

A precisão de testes de toxicidade com *Daphnia*¹

Eduardo Bertoletti²
Marion G. Nipper²
Neili Peixoto Magalhães²

RESUMO Com a finalidade de avaliar a precisão analítica de testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, foram utilizados cinco sais de metal e sete efluentes líquidos industriais. A variabilidade intralaboratorial, expressa em coeficiente de variação (C.V.), foi de 27,3% para testes com HgCl_2 ; 21,7% com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 10,4% com $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; e 15,4% para os testes com $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A precisão analítica interlaboratorial foi expressa pelo C.V. de 14,4% para testes com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e C.V. de 14,0% para os testes com efluentes industriais. Os coeficientes de variação obtidos indicam uma boa precisão dos testes de toxicidade com *Daphnia similis*, o que os torna adequados para uso rotineiro no controle de agentes químicos que serão dispostos em recursos hídricos.

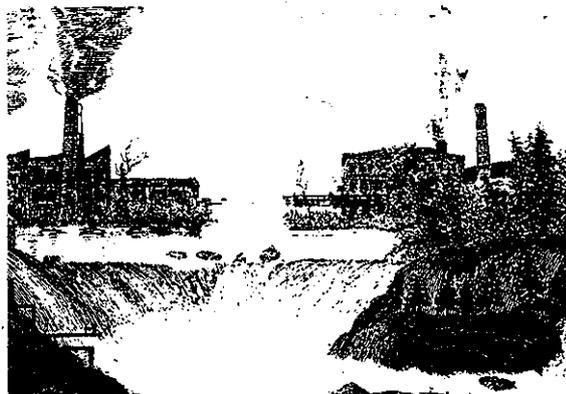
Palavras-chave: precisão analítica, coeficiente de variação, teste de toxicidade, *Daphnia similis*.

ABSTRACT Acute toxicity tests with *Daphnia similis* have been run with the objective of evaluating their analytical precision, five metal salts and seven liquid industrial effluents have been used with this purpose. The intralaboratory analytical precision, expressed as coefficient of variation (C.V.) was of 27.3% for tests with HgCl_2 , 21.7% for $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10.4% for $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 15.4% for $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

The interlaboratory analytical precision showed C.V. of 14.4% for tests with $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and of 14.0% for the tests with industrial effluents. These coefficients of variation values indicate a good precision of the toxicity tests with *Daphnia similis*, showing that they are adequate as routine tests for the control of chemicals to be disposed in water bodies.

Key-words: Analytical precision, coefficient of variation, toxicity tests, *Daphnia similis*.

Até meados da década de 80 as análises físico-químicas foram, predominantemente, utilizadas para caracterizar os poluentes contidos em efluentes líquidos. Em função dessa caracterização, os órgãos de controle da poluição têm exigido a adequação dos parâmetros que, eventualmente, não atendam à legislação vigente. No entanto, alguns estudos demonstraram que o atendimento aos padrões da legislação, em termos de análises físico-químicas, não é suficiente para evitar a toxicidade de um efluente líquido a organismos aquáticos (BERTOLETTI, 1990).



Assim, recentemente, os testes de toxicidade começaram a fazer parte das análises requisitadas para caracterizar um efluente líquido, sendo que tais testes são capazes de detectar os efeitos tóxicos resultantes das interações das substâncias presentes na amostra como um todo. Portanto, considerando o uso dos testes de toxicidade como instrumento necessário para as ações de controle da poluição hídrica, é importante que se conheça a precisão analítica desses testes, de modo a avaliar a variabilidade dos resultados obtidos, tanto em um determinado laboratório como entre vários outros envolvidos na execução de testes de toxicidade, evidenciando dessa forma a confiabilidade dos métodos utilizados (BERTOLETTI et alii, 1989).

