



SETAC – Brazil

Avaliação da Toxicidade de Amostras de Águas Superficiais Preservadas de Diferentes Formas: Refrigeração e Congelamento

M. A. ARAGÃO* & E. BERTOLETTI

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – Setor de Ecotoxicologia Aquática (EAHE),
Avenida Prof. Frederico Hermann Jr., 345, Alto de Pinheiros, CEP 05459-900, São Paulo, SP

RESUMO

Os procedimentos corretos de coleta, preservação e estocagem de amostras a serem analisadas garantem a confiabilidade dos resultados obtidos em ensaios ecotoxicológicos. Para a realização desses ensaios, normas técnicas recentes recomendam a preservação das amostras sob refrigeração (a curto prazo) ou sob congelamento (a longo prazo). O objetivo deste trabalho foi comparar os resultados de testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, utilizando-se, para a renovação das soluções-teste, duas formas diferentes de preservação das amostras: a refrigeração (temperatura entre 2 e 5°C) e o congelamento em alíquotas (temperatura entre -3 e -25°C). Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas na toxicidade para *C. dubia* utilizando-se, para a renovação das soluções-teste, as amostras mantidas sob refrigeração ou congeladas em alíquotas.

Palavras-chave: toxicidade crônica, *Ceriodaphnia dubia*, preservação de amostras, congelamento, refrigeração.

ABSTRACT

Toxicity evaluation of surface water samples preserved in different ways: refrigeration and freezing

The correct proceedings for sample collection, preservation and storage regarding toxicity tests with aquatic organisms, will guarantee the reliability of results of these tests. Recently, some standard procedures advise that samples should be preserved by refrigeration (for a short time) or by freezing (for a long time). The aim of this study was to compare the results of chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* using, to the renewal of test solutions, samples with two different ways of preservation: refrigeration (temperature at 2 to 5°C) and freezing in aliquots (temperature at -3 to -25°C). Tests results indicated that there was no significant differences on toxicity to *C. dubia*, between samples refrigerated or frozen.

Key words: chronic toxicity, *Ceriodaphnia dubia*, sample preservation, freezing, refrigeration.

INTRODUÇÃO

Em ensaios de toxicidade com organismos aquáticos os procedimentos corretos de coleta, preservação e estocagem das amostras a serem analisadas constituem fatores de grande importância, que garantem a confiabilidade dos resultados obtidos nesses ensaios.

A preservação completa de amostras, independente de sua natureza (efluentes doméstico e industrial ou águas superficiais), é quase impossível de atingir na prática, de modo a garantir a estabilidade de todos os seus constituintes. Na melhor das hipóteses, as técnicas de preservação e estocagem

podem somente retardar as mudanças biológicas e químicas que ocorrem na amostra após sua coleta da fonte original (USEPA, 1982).

Os métodos de preservação são geralmente a adição de compostos químicos, controle de pH, refrigeração e congelamento. Habitualmente utiliza-se a combinação de alguns desses métodos para a preservação das amostras (USEPA, 1982). Para a realização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, algumas normas (ISO-10706, 2000; ABNT NBR-12713, 2004) recomendam a preservação das amostras sob refrigeração (a curto prazo) e sob congelamento (a longo prazo).

*Corresponding author: Márcia Aparecida Aragão, e-mail: marciaaaa@cetesbnet.sp.gov.br.

A variação na toxicidade das amostras após a sua coleta pode estar relacionada aos seguintes fenômenos fotoquímicos e/ou biológicos, como citado por Lenore *et al.* (1989) apud Naudin *et al.* (1995):

- adsorção de certos compostos orgânicos nas paredes dos recipientes de coleta;
- precipitação de certos compostos devido ao pH, temperatura e mudanças no potencial redox;
- volatilização;
- biodegradação pelos microrganismos presentes nas amostras.

Essas mudanças na toxicidade podem ser mais críticas quando se conduzem testes de toxicidade crônica, que podem durar até 30 dias (Naudin *et al.*, 1995).

Por isso, outros métodos (USEPA, 2002; Environment Canada, 1992) recomendam que, em testes de toxicidade crônica, semi-estáticos, com *Ceriodaphnia dubia*, as amostras (de efluentes ou de águas superficiais) sejam coletadas no primeiro, terceiro e quinto dias de teste para a renovação das soluções-teste, sendo que as amostras são mantidas sob refrigeração durante esse período.

