

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A TOXICIDADE DO γ BHC E DO CLORETO DE MERCÚRIO À ARTEMIA SALINA

Salvador Airton GAETA^{1*}; Naoko KADEKARU²; Norival PEREIRA¹ & Luiz Roberto TOMMASI^{1,2}

1 Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

2 CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Synopsis

Results of bio-assays using *Artemia salina* larvae in γ BHC-HgCl₂ mixture are presented. The results obtained are compared with those obtained using the two chemicals separately. The LC₅₀ for γ BHC was almost double that for HgCl₂. The effect due to the primary dose of HgCl₂ was observed for approximately 16% of the population (LC₁₆) while for γ BHC the population percentage was 2.3 (LC_{2.3}). As a consequence, subsequent doses were more effective for HgCl₂ than for γ BHC. The effective dose 50% (ED₅₀) is about the same for γ BHC and for γ BHC + HgCl₂ mixture, though in higher doses BHC would be more effective, while in smaller doses the mixture would predominate.

Descriptors: Bioassays, Larvae, Pesticides, Heavy metals, *Artemia salina*.

Descritores: Bioensaios, Larvas, Pesticidas, Metais pesados, *Artemia salina*.

Introdução

Muitos produtos químicos podem apresentar toxicidade, que se manifesta a curto ou longo prazo. A concentração dessas substâncias tóxicas tem seu reflexo nas biocenoses aquáticas ao longo das cadeias alimentares, indo dos organismos planc-
tônicos aos peixes e, em seguida, às aves aquáticas (Dorst, 1973).

A sensibilidade dos organismos às substâncias tóxicas pode variar consideravelmente de uma espécie para outra, devido às diferenças em seu metabolismo e à natureza de seu habitat.

Nos últimos vinte anos, os bioensaios tornaram-se ferramentas básicas para a detecção, avaliação e atenuação da poluição aquática. Anteriormente, eles eram empregados somente em alguns laboratórios e algumas indústrias. Atualmente, observa-se um emprego cada vez maior de bioensaios para detectar e avaliar a toxicidade de despejos industriais, o que possibilita analisar a eficiência do tratamento em termos de redução da toxicidade e disposição em condições seguras desses efluentes (A.P.H.A., 1975).

Os testes de toxicidade muitas vezes simulam, ainda que de maneira imperfeita, as condições ambientais. Testes padronizados capacitam comparações interlabo-

ratoriais realizadas com os possíveis efeitos tóxicos de substâncias ou efluentes obtidos sob tais condições (CETESB, 1980).

Hoje, os testes para avaliação da toxicidade a curto prazo são feitos sob condições extremamente controladas, com o objetivo de se obter uma primeira indicação das concentrações dos produtos químicos que seriam letais aos organismos aquáticos em um período relativamente curto de tempo (CETESB, 1980).

São relatados neste trabalho os resultados de bioensaios com o crustáceo *Artemia salina*, colocado em uma mistura de duas substâncias químicas, γ - BHC e HgCl₂, bem como é apresentado um tratamento estatístico de dados deste tipo.

O nome hexaclorobenzeno, BHC, é a denominação usada nos países de língua inglesa para a mistura de isômeros 1,2,3, 4,5 e 6 dos hexaclorociclohexano. Na Europa, é conhecido como BHC (hexaclorociclohexano) e, comercialmente, é encontrado sob a denominação de Lindano. A toxicidade de BHC se deve ao isômero γ . Os compostos que predominam na composição do BHC são: isômero α - 70%; isômero β - 10%; isômero γ - 10% a 12%; isômero δ - 8%; isômero ϵ - 1% a 3,5%; outros isômeros - 3% a 5%, com maior quantidade de cloro com hepta e octaclorohexano (Fericola *et al.*, 1978).

Sob o ponto de vista químico, o isômero γ é o único do grupo do hexaclorociclohexano que possui propriedade inseticida.

(* Aluno do Curso de Pós-Graduação do Instituto Oceanográfico.

Uma vez no ambiente, o BHC é persistente, não sendo identificado nenhum produto de decomposição pois a sua fotodecomposição se processa muito lentamente. Nenhuma degradação microbiana do BHC foi observada. No ambiente aquático, este composto pode ser susceptível de sofrer degradação parcial. Sua solubilidade na água é de 6 ng/g (CETESB, 1980).

O mercúrio está extensamente distribuído no ambiente e, biologicamente, é um elemento não essencial. Historicamente, reconhece-se possuir um potencial altamente tóxico, volátil, que pode ser metilado e que tem sido utilizado como um germicida na medicina ou agente fungicida na agricultura.