No presente estudo, com o objetivo de avaliar a precisão analítica de um dos métodos normalizados no Estado

1 — Trabalho elaborado com o apoio do PROCOP, dentro de seu Programa de Assistência Técnica, Projeto Capacitação Técnica de Recursos Humanos
2 — Biólogos da CETESB

de São Paulo, utilizaram-se microcrustáceos da espécie *Daphnia similis*, que foram submetidos a testes de toxicidade aguda com diferentes agentes químicos e efluentes industriais.

Materiais e Métodos

Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram efetuados de acordo com CETESB (1986). Nestes testes foi utilizada água de diluição reconstituída, com pH = 7,2 a 7,6 e dureza total = 40 a 48 mg/L em CaCO₃. Os resultados dos testes de toxicidade foram expressos em CE(I)50;24h, isto é, a concentração nominal do agente tóxico (substância química ou efluente industrial) que causa imobilidade a 50% dos organismos-teste, em 24 horas de exposição. A análise estatística dos dados, para a determinação da CE(I)50;24h, foi efetuada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et alii, 1977).

Os agentes tóxicos utilizados nas séries de testes foram: cloreto de mercúrio p.a. (HgCl₂); sulfato de cobre p.a. (CuSO₄ · 5H₂O); sulfato de níquel p.a. (NiSO₄ · 6H₂O); sulfato de zinco p.a. (ZnSO₄ · 7H₂O); dicromato de potássio p.a. (K₂Cr₂O₇); e efluentes líquidos de sete indústrias.

Os testes de toxicidade, com cada substância química, foram efetuados simultaneamente, na maioria dos casos, ou em duas ocasiões distintas no Laboratório do Setor de Ensaios Biológicos e Toxicologia (NAHE). Os testes com K₂Cr₂O₇ e efluentes industriais foram executados, simultaneamente, no Laboratório do NAHE e no Laboratório da Regional de Taubaté (CTLA), ambos da CETESB.

As soluções-estoque de K₂Cr₂O₇ foram preparadas no Laboratório do NAHE e enviadas para o CTLA, juntamente com a indicação dos volumes a serem utilizados nos testes de toxicidade. As referidas soluções foram numeradas de forma a não permitir aos técnicos executantes, de ambos os laboratórios, a identificação da substância bem como suas concentrações. As amostras de efluentes indus-

triais foram coletadas pelo CTLA, sendo que os testes de toxicidade foram realizados, no máximo, 24 horas após a coleta. As concentrações de efluentes utilizadas nos testes foram determinadas com base nos testes preliminares executados pelo CTLA.

Para o cálculo do coeficiente de variação dos resultados dos testes de toxicidade com *Daphnia similis* foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C.V. = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}}$$

onde:

C.V. = coeficiente de variação, em %

s = desvio-padrão dos valores de CE(I)50, em mg/L ou %

\bar{X} = média das CE(I)50;24h, em mg/L ou %

Os coeficientes de variação interlaboratorial foram obtidos pelo cálculo da média aritmética dos coeficientes determinados para cada amostra testada.

Resultados

Na Tabela 1, constam os resultados dos testes de toxicidade com *Daphnia similis*, após a exposição dessa espécie a quatro dos sais testados. A precisão analítica intralaboratorial, expressa como coeficiente de variação (C.V.), foi de 27,3% para os testes com HgCl₂; de 21,7% com CuSO₄ · 5H₂O; de 10,4% com NiSO₄ · 6H₂O e de 15,4% com ZnSO₄ · 7H₂O.

Na Tabela 2, são apresentados os resultados dos testes de toxicidade com K₂Cr₂O₇, os quais forneceram um coeficiente de variação interlaboratorial de 14,4%. Da mesma forma, os resultados que constam na Tabela 3 indicam um coeficiente de variação interlaboratorial de 14,0% para os testes de toxicidade com efluentes industriais.

