

# Variabilidade de testes de toxicidade com peixes<sup>1</sup>

Eduardo Bertoletti<sup>2</sup>  
Elenita Gherardi Goldstein<sup>2</sup>  
Pedro Antonio Zagatto<sup>2</sup>

**RESUMO** Com o objetivo de avaliar a variabilidade da CL(1)50: 96h (concentração letal a 50% dos organismos), foram efetuados testes de toxicidade aguda com o peixe *Brachydanio rerio*, pelo sistema de fluxo contínuo, com seis diferentes substâncias. A precisão dos resultados, expressa como coeficiente de variação, foi a seguinte:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  = 17,8%;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 19,9%;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  = 11,6%;  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$  = 12,7%; DDT grau técnico = 24,3% e  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  = 12,6%.

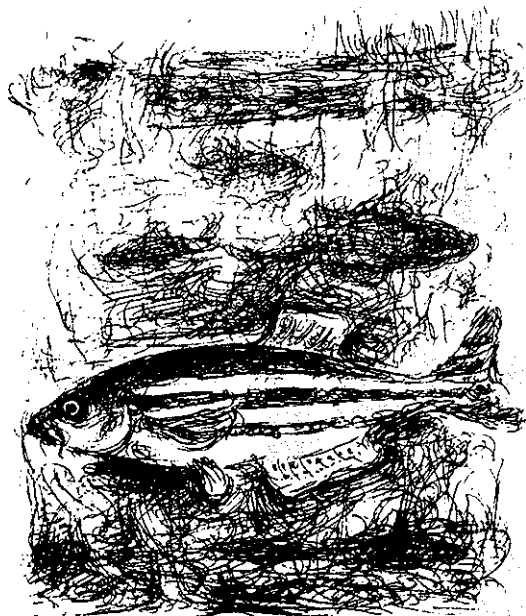
Os coeficientes de variação obtidos situaram-se em um nível considerado satisfatório, o que assegura a validade da utilização do sistema para avaliar a toxicidade de agentes químicos a peixes.

**Palavras-chave:** Precisão analítica, peixes, teste de toxicidade, variabilidade.

**ABSTRACT** Several acute toxicity tests were run with *Brachydanio rerio*, in flow-through system, with each of six different chemicals, in order to evaluate the variability of 96h - LC(1)50. The precision of the results, expressed as coefficient of variation, was of 17.8% for  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 19.9% for  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 11.6% for  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 12.7% for  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ , 24.3% for DDT technical grade and 12.6% for  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . These coefficients of variation were acceptable, assuring the validity of this system for the evaluation of the toxicity of chemicals to fishes.

**Key words:** Analytical precision, fishes, toxicity tests, variability.

O controle da poluição hídrica tem exigido o desenvolvimento de um grande número de métodos analíticos que, em função da complexidade e do grande número de novas substâncias, tendem a se tornar ainda mais numerosos.



Tradicionalmente, as análises físico-químicas são as mais utilizadas na caracterização de resíduos líquidos, tanto de origem industrial como doméstica, porém, análises biológicas, tais como os testes de toxicidade com organismos aquáticos, têm sido cada vez mais utilizadas no controle de despejos que podem causar impacto ao ambiente aquático (Cetesb, 1986 a, b).

Sejam quais forem as análises escolhidas com a finalidade de controle da poluição é desejável, quando possível, avaliar a precisão dos resultados obtidos, possibilitando assim a comparação desses resultados, bem como estimar a confiabilidade do método utilizado. Nesse sentido, para várias análises físico-químicas já foram estabelecidos valores de precisão intra e interlaboratoriais (Cetesb, 1978 a).

Com referência aos testes de toxicidade, poucos dados de precisão analítica estão disponíveis, principalmente devido à sua recente utilização. Assim, neste trabalho, procurou-se avaliar a precisão dos resultados obtidos através de um dos métodos empregados para avaliação da toxicidade aguda, pelo sistema de fluxo-contínuo com peixes e, ainda, comparar estes resultados a outros descritos na literatura especializada.