A intoxicação por mercúrio pode ser aguda ou crônica e os efeitos tóxicos mudam com a forma de mercúrio e seu modo de penetração no organismo. Os sais mercuriosos são menos solúveis que os mercúrios e, conseqüentemente, menos tóxicos (EPA, 1976).

O cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2), comumente conhecido como calomelano, e o cloreto de mercúrio II ($HgCl_2$), como sublimado corrosivo, estão entre os mais importantes compostos inorgânicos de mercúrio.

Material e métodos

Procurou-se estudar a sensibilidade das larvas de *Artemia salina* às exposições de cloreto de mercúrio II e γ BHC durante períodos de 24 e 48 horas, sob condições controladas de temperatura e salinidade. Foram utilizadas misturas de duas substâncias químicas (γ BHC, acetona e $HgCl_2$, água de mar) preparadas em cinco concentrações diferentes (ppm) (Tab. 1) em água do mar).

Tabela 1. Concentrações experimentais utilizadas

Placas	Subst. química	$HgCl_2$ (ppm)	γ BHC (ppm)
Controle		0	0
1		0,010	0,00010
2		0,056	0,00056
3		0,100	0,00100
4		0,560	0,00560
5		1,000	0,01000

A razão principal da utilização do crustáceo *Artemia salina* foi devido à disponibilidade de obtenção de ovos secos no laboratório do Instituto Oceanográfico e por ser uma espécie muito favorável para bioensaios.

Em cada placa de Petri, contendo 50 ml de solução-teste, foram colocados 40 organismos com auxílio de uma micropipeta e lupa. O grupo controle recebeu apenas água do mar filtrada. Após 24 e 48 horas de incubação a 25°C, as larvas mortas foram removidas com auxílio da micropipeta e lupa e anotado o total de indivíduos mortos.

O objetivo do presente estudo foi comparar os resultados dos efeitos de misturas das duas substâncias com aqueles obtidos dos efeitos dessas mesmas substâncias atuando isoladamente. Procurou-se também apresentar um tratamento estatístico convencional para os dados obtidos.

O método de bioensaios utilizados para esses testes foi o estático, sem aeração e com temperatura constante de 25°C.

Resultados

Os resultados dos experimentos constam das tabelas e gráficos apresentados a seguir.

Os valores obtidos da média (Tab. 2) foram plotados em coordenadas semilogarítmicas, para se obter uma estimativa

Tabela 2. Dados experimentais a partir de bioensaios com γ BHC

Bioensaio 1									
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	I	%	a	b	I	%
0 controle	40	0	0	0	0,0	2	1	3	0,0375
1 0,001	40	0	0	0	0,0	4	5	9	0,1125
2 0,056	40	2	0	2	0,025	16	15	33	0,4125
3 0,320	40	3	4	7	0,0875	29	36	72	0,9000
4 0,560	40	26	21	47	0,5875	13	17	77	0,9625
5 1,000	40	25	24	49	0,6125	15	16	80	1,0000

Bioensaio 2									
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	I	%	a	b	I	%
0 controle	40	0	0	0	0,0	0	1	1	0,0125
1 0,001	40	0	1	1	0,0125	3	5	10	0,125
2 0,056	40	2	2	4	0,05	11	17	32	0,40
3 0,320	40	4	6	10	0,125	25	29	64	0,80
4 0,560	40	3	8	11	0,1375	33	36	80	1,00
5 1,000	40	40	40	80	1,00	-	-	-	1,00

Média			
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas	48 horas
0 controle	40	0,0	0,025
1 0,001	40	0,00625	0,11875
2 0,056	40	0,0375	0,40625
3 0,320	40	0,10625	0,85
4 0,560	40	0,3625	0,98125
5 1,000	40	0,80625	1,000

da CL_{50} para 24 e 48 horas através da interpolação gráfica, conforme recomendação da A.P.H.A. (1975), tomando-se as concentrações nas coordenadas logarítmicas e a porcentagem de organismos mortos nas abscissas (Fig. 1).

Os mesmos valores foram colocados em gráfico de ordenadas aritméticas, tomando-se a concentração em ppm de γ BHC como variável independente (x) e a porcentagem de mortos em 24 e 48 horas como variável dependente (Y) para se ter uma idéia da distribuição dos pontos e de uma possível correlação entre ambas. De fato, a análise de regressão linear para o intervalo de 24 horas forneceu uma equação $Y = 0,0318 + 0,778x$ e um coeficiente de correlação linear de Pearson = 0,9787 (r) e, portanto, o coeficiente de determinação (r^2) = 95,78%.