Tabela 1 — Resultados dos testes de toxicidade aguda a *Daphnia similis* e coeficientes de variação intralaboratorial, obtidos nas séries estudadas

Teste nº	CE(I)50;24h (em mg/L)			
	HgCl ₂	CuSO ₄ ·5H ₂ O	NiSO ₄ ·6H ₂ O	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	0,011	0,022	13,8	2,8
2	0,010	0,019	14,6	2,4
3	0,012	0,020	13,8	2,1
4	0,007	0,020	11,3	2,2
5	0,015	0,024	-(a)	2,4
6	0,015	0,020	-	3,1
7	0,012	0,034	-	3,2
8	0,006	0,023	-	-
\bar{X}	0,011	0,023	13,4	2,6
s	0,003	0,005	1,4	0,4
C.V.(%)	27,3	21,7	10,4	15,4

(a) — indica teste não efetuado

Tabela 2 — Resultados dos testes de toxicidade aguda com $K_2Cr_2O_7$, utilizando *Daphnia similis*, e coeficiente de variação interlaboratorial obtido

Data do Teste	CE(I)50;24h (em mg $K_2Cr_2O_7$ /L)		Coeficiente de Variação (%)
	Laboratório NAHE	Laboratório CTLA	
12.09.89	0,13	0,11	11,7
20.09.89	0,15	0,09	35,0
27.09.89	0,07	0,06	10,8
11.10.89	0,05	0,05	0
24.10.89	0,09	-(a)	-
08.11.89	0,17	-	-
Coeficiente de variação interlaboratorial = 14,4%			

(a) — indica teste não efetuado

Tabela 3 — Resultados dos testes de toxicidade aguda com efluentes industriais, utilizando *Daphnia similis*, e coeficiente de variação interlaboratorial obtido

Efluente	CE(I)50;24h (% de efluente)		Coeficiente de Variação %
	Laboratório NAHE	Laboratório CTLA	
A	6,23	7,07	8,9
B	94,0	97,6	2,7
C	I.T.(a)	97,0	N.C.(c)
D	23,8	31,3	19,2
E	17,5	14,4	13,7
F	27,6	39,8	25,6
G	N.T.(b)	I.T.	N.C.
Coeficiente de variação interlaboratorial = 14,0%			

(a) I.T. = Indícios de toxicidade aguda, isto é, baixa porcentagem de imobilidade na maior concentração testada (90%)

(b) N.T. = Não apresentou toxicidade

(c) N.C. = Não calculável

Discussão

Geralmente, os métodos analíticos possuem informações quanto ao nível de precisão e/ou exatidão dos resultados que podem ser atingidos pela sua utilização. Isto posto, é importante definir, claramente, o significado destes indicadores de qualidade analítica.

Segundo definição do "Standard Methods" (APHA, 1989), a precisão refere-se à medida do grau de concordância entre análises em réplica de uma amostra, enquanto que a exatidão diz respeito à proximidade do valor medido em relação a um valor verdadeiro.

Tendo em mente essas definições, pode-se afirmar que a exatidão dos resultados de testes de toxicidade não pode ser determinada. Isto ocorre, pois existem, normalmente, variações biológicas entre indivíduos de uma mesma espécie, fato que dificulta a identificação de erros sistemáticos inerentes ao procedimento analítico. Por exemplo, fatores do acaso não controláveis, como a sensibilidade individual

dos organismos, não possibilitam obter concentrações efetivas idênticas após vários experimentos. Conseqüentemente, não existe um valor (ou concentração) exato (ou de referência) de um agente químico que cause um efeito tóxico específico.

Assim, os resultados de testes de toxicidade com organismos aquáticos permitem estimar, apenas, a precisão do método utilizado. No presente estudo, a precisão analítica dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foi semelhante à observada por outros autores, os quais utilizaram outras espécies de cladóceros.

Com referência à precisão intralaboratorial, o coeficiente de variação de 27,3% para os testes com $HgCl_2$ (Tab. 1) está bastante próximo daquele de 23,5% verificado nos estudos de CANTON & ADEMA (1978) com *Daphnia magna*. Para os testes com $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ obteve-se um C.V. = 21,7% (Tab. 1), que está bem próximo daquele de 26,7%, obtido por INGERSOLL & WINNER (1982), em testes de toxicidade com *Daphnia pulex*, com duração de 24 ho-

ras utilizando o cobre. Por outro lado, em estudo desenvolvido por LeBLANC (1982) constatou-se um coeficiente de variação bem mais elevado, de 52,3%, para as CE50;48h determinadas em testes com *Daphnia magna* frente ao cobre.