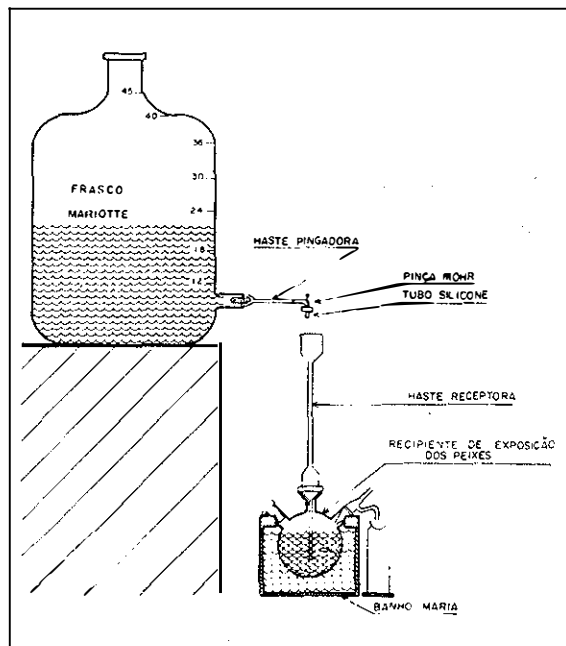
Os dados apresentados neste artigo foram gerados em

<sup>1</sup> Trabalho elaborado com o apoio do PROCOP, dentro de seu Programa de Assistência Técnica, Projeto Capacitação Técnica de Recursos Humanos.

<sup>2</sup> Biólogos da Cetesb.

<sup>3</sup> Bióloga da Cetesb, Mestre pela Escola Paulista de Medicina.

Figura 1 — Vista parcial do sistema de fluxo-contínuo



1978, em seqüência aos publicados por Navas-Pereira et alii (1987), durante o desenvolvimento de um programa internacional de padronização de métodos, coordenado pela International Organization for Standardization (ISO), do qual a Cetesb participou como entidade brasileira indicada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

### Materiais e Métodos

Os testes de toxicidade aguda foram realizados conforme o método estabelecido pela ISO (1975), em sistema de fluxo-contínuo, o qual preconiza o uso de água reconstituída com dureza total de + ou - 100mg/L em  $\text{CaCO}_3$  e a espécie de peixe *Brachydanio rerio* [(Hamilton-Buchanan, 1822), Teleostei, Cyprinidae], cujos lotes foram adquiridos no comércio local. As CL (I) 50-96h (concentração nominal do agente tóxico que causa letalidade a 50% dos organismos em 96 horas de exposição) foram obtidas através da análise de regressão linear, conforme a equação:  $\text{CL}(I)50 = a + b \cdot \text{Log}x$ .

As substâncias utilizadas nas séries de testes foram: sulfato de cobre p.a. ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ); sulfato de zinco p.a. ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); cloreto de amônio p.a. ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); fenol p.a. ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ); dicromato de potássio p.a. ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), e DDT grau técnico (54%). Para a solubilização do DDT em água foi utilizada acetona p.a..

As medidas de temperatura e pH foram efetuadas diariamente, enquanto que a determinação de oxigênio dissolvido (OD) e as análises químicas das substâncias testadas foram realizadas 48 horas após o início dos testes. Para a renovação das soluções foram utilizados frascos Mariotte (45 litros), nos quais, diariamente, houve reposição das soluções-teste (Fig. 1).

Os valores de pH foram obtidos pelo método eletroquímico, utilizando-se o potenciômetro METROHM — E588. Os teores de OD foram determinados pelo método de Winkler modificado (Cetesb, 1978) e as análises

químicas das substâncias testadas foram efetuadas conforme Cetesb (1978).

A variabilidade dos resultados nas seis séries de testes efetuadas, foi avaliada pelo coeficiente de variação de Pearson, conforme a expressão:

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

onde:

C. V. = coeficiente de variação, expresso em porcentagem

s = desvio padrão dos valores de CL (I)50, em mg ou  $\mu\text{g/L}$ .

$\bar{X}$  = média dos valores de CL(I)50, em mg ou  $\mu\text{g/L}$ .

A análise de regressão múltipla entre os dados de CL (I)50, peso e comprimento dos organismos, temperatura, pH e oxigênio dissolvido, foi efetuada através do "Statistical Analysis Package (Statpac)" da Walonic Associates Inc. Para ajuste dos modelos de regressão linear múltipla, foi empregada a técnica de "stepwise", que leva em consideração a estrutura de interrelação entre as variáveis, pois esta trabalha com a matriz de correlação.

### Resultados

Na Tabela 1, constam os resultados dos testes de toxicidade aguda com *Brachydanio rerio*, expressos em CL(I)50 — 96h, das substâncias estudadas e os coeficientes de variação para cada série de testes. Verifica-se que os coeficientes de variação foram baixos para os resultados dos testes com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (11,6%),  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (12,6%) e fenol (12,7%), enquanto que para os resultados dos testes com  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e DDT, os coeficientes foram de 17,8%; 19,9% e 24,3%, respectivamente.

