar Lytechinus variegatus (Echinoidea: Echinodermata).**Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v 2 n 3 p 237-242, 2007.

RACHID, B.R.F. **Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo. 286p, 2002.

RESGALLA C. JR.; POLEZA, F.; SOUZA, R.C.; MÁXIMO, M.V.; RADETSKI, C.M. **Evaluation of effectiveness of EDTA and sodium thiosulfate in removing metal toxicity toward sea urchin embryo-larval applying the TIE**. Chemosphere. 2012.

ROSE, A.; CARRUTHERS, A.M.; STAUBER, J.; LIM, R.; BLOCKWELL, S. **Development of an acute toxicity test with the marine copepod *acartia sinjiensis.*** Australasian journal of ecotoxicology. v. 12, p. 73 – 81. 2006.

RUPPERT, E. & BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados.** 6ª ed., Roca Ed., São Paulo. 1029 p. 1996.

SILVA, P.P.G.; DUARTE, L.F.A.; PINHEIRO, M.A.A. **Contaminação por metais (cd, cu, pb, cr, mn e hg) e avaliação do impacto genotóxico em *ucides cordatus* (linnaeus, 1763) (brachyura, ucididae), em dois manguezais paulistas.** XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Porto de Galinhas – PE. Anais XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. 2012.

SOUSA, E.C.P.M.; ZARONI, L.P.; BERGMANN FILHO, T.U.; MARCONATO, L.A.; KIRSCHBAUM, A.A.; GASPARRO, M.R. **Acute sensitivity to *Nitokra* sp benthic**

copepod to potassium dichromate and ammonia chloride. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. v. 7. n. 1. p. 75-81. 2012

STOLL, J.M.A., POIGER, T.F., LETTER, A.F., STURN, M. E GIGER, W. **Fluorescent whitening agents as molecular markers for domestic wastewater in recent sediments of Greifensee Switzerland.** In: Eganhouse, R.P. (Eds.), Molecular Markers in Environmental Geochemistry, ACS Symposium Series 671, American Chemical Society: Washington, DC. (1997) pp. 231–241.

STROM, D.; RALPH, P. J.; STAUBER, J. L. **Development of a Toxicity Identification Evaluation Protocol Using Chlorophyll-*a* Fluorescence in a Marine Microalga**. Arch Environ Contam Toxicol. v. 56. p. 30–38. 2009.

STRONKHORST, J.; SCHOT, M.E.; DUBBELDAM,M.C; HO, K.T. **A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents.** Marine Pollution Bulletin, v. 46 p. 56–64, 2003.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).**Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I, II, and III**. Guidance Document EPA/600/R-07/080 Office of Research and Development. Washington, DC, 2007.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). **Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual**. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.EPA-823-B-01-002. 2001. Disponível em: http://www.epa.gov/waterscience/cs/collectionmanual.pdf

US. Environmental Protection Agency (USEPA). **Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants.** Office of Wastewater Management U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460. 1999.

US Environmental Protection Agency. **Marine toxicity identification evaluation (TIE). Phase I guidance document**. EPA 600/ R-96/054. 1996. Disponível em: http://www.epa.gov/waterscience/cs/collectionmanual.pdf

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity.** EPA/600/R-92/080. United States Environmental Protection Agency. Office of Research and Development Wahington, DC. 1993.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures**. 2nd Ed. EPA/600/6-91/003. Environmental Research Laboratory. Office of Research and Development. Duluth, MN, 1991.

VAZQUEZ, L.C. **Unraveling a municipal effluent's toxicity to tripneustes gratilla sperm fertilization.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 32. No. 6. p. 1382–1387. 2013

VERRIOPOULOS, G.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. **Differentiation of the Sensitivity to Copper and Cadmium in Different Life Stages of a Copepod.** Marine Pollution Bulletin. v. 13, nº 4, p. 123 – 125. 1982.

ZHANG, L.J.; YING, G.G.; CHEN, F.; ZHAO, J.L.; WANG, L.; FANG, Y. **Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae pseudokirchneriella subcapitata.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 31, No. 2, p. 377–386, 2012.

WALLER, W.T.; BAILEY, H.A.; VLAMING, V. de; HO, K.T.; HUNT, J.W.; MILLER, J.L.; PILLARD, D.A.; ROWLAND, C.D.; VENABLES, B.J. **Ambient water, porewater and sediment.** In: Noberg-King, T.J.; Ausley, L.W.; Burton, D.T.; Goodfelow, W.I., Miller, J.I.; Waller, W.T. Toxicity reduction and toxicity identification evaluations for

effluents, ambient, and other aqueous media. Pensacola FL, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). 2005. p. 93.

WANG, X.; SHEN, L.; YU, H.; WANG, D. **Toxicity evaluation in a paper recycling mill effluent by coupling bioindicator of aging with the toxicity identification evaluation method in nematode *Caenorhabditis elegans.*** Journal Environmental Sciences. v. 20, p. 1373 – 1380. 2008.

WARD, D.J.; PEREZ-LANDA, V.; SPADARO, D.A.; SIMPSON, S.L.; JOLLEY, D.F. **An Assessment of Three Harpacticoid Copepod Species for Use in Ecotoxicological Testing.** Arch Environ Contam Toxicol. V. 61, p. 414 – 425. 2011.

WATANABE, H.; NAKAJIMA, F.; KASUGA, I.; FURUMAI, H. **Application of whole sediment toxicity identification evaluation procedures to road dust using a benthic ostracod *Heterocypris incongruens*.**

WESTON, D.P.; LYDY M.J. **Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California**. Environmental Science and Technology, v. 44 n. 5 p. 1833–1840, 2010.

WOLLENBERGER, L.; BREITHOLTZB, M.; KUSKA, K.O.; BENGTSSONB, B.E. **Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances.** The science of the total environment. v. 305, p. 53 – 64. 2003.

ZARONI, L.P. **Avaliação da qualidade dos sedimentos marinhos e estuarinos no município de Bertioga – SP.** Tese de doutorado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 2006.