Outros estudos de precisão analítica intralaboratorial, executados com outras substâncias, revelam coeficientes de variação bem maiores. LEWIS & WEBER (1985), por exemplo, determinaram coeficientes que oscilaram entre 36,5% e 39,6% para dodecil sulfato de sódio; entre 32,1% e 33,5% para pentaclorofenato de sódio; e entre 45,0% e 81,8% para cádmio, para as CE50;24h de testes com *D. magna* e *D. pulex*.

Ao contrário dos estudos citados, os coeficientes de variação intralaboratorial para $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram baixos, de 10,4% e 15,4%, respectivamente. Esses coeficientes foram menores do que os determinados para as outras substâncias estudadas (Tab. 1), sendo possível verificar que todos os dados de precisão analítica demonstrados são menores do que 27,3%. Vale ressaltar que tais dados estão muito próximos do intervalo de coeficientes de variação (C.V. = 5% a 25%) aceitáveis para análises físico-químicas (FREDRICKSSON & ROMÁN, 1985).

Para os testes com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e efluentes industriais (Tabs. 2 e 3), não foi calculada a variabilidade intralaboratorial, pois os testes foram executados em datas diferentes. Caso esse aspecto não fosse considerado, os coeficientes de variação expressariam valores elevados que caracterizam, além da precisão analítica inerente ao método, as variações temporais na sensibilidade dos organismos.

Com relação à precisão interlaboratorial dos testes de toxicidade com *Daphnia similis*, verifica-se, através das Tabelas 2 e 3, que independentemente dos agentes tóxicos testados os coeficientes de variação foram semelhantes, ao redor de 14,0%. Comparando o coeficiente de variação obtido nos testes com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (C.V. = 14,4%) e o determinado na Norma I.S.O. (1982), C.V. = 39%, constata-se que no presente estudo tal coeficiente foi excelente. Uma possível explicação para tal diferença seria o fato de que, na norma citada, cerca de 46 laboratórios foram envolvidos nos estudos de precisão interlaboratorial de testes com *Daphnia magna*, resultando, naturalmente, em uma maior variabilidade dos dados.

Outros autores, utilizando *Daphnia*, obtiveram coeficientes mais elevados em estudos interlaboratoriais com substâncias químicas puras. BRODERIUS (apud PELTIER & WEBER, 1985) obteve C.V. de 71% para testes com nitrato de prata e de 51% para o praguicida endosulfan, enquanto NEBEKER (1982) constatou valores de C.V. de 144% para testes com prata e de 47,5% para o mesmo praguicida. Através da análise do trabalho de CANTON & ADEMA (1978), verificaram-se coeficientes de variação de 25%, em média, para 15 substâncias com diferentes propriedades químicas, sendo que tais coeficientes variaram de 4,0% a 52,0%.

Quanto aos resultados dos testes com efluentes industriais (Tab. 3), verifica-se que os valores de CE(I)50;24h foram variáveis, caracterizando assim a toxicidade de efluentes líquidos de diferentes indústrias. Para a determinação do coeficiente e variação interlaboratorial, foram utilizados os resultados dos cinco efluentes que apresentaram valores de CE(I)50 mensuráveis, em ambos os laboratórios. Deve-se notar, no entanto, que os efluentes C e G apre-

sentaram níveis de toxicidade muito próximos, porém, não foram utilizados no cálculo estatístico.

Deve-se destacar, ainda, que o coeficiente obtido para os testes com efluentes foi menor do que os determinados em outros estudos. GROTHE & KIMERLE (1985), por exemplo, obtiveram coeficientes de variação interlaboratorial de 33% em testes com *Daphnia magna*, com 24 e 48 horas de duração, num estudo que envolveu nove laboratórios.