No caso de Programas de Monitoramento de Águas Superficiais, como o realizado na CETESB, onde cerca de 130 pontos são amostrados bimestralmente em todo o Estado de São Paulo, a coleta a cada dois dias torna-se inviável, devido aos custos e à disponibilidade de tempo e de pessoal para a realização das mesmas. Assim, desde a implantação do ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* na CETESB, o procedimento utilizado para a preservação das amostras de águas superficiais é a refrigeração durante o período de duração do teste, sendo que para a renovação das soluções-teste é utilizada a mesma amostra desde o dia inicial do ensaio

(CETESB, 1991). O presente trabalho tem por objetivo comparar os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, utilizando-se amostras de água superficial, preservadas de duas formas diferentes: a refrigeração durante todo o período do ensaio e o congelamento de alíquotas da amostra para a renovação das soluções-teste, sendo este último o procedimento recomendado na nova versão da norma ABNT NBR-13373 (2005) para o ensaio de toxicidade crônica com *C. dubia*.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas nos experimentos foram de água superficial proveniente de sete pontos de amostragem da Rede de Monitoramento de Águas Interiores da CETESB, sendo que cada amostra foi recoletada a cada dois meses e testada novamente por três vezes para a maioria dos pontos. Os pontos selecionados e sua descrição constam na Tabela 1.

As amostras coletadas foram divididas e testadas em paralelo, utilizando-se dois tratamentos diferentes de preservação para a renovação das soluções-teste:

- Refrigeração (temperatura média com variação entre 2 e 5°C): a amostra coletada foi armazenada em geladeira, sendo utilizada nos dias de renovação das soluções-teste.
- Congelamento em alíquotas (temperatura média com variação entre -3 e -25°C): a amostra coletada foi subdividida em alíquotas de 200 ml, as quais foram armazenadas em freezer, sendo descongeladas somente nos dias de renovação das soluções-teste. Para o descongelamento, os frascos contendo as alíquotas foram deixados em recipiente com água à temperatura ambiente até seu total descongelamento.

Tabela 1 — Pontos selecionados para o experimento e sua respectiva descrição.

Código do ponto	Descrição
SOIT 02900	Reservatório Itupararanga, próximo à barragem, na estrada que liga Ibiúna a Votorantim.
SOIT 02100	Reservatório Itupararanga, no meio do corpo central, em frente à Praia do Escritório.
JNDI 00500	Rio Jundiaí, no canal de interligação com o Reservatório Taiacupeba.
PEBA 00100	Reservatório Taiacupeba, no início do braço do Taiacupeba-Mirim.
PEBA 00900	Reservatório Taiacupeba, na captação da SABESP.
TIET 02700	Rio Tietê, ponte na rodovia BR-153, no trecho que liga Lins a José Bonifácio.
TITR 02100	Reservatório de Três Irmãos, ponte na rodovia SP-463, no trecho que liga Araçatuba a Jales.

O método utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* foi o descrito na norma ABNT NBR 13373 (2005). Para a análise dos resultados qualitativos dos ensaios utilizou-se o teste-t por Bioequivalência ($r = 0,72$), que consta no programa estatístico TOXSTAT 3.5 (Gulley, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos, quanto à toxicidade das amostras e às médias de reprodução obtidas (número médio de jovens/adulta ao final do período de teste), constam na Tabela 2.

Pelos dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que, em todos os ensaios realizados, as médias de reprodução foram muito semelhantes, sendo que os efeitos tóxicos foram iguais para as amostras mantidas sob as duas formas diferentes de preservação.

Portanto, verifica-se que não houve diferenças significativas entre os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* utilizando, para a renovação das

soluções-teste, a amostra preservada sob refrigeração ou congelada em alíquotas.

Embora normas técnicas recentes, como, por exemplo, a ISO-10706 (2000), referente ao ensaio de toxicidade crônica com *Daphnia magna*, recomendem o congelamento da amostra em alíquotas para a renovação das soluções-teste, ou por até dois meses caso o ensaio não se inicie em até 48 horas, esta técnica de preservação tem sido discutida por alguns autores.