Para o intervalo de 48 horas, a equação obtida $Y = 0,2573 + 0,9479x$ apresenta

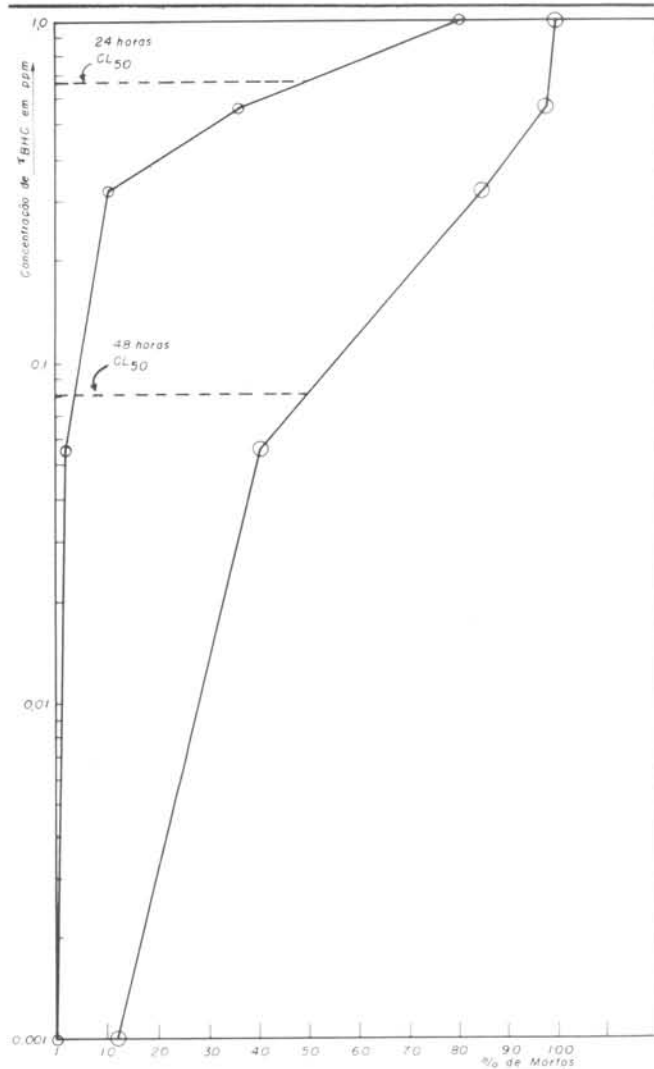


Fig. 1. Estimativa do CL_{50} através de Interpolação.

$r = 0,8629$ e $r^2 = 74,46\%$; portanto, apresentando um grau de correlação significativamente menor que para o tempo de exposição anterior (Fig. 2).

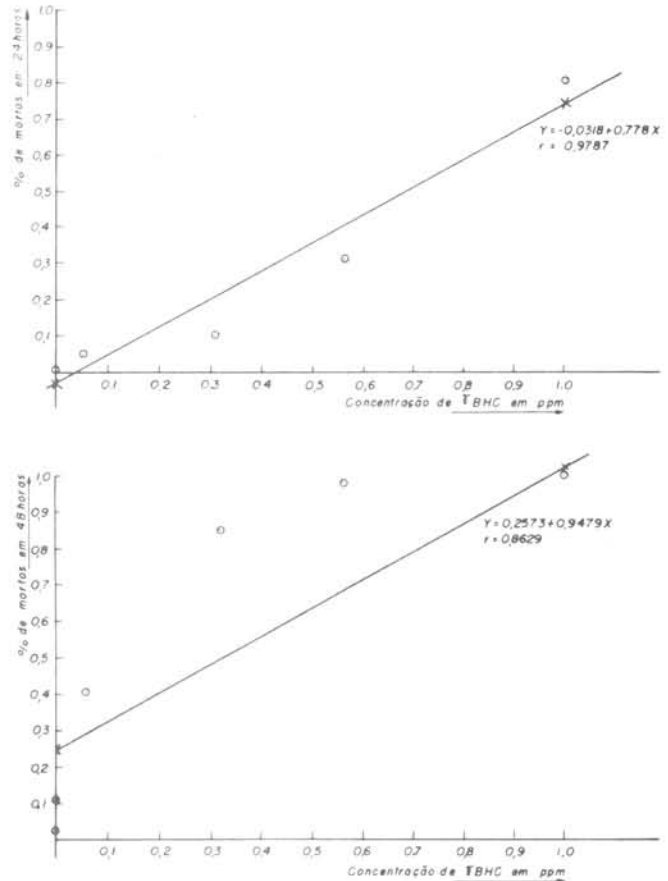


Fig. 2. Representação gráfica da linear para o bioensaio com TBHC.