RUE et alii (1988), em uma revisão de 14 séries de testes de toxicidade com efluentes, utilizando *Daphnia*, determinaram um coeficiente de variação interlaboratorial inferior a 20% para 10 das séries analisadas. Em função dos resultados obtidos, os autores acima concluíram que os níveis de precisão analítica, tanto dos métodos químicos como dos testes de toxicidade, estão em uma mesma faixa de variabilidade.

Conclusões

Em suma, os resultados dos testes de toxicidade com *Daphnia similis*, utilizando substâncias de grau analítico e efluentes industriais, demonstram uma variabilidade semelhante aos testes desenvolvidos com espécies usadas em outros países. Através desse estudo foi verificado que uma boa precisão é possível de ser obtida, desde que os procedimentos analíticos sejam claramente definidos e fielmente executados. Esses aspectos tornam-se relevantes quando se pretende manter um controle de qualidade analítica dos resultados gerados, seja a nível interno de um laboratório como, também, em estudos destinados a verificar a precisão analítica de laboratórios distintos.

Em função dos resultados obtidos, no presente estudo, fica evidente que o teste de toxicidade aguda com *Daphnia* pode ser considerado um método analítico fidedigno, para o controle das emissões de agentes químicos e efluentes líquidos que, eventualmente, venham a atingir os recursos hídricos.

Referências bibliográficas

- APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 17ª Ed. AWWA/WPCF. Washington. p.i. 1989.
- BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. *Ciência e Cultura*, 42(3/4):271-277. 1990.
- BERTOLETTI, E.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P.A. Variabilidade de testes de toxicidade com peixes. *Ambiente*, 3(1):52-58. 1989.
- CANTON, J.H. & ADEMA, D.M.M. Reproducibility of short-term and reproduction toxicity experiments with *Daphnia magna* and comparison of the sensitivity of *Daphnia magna* with *Daphnia pulex* and *Daphnia cucullata* in short-term experiments. *Hydrobiologia*, 59(2):135-140. 1978.
- CETESB. Água — Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Norma Técnica nº L5.018. São Paulo. 1986.
- FREDRICKSSON, E.W. & ROMÁN, F.J. Processamento de dados do controle de qualidade analítica de laboratórios químicos de água, *Revista DAE*, 45(143):347-351. 1985.

- GROTHER, D.R. & KIMERLE, R.A. Inter and Intralaboratory variability in *Daphnia magna* effluent toxicity test results. *Env. Toxicol. and Chem.*, 4:189-192. 1985.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C. and THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11(7):714-719. 1977.
- INGERSOLL, C.G. & WINNER, R.W. Effect on *Daphnia pulex* (De Geer) of daily pulse exposures to copper or cadmium. *Environ. Tox. and Chem.*, 1:321-327. 1982.
- I.S.O. (International Organization for Standardization). Water Quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). *International Standard ISO 6341 — 1982 (E)*. 1982.
- LeBLANC, G.A. Laboratory investigation into development of resistance of *Daphnia magna* to environmental pollutants. *Environ. Pollution (Series A)*, 27(4):309-322. 1982.
- LEWIS, P.A. & WEBER, C.I. A study of the reliability of *Daphnia* acute toxicity tests. In: R.D. Cardwell, R. Purdy and R.C. Bahner (Eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. ASTM — STP 854. ASTM. Philadelphia, 1985. p. 73-86.
- NEBEKER, A.V. Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. *Water Research*, 16(5):739-744. 1982.
- PELTIER, W.H. & WEBER, C.I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms (3rd ed.). *U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati*. EPA/600/4-85/013. 216p. 1985.
- RUE, W.J. et alii. A review of inter and Intralaboratory effluent toxicity test method variability. In: W.J. Adams, G.A. Chapman, and W.G. Landis (Eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. ASTM-STP 971. ASTM. Philadelphia, 1988. p. 190-203.