A USEPA (1982), descrevendo sobre técnicas de preservação de amostras, considera os seguintes aspectos. O congelamento seria um método capaz de aumentar o tempo de conservação de uma única amostra, a qual poderia ser utilizada em várias análises, contudo, os componentes de resíduos sólidos (filtráveis e não filtráveis) da amostra se alteram com o congelamento e descongelamento. Por isso, este método pode ser bom para algumas análises, mas não é indicado como um método geral de preservação de amostras. Já a refrigeração é um método comumente utilizado em trabalhos de campo e não altera a composição da amostra. Embora ela não mantenha a integridade da amostra para todos os parâmetros, também não interfere em nenhum método analítico.

Tabela 2 — Resultados dos ensaios com *Ceriodaphnia dubia*, com diferentes formas de preservação da amostra a ser utilizada na renovação das soluções-teste.

Data de início do teste	Código do ponto	Efeito detectado nas amostras	
		Refrigeradas	Congeladas
16/1/2004	SOIT 02900	crônico (10,7)*	crônico (9,5)
24/3/2004	SOIT 02900	não tóxico (13,2)	não tóxico (18,1)
5/5/2004	SOIT 02900	não tóxico (28,7)	não tóxico (31,0)
16/1/2004	SOIT 02100	crônico (4,0)	crônico (5,7)
24/3/2004	SOIT 02100	não tóxico (25,6)	não tóxico (24,2)
5/5/2004	SOIT 02100	não tóxico (31,3)	não tóxico (28,3)
21/1/2004	JNDI 00500	não tóxico (31,6)	não tóxico (32,3)
10/3/2004	JNDI 00500	não tóxico (24,4)	não tóxico (21,2)
20/5/2004	JNDI 00500	não tóxico (24,3)	não tóxico (30,3)
21/1/2004	PEBA 00900	não tóxico (29,8)	não tóxico (30,5)
10/3/2004	PEBA 00900	crônico (16,4)	crônico (15,1)
21/5/2004	PEBA 00900	não tóxico (25,0)	não tóxico (20,8)
21/1/2004	PEBA 00100	não tóxico (36,4)	não tóxico (35,6)
10/3/2004	PEBA 00100	crônico (13,7)	crônico (10,1)
21/5/2004	PEBA 00100	não tóxico (37,3)	não tóxico (33,3)
11/2/2004	TITR 02100	crônico (10,9)	crônico (16,1)
16/6/2004	TITR 02100	crônico (15,8)	crônico (17,3)
11/2/2004	TIET 02700	crônico (9,6)	crônico (14,2)
16/6/2004	TIET 02700	não tóxico (19,5)	não tóxico (23,4)

(*) = média de reprodução (número médio de jovens/adulta ao final do período de teste).

Além disso, Schuytema *et al.* (1989) compararam a toxicidade de dois sedimentos contaminados com DDT e endrin, estocados sob refrigeração (4°C) e congelados (-20°C), utilizando testes de toxicidade com *Hyalella azteca* com duração de 10 dias. Os autores verificaram que a toxicidade de ambos os sedimentos foi reduzida quando eles foram congelados por 14 dias em relação à toxicidade dos sedimentos mantidos sob refrigeração, embora a diferença entre os resultados tenha sido pouco expressiva (isto é, um fator ao redor de 2). Os valores de CL50 para o DDT dos sedimentos estocados sob refrigeração e sob congelamento foram, respectivamente, 4,2 e 7,3 µg/g DDT, para o sedimento com 3% de carbono orgânico total; e 11,1 e 23,2 µg/g DDT, para o sedimento com 11% de carbono orgânico total. O mesmo comportamento foi observado para o endrin. Os autores concluíram que a redução da toxicidade pode estar relacionada à liberação do carbono orgânico solúvel durante o congelamento e descongelamento da amostra.

Os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando-se amostras de águas superficiais, são semelhantes aos de Naudin *et al.* (1995). Esses autores realizaram ensaios de toxicidade crônica com dois efluentes líquidos, utilizando *Danio rerio* (sobrevivência embriolarval), *Ceriodaphnia dubia* (reprodução) e *Selenastrum capricornutum* (reprodução), para avaliar a eficiência de diferentes técnicas de preservação das amostras, como refrigeração e congelamento. As amostras testadas foram mantidas sob duas formas de estocagem: refrigeração (4 ± 1°C) e congelamento (freezer, com temperatura de -26 ± 3°C).