Nas tabelas 2 a 7, constam os dados das variáveis bióticas e abióticas nos diversos testes, que foram utilizadas nas análises de regressão múltipla.

### Discussão

Na aplicação dos testes de toxicidade, no controle da poluição hídrica, substâncias consideradas como de referência têm sido utilizadas para avaliar a sensibilidade de organismos aquáticos ao longo do tempo (Peltier & Weber, 1985). Além dessa finalidade, Buikema et alii (1982) afirmaram que a utilização de substâncias de referência num método padronizado aumenta sua confiabilidade.

No presente estudo, para avaliar a precisão dos resultados dos testes de toxicidade com peixes, através do sistema de fluxo contínuo, utilizou-se algumas substâncias de referência, que são normalmente recomendadas, tais como: fenol, sulfato de cobre (Alexander & Clarke, 1978) e dicromato de potássio (OECD, 1981; ISO, 1982). Além dessas, outras substâncias foram testadas devido às suas características toxicológicas distintas: sulfato de zinco, cloreto de amônio e DDT grau técnico (54%).

Verifica-se que, dentre os resultados de CL (I)50, os dos testes com DDT foram os que apresentaram uma maior variação entre si, mas não excederam a + ou - 2 desvios padrão da CL (I)50 média, de acordo com os limites estabelecidos por Peltier & Weber (1985).

Comparando-se os coeficientes de variação obtidos com outros pesquisados na literatura, observa-se que os valores de sulfato de cobre foram mais elevados em relação aos citados por Sprague (1985), que descreveu um C.V. = 9,2% para uma série de testes com trutas expostas ao cobre.

Alexander & Clarke (1978), utilizando fenol através de testes de fluxo-contínuo com 48 horas de duração, obtiveram coeficientes de variação de 9,5 e 9,9% nos resultados de testes com diferentes lotes de trutas, valores estes próximos aos apresentados para a mesma substância no presente trabalho (12,7%).

Em testes de toxicidade realizados pelo IRCHA (1982) com  $K_2Cr_2O_7$ , em sistema estático, com período de teste de 24 horas de duração, foram relatados coeficientes de 7,6 e 6,1% nos resultados de experimentos com *Brachydanio rerio* e *Salmo gairdneri*, respectivamente. Através desses dados, verifica-se que os valores de C.V. em testes com  $K_2Cr_2O_7$  estão abaixo dos obtidos na Tabela 1; entretanto, deve-se considerar que, além da diferença metodológica, o tempo de exposição dos organismos nos referidos testes foi menor, fatos que podem ter contribuído para os reduzidos coeficientes de variação obtidos.

Analisando os resultados de testes de fluxo-contínuo com  $NH_4Cl$ , de 96 horas, apresentados por Thurston & Russo (1983), verificou-se que o coeficiente de variação foi de 25,7%; porém, as CL50 para a espécie testada (*Salmo gairdneri*) estavam na dependência do peso dos organismos e temperatura das soluções, fato que dificultou a comparação com os dados de precisão aqui demonstrados. Entretanto, analisando-se os dados da referida pesquisa, constatou-se que o coeficiente de variação foi reduzido a 20,4%, quando os resultados dependentes da temperatura foram desprezados. Através dessa observação, nota-se que a variação de condições abióticas, a exemplo da temperatura, pode influenciar sobremaneira na precisão dos testes de toxicidade, sendo que neste tipo de análise biológica outras variáveis devem ser controladas, a fim de se obter uma precisão satisfatória.

Fredricksson & Román (1985) destacaram que o controle intralaboratorial consiste na estimativa da precisão dos resultados analíticos, bem como na identificação das possíveis fontes de erros sistemáticos. Portanto, do mesmo modo, num teste de toxicidade devem ser verificadas aquelas variáveis que podem interferir na precisão analítica do método.

Sprague (1985) sugeriu que essas variáveis devem ser cuidadosamente interpretadas em cada experimento. Dentre elas devem ser consideradas as bióticas, tais como a sensibilidade da espécie em estudo, estágio vital e tamanho dos organismos e, ainda, as variáveis abióticas como temperatura, OD, pH e dureza da água.

Desse modo, no presente estudo, procurou-se identificar as possíveis fontes de variação que pudessem alterar as CL(1)50-96h obtidas. Para tanto, utilizou-se análises de regressão múltipla, considerando a ocorrência simultânea dos eventos, nas quais a variável dependente foi a CL(1)50 determinada, sendo consideradas como variáveis independentes o peso, comprimento padrão, temperatura, pH e OD. Nesta análise foram correlacionados, para cada teste, os valores das CL(1)50-96h (Tab. 1) e as médias das variáveis mencionadas que apresentaram flutuações ao longo das séries, conforme demonstrado nas Tabelas de 2 a 7.