Os valores da Tabela 3 (Média) foram colocados em coordenadas semilogarítmicas com as concentrações em ordenadas logarítmicas e as porcentagens de organismos mortos em abscissas aritméticas para se obter uma estimativa dos CL_{50} para 24 e 48 horas através de interpolação (A.P.H.A., 1975) (Fig. 3).

Procedeu-se da mesma forma que no bioensaio para a construção dos gráficos para regressão linear. Para o intervalo de 24 horas, obteve-se a equação $Y = 0,0533 + 2,8236x$; $r = 0,9719$ e $r^2 = 94,46\%$. Para o intervalo de 48 horas, a equação $Y = 0,0338 + 3,5341x$; $r = 0,9639$ e $r^2 = 92,91\%$ (Fig. 4).

Na Tabela 4, encontram-se os resultados dos bioensaios executados com $HgCl_2 + \gamma$ BHC.

Uma vez obtidos esses resultados, procedeu-se a uma análise de variância (Campbell, 1967), com o objetivo de verificar se os cinco experimentos com

Tabela 3. Dados experimentais a partir de bioensaios com HgCl₂.

Bioensaio 1									
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle	40	0	2	2	0,025	2	2	6	0,075
1 0,010	40	1	0	1	0,0125	1	1	3	0,0375
2 0,056	40	3	2	5	0,0625	1	1	7	0,0875
3 0,100	40	6	3	9	0,1125	2	3	14	0,175
4 0,560	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00
5 1,000	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00

Bioensaio 2									
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle	40	0	0	0	0,0	0	1	1	0,0125
1 0,056	40	0	0	0	0,0	0	1	1	0,0125
2 0,100	40	2	1	3	0,0375	10	6	19	0,2375
3 0,240	40	7	16	23	0,2875	18	8	49	0,6125
4 0,320	40	35	38	77	0,9625	1	3	80	1,00
5 0,420	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00
6 0,560	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00

Bioensaio 3									
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle	40	0	1	1	0,0125	1	1	2	0,0375
1 0,032	40	1	1	2	0,025	1	2	3	0,0625
2 0,075	40	2	4	6	0,075	4	6	10	0,2000
3 0,135	40	17	17	34	0,425	5	7	12	0,575
4 0,180	40	30	23	53	0,6625	3	7	10	0,7875
5 0,240	40	40	40	80	0,9875	-	1	10	1,00
6 0,320	40	40	40	80	1,00	-	-	0	1,00

Bioensaio 4									
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle	40	1	0	1	0,0125	0	0	1	0,0125
1 0,032	40	0	1	1	0,0125	0	4	5	0,0625
2 0,075	40	2	5	7	0,0875	1	6	14	0,1750
3 0,135	40	9	15	24	0,3000	11	4	39	0,4875
4 0,180	40	17	15	32	0,4000	8	7	47	0,5875
5 0,240	40	32	35	37	0,4625	4	4	75	0,9375

Média			
Concentração em ppm	Nº de organismos	24 horas z	48 horas z
0 controle	40	0,0125	0,0344
1 0,010	40	0,0125	0,0375
2 0,032	40	0,0188	0,0500
3 0,056	40	0,0625	0,0500
4 0,075	40	0,0813	0,1500
5 0,100	40	0,0750	0,2063
6 0,135	40	0,3625	0,5938
7 0,180	40	0,5313	0,7500
8 0,240	40	0,7042	0,8500
9 0,320	40	0,9813	1,0000
10 0,420	40	1,0000	1,0000

HgCl₂ + γBHC foram homogêneos, o que justificaria o uso da média desses resultados para a estimativa CL₅₀ (Tabs 5-6).

Para α = 5%, encontramos na Tabela de limites bilaterais (Gomes, 1977), para o caso de F < 1:

$$F_{m-1, N-m} = F_{4,25} = 0,118$$

$$\text{Para } \alpha = 1\% = F_{4,25} = 0,050.$$

Assim, ao nível de 5% aceita-se Ho; isto é, os tratamentos ou experimentos não diferem entre si.