Os resultados obtidos para *Danio rerio*, expressos em CI50;11 dias, mostraram toxicidade similar para a amostra refrigerada ou congelada. Utilizando o efluente 1, as CI50;11 d para as amostras refrigerada e congelada foram, respectivamente, 10% e 7,6%, enquanto para o efluente 2 os valores de CI50;11 d foram, respectivamente, 56,9% e 64,1%

Da mesma forma, para *Ceriodaphnia dubia*, os resultados obtidos nos ensaios com as amostras preservadas sob as duas diferentes formas foram semelhantes. Para o efluente 1, os valores de CI50;7 d para a amostra refrigerada e congelada foram, respectivamente, 2,9% e 3,9%, enquanto para o efluente 2 os valores de CI50;7 d foram de 20,3% e 25,9%.

Nos testes com *Selenastrum capricornutum*, o mesmo efeito foi verificado, a fitotoxicidade foi similar para os dois efluentes testados com amostras refrigeradas ou congeladas. Os valores de CI50;7 d do efluente 1 para amostra refrigerada e congelada foram, respectivamente, 7,1% e 9,1%, enquanto as CI50;7 d do efluente 2 foram de 7,3% e 9,5%, respectivamente.

Os autores concluíram que nos diferentes ensaios a refrigeração e o congelamento das amostras mantiveram de forma similar as propriedades tóxicas desses efluentes.

Em outro estudo similar, Larbaigt & Bonnefille (1988) apud Naudin *et al.* (1995) compararam as vantagens de refrigeração ou congelamento para a preservação das

propriedades tóxicas de nove amostras de efluentes industriais. A toxicidade após 0, 8 e 15 dias de estocagem foi determinada utilizando-se o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Os resultados indicaram que nenhuma conclusão genérica pode ser obtida e que seria necessária avaliação específica em cada caso, contudo, observaram que não houve nenhuma diferença significativa entre os dois modos de preservação em termos de mudanças na toxicidade das amostras testadas.

Logo, verifica-se que, em ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, a preservação de amostras de águas superficiais e de efluentes sob refrigeração ou congeladas em alíquotas, para serem utilizadas nas renovações das soluções-teste, apresenta a mesma eficiência na preservação da toxicidade das amostras.

Assim, com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que, para a renovação das soluções-teste nos ensaios de toxicidade crônica com águas superficiais utilizando-se *Ceriodaphnia dubia*, a preservação da amostra sob refrigeração (2 a 6°C) durante o período do ensaio produz resultados semelhantes àqueles das amostras congeladas. Portanto, a refrigeração das amostras pode continuar a ser utilizada sem causar desvios nos resultados obtidos.

Agradecimentos — Ao técnico de laboratório Ivo Freitas de Oliveira pelo preparo e congelamento das amostras utilizadas nos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- ABNT, 2005, NBR 13373, Assoc. Bras. de Normas Técnicas – *Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com Ceriodaphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 15p.
- ABNT, 2004, NBR 12713, Assoc. Bras. de Normas Técnicas – *Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 21p.
- CETESB, 1991, *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos*. Vol. I. Testes crônicos com *Ceriodaphnia*. São Paulo. 28p. + anexos.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992, *Biological test method: test of reproduction and survival using the cladoceran Ceriodaphnia dubia*. EPS – Report EPS 1/RM/21. 72p.
- GULLEY, D., 1996, *Toxstat 3.5*, West Inc. University of Wyoming. Cheyenne, Wyoming.
- ISO 10706, 2000, *Water quality – Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*. 17p.
- NAUDIN, S., GARRIC, J., VINDIMIAN, E., BRAY, M., MIGEON, B., VOLLAT, B. & LENON, G., 1995, Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 30: 54-62.
- SCHUYTEMA, G. S., NEBEKER, A. V., GRIFFIS, W. L. & MILLER, C. E., 1989, Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environ. Toxicol. and Chemistry*, 8: 883-891.
- USEPA., 1982, *Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater*. EPA-600/4-82-029. Cincinnati, Ohio, 402p.
- USEPA, 2002, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. EPA- 821-R-02-013. Washington, D.C., 335p.