Pela análise de regressão múltipla, verificou-se não haver dependência das CL(1)50-96h obtidas em relação ao conjunto das variáveis estudadas ( $P < 0,05$ ), indicando que estas não contribuíram para os coeficientes de variação obtidos (Tab. 1). Entretanto, uma correlação possivelmente significativa foi detectada na série de testes com  $K_2Cr_2O_7$  ( $r_2 = 0,97$  e  $P = 0,07$ ), devido particularmente às oscilações nos teores de oxigênio dissolvido.

Outro aspecto que foi considerado neste trabalho refere-se à utilização de concentrações nominais dos agentes tóxicos para os cálculos de CL(1)50, que poderiam não estar refletindo as concentrações reais a que os organismos estariam expostos. Neste sentido, análises químicas foram efetuadas, uma vez ao menos, nas várias

Continua na pág. 58

Tabela 1 — Resultados dos testes de toxicidade aguda a *Brachydanio rerio* e coeficientes de variação das séries estudadas

TESTE	CL(1)50-96h mg/L					
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$NH_4Cl$	$C_6H_5OH$	DDT Grau Técnico(54%)*	$K_2Cr_2O_7$
1	0,75	134,9	331,0	33,9	16,0	94,0
2	0,67	100,0	290,0	29,5	9,0	144,0
3	0,52	75,9	282,0	27,5	9,5	125,0
4	0,52	87,1	290,0	27,5	7,6	120,0
5	0,56	79,4	315,0	27,5	11,0	120,0
6	0,70	109,6	265,0	25,1	9,0	132,0
7	0,51	109,6	380,0	25,7	12,0	132,0
8	0,43	93,5	331,0	26,3	8,5	132,0
9	0,47	—	331,0	25,1	9,0	151,5
10	0,54	—	268,5	20,9	12,0	116,0
n	10	8	10	10	10	10
x	0,57	96,7	308,4	26,8	10,3	126,7
s	0,10	19,3	35,8	3,4	2,5	16,0
c.v.(%)	17,8	19,9	11,6	12,7	24,3	2,6

\* valores em  $\mu g/L$

Tabela 2 — Variáveis bióticas e abióticas analisadas nos testes de toxicidade com  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

TESTE	ORGANISMO-TESTE		SOLUÇÃO-TESTE		
	Peso médio, em gramas (Amplitude)	Comprimento padrão médio, em centímetros (Amplitude)	Temperatura média, °C (Amplitude)	pH médio (Amplitude)	O.D. médio, em mg/L (Amplitude)
1	0,26 (0,11 a 0,56)	2,6 (1,9 a 3,2)	23,5 (23,0 a 23,5)	8,1 (8,0 a 8,2)	7,5 (7,4 a 7,6)
2	0,24 (0,12 a 0,41)	2,5 (2,0 a 2,8)	23,0 (23,0 a 23,0)	8,2 (8,1 a 8,2)	7,6 (7,5 a 7,6)
3	0,22 (0,12 a 0,45)	2,3 (1,8 a 3,0)	22,8 (22,0 a 24,0)	7,9 (7,8 a 8,1)	7,7 (7,4 a 7,9)
4	0,23 (0,12 a 0,39)	2,3 (1,9 a 2,7)	22,7 (22,0 a 24,0)	8,0 (7,8 a 8,1)	7,7 (7,7 a 7,8)
5	0,24 (0,12 a 0,39)	2,2 (1,9 a 2,8)	23,4 (23,0 a 24,0)	7,9 (7,6 a 8,1)	7,6 (7,3 a 7,9)
6	0,22 (0,13 a 0,41)	2,2 (1,7 a 3,1)	23,4 (23,0 a 24,0)	7,9 (7,7 a 8,1)	7,5 (7,3 a 7,7)
7	0,35 (0,12 a 0,59)	2,7 (1,8 a 3,2)	23,7 (23,0 a 24,0)	7,8 (7,6 a 8,0)	7,2 (7,0 a 7,3)
8	0,35 (0,14 a 0,54)	2,6 (2,0 a 3,0)	23,7 (23,0 a 24,0)	7,8 (7,6 a 8,0)	7,3 (7,2 a 7,4)
9	0,34 (0,14 a 0,65)	3,0 (2,3 a 3,5)	23,7 (23,5 a 24,0)	7,8 (7,6 a 8,0)	7,5 (7,4 a 7,6)
10	0,31 (0,20 a 0,62)	2,9 (2,5 a 0,35)	22,7 (20,0 a 24,0)	7,8 (7,6 a 8,0)	7,7 (7,6 a 7,8)