Por outro lado, em se considerando α = 1%, verifica-se que o valor F (razão de variância) se situa fora do intervalo de confiança e, conseqüentemente, rejeita-se Ho.

Para uma maior garantia de que se pode aceitar Ho, isto é, os tratamentos não diferem e a variação observada é aleatória, aplica-se o teste de Duncan (Gomes, 1977), montando uma matriz das diferenças observadas, com a finalidade de se verificar se essas diferenças ocorrem ao acaso ou não (Tab. 7).

Da tabela de Duncan (Gomes, 1977), obtêm-se D_n, n'α, onde n é o número de médias abrangidas na comparação, n' é o número de graus de liberdade do erro (N-n) e α o número de probabilidade que, no caso, é 1%.

Tabela 4. Dados experimentais a partir de bioensaios com HgCl₂ + γBHC

Bioensaio 1									
Concentração em ppm HgCl ₂ + γBHC	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle controle	40	4	1	5	0,0625	1	9	15	0,1875
1 0,0010 0,00010	40	3	3	6	0,075	2	1	9	0,1125
2 0,0056 0,00056	40	2	0	2	0,025	0	2	4	0,05
3 0,0100 0,00100	40	40	12	52	0,65	0	6	56	0,725
4 0,0560 0,00560	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00
5 0,1000 0,01000	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00

Bioensaio 2									
Concentração em ppm HgCl ₂ + γBHC	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle controle	40	0	0	0	0,00	0	4	4	0,05
1 0,0010 0,00010	40	0	0	0	0,00	2	2	4	0,05
2 0,0056 0,00056	40	1	1	2	0,025	5	2	9	0,1125
3 0,0100 0,00100	40	0	3	3	0,0375	17	15	35	0,4375
4 0,0560 0,00560	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00
5 0,100 0,01000	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00

Bioensaio 3									
Concentração em ppm HgCl ₂ + γBHC	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle controle	40	2	0	2	0,025	1	1	4	0,05
1 0,0010 0,00010	40	0	0	0	0,00	0	3	3	0,0375
2 0,0056 0,00056	40	0	0	0	0,00	3	2	5	0,0625
3 0,0100 0,00100	40	0	0	0	0,00	3	1	4	0,05
4 0,0560 0,00560	40	36	38	74	0,925	4	2	80	1,00
5 0,1000 0,01000	40	40	40	80	1,00	-	-	80	1,00

Bioensaio 4									
Concentração em ppm HgCl ₂ + γBHC	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle controle	40	1	0	1	0,0125	4	3	8	0,10
1 0,0010 0,00010	40	1	0	1	0,0125	20	3	24	0,30
2 0,0056 0,00056	40	3	2	5	0,0625	16	10	31	0,3875
3 0,0100 0,00100	40	1	3	4	0,0500	12	11	27	0,3375
4 0,0560 0,00560	40	4	3	7	0,0875	23	26	56	0,70
5 0,1000 0,01000	40	34	29	63	0,7875	6	7	76	0,95

Bioensaio 5									
Concentração em ppm HgCl ₂ + γBHC	Nº de organismos	24 horas				48 horas			
		a	b	Σ	z	a	b	Σ	z
0 controle controle	40	2	1	3	0,0375	2	1	6	0,075
1 0,0010 0,00010	40	3	2	5	0,0625	5	5	15	0,1875
2 0,0056 0,00056	40	0	7	7	0,0875	12	3	22	0,275
3 0,0100 0,00100	40	0	1	1	0,0125	17	18	26	0,325
4 0,0560 0,00560	40	1	40	41	0,5125	24	-	65	0,8125
5 0,1000 0,01000	40	40	31	71	0,8875	-	9	80	1,00