Tabela 3 — Variáveis bióticas e abióticas analisadas nos testes de toxicidade com  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

TESTE	ORGANISMO-TESTE		SOLUÇÃO-TESTE		
	Peso médio, em gramas (Amplitude)	Comprimento padrão médio, em centímetros (Amplitude)	Temperatura média, °C (Amplitude)	pH médio (Amplitude)	O.D. médio, em mg/L (Amplitude)
1	0,18 (0,06 a 0,40)	2,1 (1,5 a 2,8)	23,2 (23,0 a 23,5)	7,1 (6,8 a 7,4)	7,2 (6,6 a 7,5)
2	0,22 (0,11 a 0,47)	2,2 (1,8 a 3,0)	23,2 (22,5 a 24,0)	7,2 (6,8 a 7,6)	7,6 (7,5 a 7,7)
3	0,20 (0,08 a 0,37)	2,2 (2,4 a 2,6)	23,2 (22,5 a 24,0)	7,2 (7,0 a 7,4)	7,5 (7,4 a 7,6)
4	0,21 (0,09 a 0,39)	2,2 (1,6 a 2,7)	23,4 (23,0 a 24,0)	7,3 (7,0 a 7,5)	6,9 (6,6 a 7,2)
5	0,26 (0,09 a 0,52)	2,3 (1,6 a 3,0)	23,1 (21,5 a 23,7)	7,2 (7,0 a 7,5)	7,0 (6,8 a 7,1)
6	0,27 (0,20 a 0,39)	2,4 (2,1 a 2,7)	23,6 (23,5 a 24,0)	7,0 (6,9 a 7,2)	7,1 (6,6 a 7,6)
7	0,23 (0,16 a 0,45)	2,4 (2,0 a 2,8)	23,8 (23,5 a 24,0)	7,0 (6,7 a 7,2)	6,9 (6,6 a 7,4)
8	0,22 (0,12 a 0,37)	2,6 (2,1 a 2,9)	23,4 (23,0 a 24,0)	7,8 (7,6 a 7,8)	7,3 (7,2 a 7,3)

Tabela 4 — Variáveis bióticas e abióticas analisadas nos testes de toxicidade com  $NH_4Cl$ 

TESTE	ORGANISMO-TESTE		SOLUÇÃO-TESTE		
	Peso médio, em gramas (Amplitude)	Comprimento padrão médio, em centímetros (Amplitude)	Temperatura média °C (Amplitude)	pH médio (Amplitude)	O.D. médio, em mg/L (Amplitude)
1	0,32 (0,11 a 0,50)	2,8 (2,2 a 3,8)	23,9 (23,5 a 24,0)	7,6 (7,5 a 7,9)	6,9 (6,8 a 7,0)
2	0,33 (0,18 a 0,48)	2,7 (2,3 a 3,0)	23,6 (23,0 a 24,5)	7,6 (7,4 a 7,9)	7,0 (6,9 a 7,2)
3	0,28 (0,11 a 0,5 )	2,6 (1,9 a 3,1)	23,6 (23,0 a 24,0)	7,6 (7,4 a 7,9)	7,0 (6,9 a 7,3)
4	0,30 (0,15 a 0,65)	2,6 (2,2 a 3,2)	23,6 (23,5 a 24,2)	7,6 (7,5 a 7,8)	6,9 (6,8 a 7,2)
5	0,29 (0,16 a 0,40)	2,4 (2,0 a 2,8)	23,4 (22,5 a 24,0)	7,6 (7,4 a 7,8)	Não mensurado
6	0,32 (0,15 a 0,51)	2,8 (2,1 a 3,3)	23,5 (23,0 a 24,0)	7,6 (7,4 a 7,8)	Não mensurado
7	0,23 (0,02 a 0,34)	2,0 (0,9 a 2,6)	23,3 (22,0 a 24,0)	7,6 (7,4 a 7,7)	7,1 (6,8 a 7,2)
8	0,14 (0,04 a 0,26)	1,9 (1,4 a 2,5)	23,5 (23,2 a 24,0)	7,7 (7,5 a 8,0)	7,4 (7,2 a 7,6)
9	0,15 (0,06 a 0,27)	1,9 (1,5 a 2,4)	23,5 (23,0 a 24,0)	7,7 (7,5 a 7,8)	7,1 (7,0 a 7,3)
10	0,25 (0,10 a 0,48)	2,6 (2,0 a 3,4)	23,0 (22,0 a 24,0)	7,6 (7,4 a 8,0)	7,3 (7,2 a 7,4)

Tabela 5 — Variáveis bióticas e abióticas analisadas nos testes de toxicidade com Fenol

TESTE	ORGANISMO-TESTE		SOLUÇÃO-TESTE		
	Peso médio, em gramas (Amplitude)	Comprimento padrão médio, em centímetros (Amplitude)	Temperatura média °C (Amplitude)	pH médio (Amplitude)	O.D. médio, em mg/L (Amplitude)
1	0,15 (0,06 a 0,35)	2,0 (1,6 a 2,5)	23,5 (23,0 a 23,7)	7,9 (7,7 a 8,1)	6,4 (6,1 a 6,6)
2	0,13 (0,04 a 0,31)	1,9 (2,3 a 2,5)	23,4 (23,0 a 24,0)	7,9 (8,0 a 8,1)	6,5 (6,0 a 7,0)
3	0,11 (0,04 a 0,24)	1,8 (1,4 a 2,3)	23,5 (23,0 a 24,5)	8,0 (7,9 a 8,3)	6,7 (6,5 a 6,8)
4	0,11 (0,04 a 0,20)	1,8 (1,4 a 2,3)	23,4 (23,0 a 24,5)	8,1 (7,8 a 8,3)	6,6 (6,2 a 6,9)
5	0,12 (0,05 a 0,24)	1,9 (1,6 a 2,4)	23,0 (22,0 a 23,8)	7,9 (7,7 a 8,1)	6,5 (6,4 a 6,7)
6	0,13 (0,07 a 0,33)	1,9 (1,6 a 2,6)	22,5 (21,5 a 23,5)	7,9 (7,7 a 8,1)	6,7 (6,6 a 7,0)
7	0,24 (0,07 a 0,49)	2,2 (1,5 a 2,8)	23,7 (23,5 a 24,0)	8,0 (7,9 a 8,1)	5,7 (4,7 a 7,5)
8	0,24 (0,11 a 0,49)	2,3 (1,8 a 2,8)	23,7 (23,5 a 24,0)	8,0 (7,8 a 8,1)	4,7 (2,7 a 7,6)
9	0,18 (0,08 a 0,45)	2,1 (1,8 a 2,5)	23,7 (23,5 a 24,5)	8,0 (7,7 a 8,1)	6,7 (6,6 a 7,2)
10	0,30 (0,08 a 0,60)	2,5 (1,7 a 3,1)	23,8 (23,0 a 24,0)	7,5 (7,2 a 7,7)	7,2 (6,0 a 7,6)

Tabela 6 — Variáveis bióticas e abióticas analisadas nos testes de toxicidade com DDT

TESTE	ORGANISMO-TESTE		SOLUÇÃO-TESTE		
	Peso médio, em gramas (Amplitude)	Comprimento padrão médio, em centímetros (Amplitude)	Temperatura média °C (Amplitude)	pH médio (Amplitude)	O. D. médio, em mg/L (Amplitude)
1	0,19 (0,09 a 0,39)	2,0 (1,7 a 2,6)	23,3 (21,3 a 24,0)	8,0 (7,7 a 8,2)	7,2 (6,6 a 7,6)
2	0,29 (0,12 a 0,58)	2,3 (1,7 a 2,9)	23,5 (22,5 a 24,5)	7,8 (7,6 a 8,0)	6,7 (5,4 a 7,4)
3	0,24 (0,14 a 0,45)	2,2 (1,9 a 2,6)	23,0 (22,5 a 23,5)	7,9 (7,7 a 8,2)	6,6 (5,7 a 7,5)
4	0,26 (0,12 a 0,56)	2,3 (1,8 a 2,8)	23,2 (22,5 a 23,5)	8,1 (7,8 a 8,2)	6,0 (5,2 a 6,5)
5	0,17 (0,10 a 0,36)	2,0 (1,7 a 2,4)	23,0 (23,0 a 23,0)	7,9 (7,8 a 8,0)	6,1 (5,1 a 6,7)
6	0,20 (0,13 a 0,29)	2,1 (1,8 a 2,4)	23,6 (23,0 a 24,0)	7,8 (7,7 a 8,0)	6,1 (5,9 a 6,3)
7	0,23 (0,13 a 0,33)	2,2 (1,8 a 2,5)	22,7 (22,0 a 23,0)	7,9 (7,7 a 8,0)	5,9 (4,9 a 6,5)
8	0,24 (0,13 a 0,40)	2,2 (1,8 a 2,6)	23,0 (22,8 a 23,0)	7,9 (7,6 a 8,0)	6,5 (5,9 a 7,2)
9	0,26 (0,11 a 0,36)	2,3 (1,8 a 2,6)	23,4 (22,5 a 24,5)	7,9 (7,8 a 8,0)	6,5 (5,6 a 7,0)
10	0,50 (0,28 a 0,84)	3,4 (2,9 a 3,8)	23,5 (23,0 a 24,0)	7,5 (7,4 a 7,6)	6,4 (5,0 a 7,2)

Tabela 7 — Variáveis bióticas e abióticas analisadas nos testes de toxicidade com  $K_2Cr_2O_7$

TESTE	ORGANISMO-TESTE		SOLUÇÃO-TESTE		
	Peso médio, em gramas (Amplitude)	Comprimento padrão médio, em centímetros (Amplitude)	Temperatura média °C (Amplitude)	pH médio (Amplitude)	O. D. médio, em mg/L (Amplitude)
1	0,30 (0,14 a 0,54)	2,6 (2,1 a 3,0)	23,5 (22,5 a 24,0)	6,4 (5,8 a 7,2)	Não mensurado
2	0,36 (0,18 a 0,76)	2,6 (2,1 a 3,3)	21,4 (19,5 a 23,5)	6,7 (6,2 a 7,1)	7,1 (7,0 a 7,3)
3	0,31 (0,17 a 0,62)	2,5 (2,0 a 3,1)	21,6 (20,0 a 23,5)	6,8 (6,4 a 7,4)	Não mensurado
4	0,35 (0,12 a 0,65)	2,6 (1,9 a 3,2)	20,8 (20,0 a 21,5)	6,8 (6,4 a 7,2)	5,9 (5,5 a 6,2)
5	0,32 (0,17 a 0,58)	2,6 (2,1 a 3,3)	23,5 (20,0 a 21,5)	6,8 (6,4 a 7,2)	6,6 (5,7 a 7,1)
6	0,30 (0,17 a 0,49)	2,5 (2,1 a 2,9)	22,3 (20,5 a 23,5)	6,7 (6,4 a 7,2)	7,0 (6,7 a 7,3)
7	0,32 (0,16 a 0,48)	2,5 (2,1 a 2,9)	22,3 (20,5 a 23,5)	6,7 (6,3 a 7,2)	7,0 (6,6 a 7,2)
8	0,18 (0,11 a 0,34)	2,0 (1,7 a 2,5)	23,4 (23,0 a 24,0)	6,7 (6,2 a 7,2)	7,3 (7,0 a 7,5)
9	0,23 (0,13 a 0,39)	2,1 (1,8 a 2,6)	23,4 (23,0 a 23,8)	6,7 (6,2 a 7,2)	7,3 (7,0 a 7,5)
10	0,21 (0,09 a 0,44)	2,1 (1,6 a 2,8)	23,0 (22,0 a 23,7)	6,6 (6,2 a 7,2)	7,0 (6,8 a 7,2)

soluções testadas em cada experimento, sendo que os desvios entre os valores das concentrações determinadas analiticamente e suas respectivas concentrações nominais não evidenciaram qualquer relação com os resultados de CL(D)50. Ainda foi verificada uma boa coerência entre as concentrações nominais e os resultados biológicos (Cetesb, 1978 b; Cetesb, 1978 c).

A esse respeito, Stephan (1977) ressaltou que as concentrações medidas de uma substância variam em grande parte devido a erros analíticos. Esse autor citou também que essa fonte de variação pode alterar o intervalo de confiança dos resultados, mas não a CL50 determinada, e que a variação biológica num teste de toxicidade deve ser muito maior do que a variabilidade da concentração de um agente tóxico.

Assim, verifica-se que, mesmo após a identificação e eliminação das prováveis fontes de variação na execução de testes de toxicidade com fluxo-contínuo, ainda persiste uma variação residual, expressa através dos coeficientes de variação. Sprague (1985) afirma que essa variação se deve a fatores ao acaso não controláveis, tal como a diferença individual na resistência dos organismos.

Bulich *et alii* (1981), comparando dados de CE50 (concentração efetiva a 50% dos organismos) de substâncias puras, utilizando o sistema Microtox, obtiveram um coeficiente de variação de 18,2%, que foi considerado pelos autores como um valor aceitável para ensaios biológicos. Schaeffer *et alii* (1987), ao analisarem a variabilidade de diversos métodos para avaliar efeitos de agentes químicos a organismos aquáticos e seu significado ecológico, recomendam o uso de testes de toxicidade que apresentem coeficientes de variação menores que 20%.

Considerando a aplicação dos testes de toxicidade no controle da poluição hídrica verifica-se, pelos resultados apresentados, que o teste de toxicidade aguda, pelo sistema de fluxo-contínuo, demonstra coeficientes de variação comparáveis aos das análises físico-químicas utilizadas para o mesmo fim. Por exemplo, Fredricksson & Román (1985) estabeleceram, para análises físico-químicas, intervalo de coeficientes de variação entre 5% (meta a ser atingida) e 25% (ao nível do limite de detecção analítica).

Outro aspecto que deve ser considerado e que não foi abordado nesse estudo, referê-se à precisão interlaboratorial dos testes de toxicidade aguda com peixes. Naturalmente, deve-se esperar uma maior variabilidade dos resultados quando estes são comparados entre laboratórios, pois dentre outros aspectos, pode não haver uniformidade nas condições de manutenção dos organismos e nas condutas analíticas. Peltier & Weber (1985) demonstraram que, em testes de fluxo-contínuo com período de 96 horas de duração, com os peixes *Pimephales promelas*, *Salmo gairdneri* e *Cyprinodon variegatus*, o coeficiente de variação, entre seis laboratórios, oscilou de 32 a 50% com a substância nitrato de prata e de 43 a 46% com Endosulfan.

Os resultados apresentados e discutidos no presente estudo subsidiam a aplicação desse método analítico, ou seja, o sistema de fluxo-contínuo, para a avaliação da toxicidade aguda de agentes químicos a peixes.

#### Agradecimento

Os autores agradecem ao Estatístico Antonio de Cas-

tro Bruni a colaboração no tratamento dos dados.

#### Referências Bibliográficas

- Alexander, D.G. and Clarke R. McV. The selection and limitations of phenol as a reference toxicant to detect differences in sensitivity among groups of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research* 12: 1085-1090. 1978.
- Buikema, A.L.; Aniederlehner, b.r.; Cairns, J. Jr. Biological Monitoring - Parte IV - Toxicity Testing. *Water Research* 16(3): 239-262. 1982.
- Bulich, A.A.; Greene, M.W. and Isenberg, D.L. Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents. D.R. Branson & K.L. Dickson (Eds.). ASTM-STP 737. p. 338-347. 1981.
- Cetesb. São Paulo. Análises físico-químicas de águas. NT-07. São Paulo. 1978 a.
- Programa Bioensaios. Relatório Parcial n.º 4. 109 pp. São Paulo. 1978 b.
- Padronização de Bioensaios. Programa ISO. Relatório Final. 116 pp. São Paulo. 1978 c.
- CETESB. São Paulo. Avaliação da toxicidade das águas, sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão. 226 pp. IL. São Paulo. 1986 a.
- Avaliação da toxicidade de efluentes de indústrias de papel e celulose. 51 pp. IL. São Paulo. 1986 b.
- 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.
- Ircha (Institut National de Recherche Chimique Appliquee). *Étude de l'applicabilité de la mise en emulsion dans l'eau de substances chimiques insolubles a la détermination de la toxicité de ces substances vis-à-vis d'organismes aquatiques*. Note Interne n.º 486/82, pp. 20. IL. 1982.
- Iso (International Organization for Standardization). Proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to freshwater fish. ISO/TC - 147/SC - 5 WG3-10. 13 pp. 1975.
- Water quality: Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), Teleostei, Cyprinidae]. ISO/DIS 7346/1 2,3. 1982.
- Navas-Pereira *et alii*. Bioensaios: Um programa a serviço do controle da poluição. Resultados iniciais. *Ambiente*, 1 (1): 32-36. 1987.
- Oecd -- Organization for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for testing of chemicals. "Fish, Acute Toxicity Test", 11 pp. 1981.
- Peltier, W.H. and Weber, C.I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Third Edition. EPA/600/4-85/013. Environmental Monitoring and Support Laboratory, USEPA, Cincinnati, Ohio. 1985.
- Schaeffer, D.S. & COX, D.K. and DEEM, R.A. Variability of test systems used to assess ecological effects of chemicals. *Wat. Sci. Tech* 19 (11): 39-45. 1987.
- Sprague, J.B. Factors that modify toxicity. In G.M. Rand & S.R. Petrocelli (Eds.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publ. Co. p. 124-163. 1985.
- Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM 634. F.L. Mayer and J.L. Hamelink, Eds. pp. 65-84. 1977.
- Thurston, R.V. and RUSSO, R.C. Acute Toxicity of Ammonia to Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* (112): 696-704. 1983.