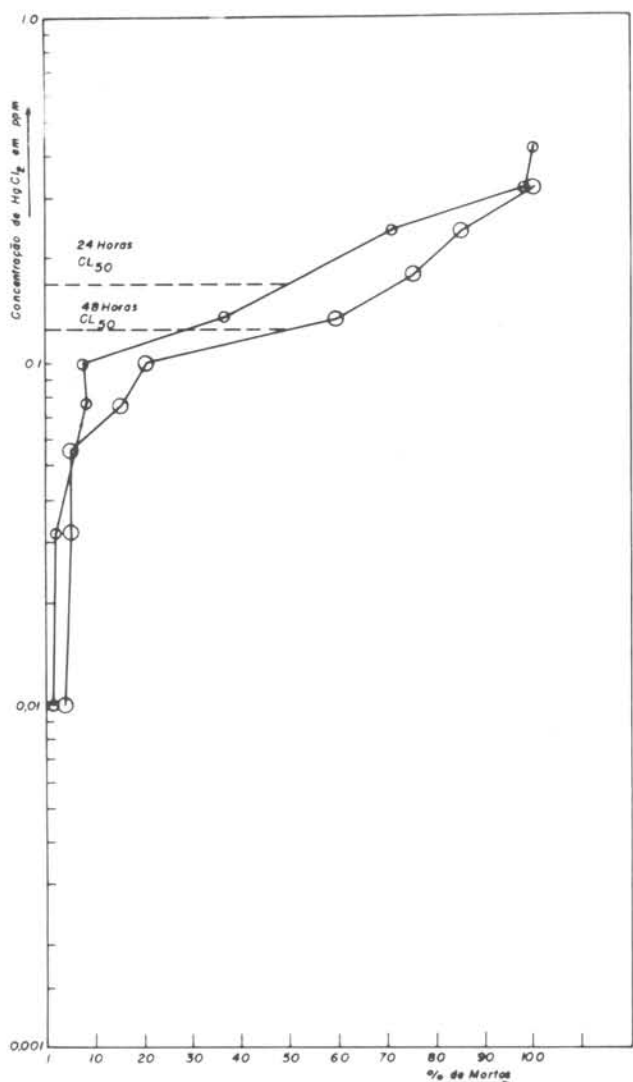


Fig. 3. Estimativa do CL₅₀ através de Interpolação.

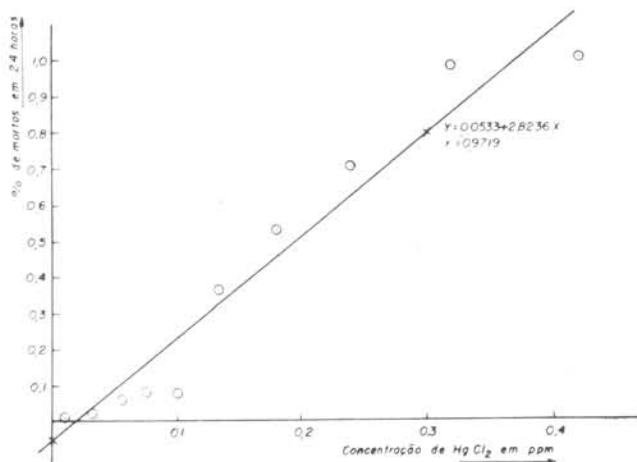
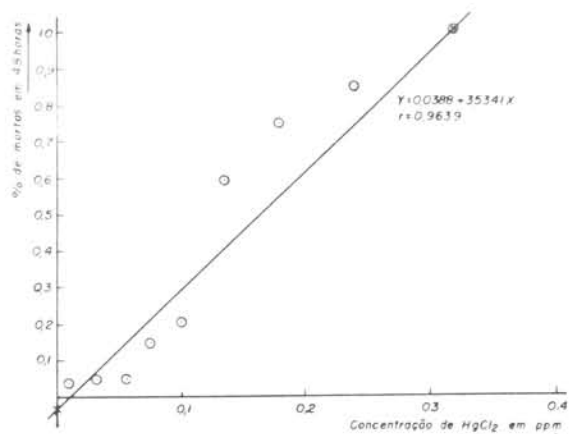


Fig. 4. Regressões lineares para o bioensaio com HgCl₂.

Tabela 5. Resultados para o bioensaio com cinco repetições

Bioensaio		m = 5				
j+	i+	1	2	3	4	5
Concentração						
c		0,05	0,19	0,05	0,075	0,10
1		0,05	0,11	0,04	0,19	0,30
2		0,11	0,05	0,06	0,275	0,385
3		0,44	0,725	0,05	0,325	0,34
4		1,00	1,00	1,00	0,81	0,7
5		1,00	1,00	1,00	1,00	0,95
n =	6	6	6	6	6	6
Y _{1.} =		2,65	3,075	2,2	2,675	2,775
Y _{1.} ² =		7,0225	9,455	4,84	7,155	7,700
Y _{1.} =		0,44	0,5125	0,367	0,446	0,4625

Tabela 6. Quadro de análise de variância

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Razão de variâncias (F)
Tratamentos	4	0,065	0,01625	0,09450
Erro	25	4,299	0,17196	
Total	29	4,364	0,15050	

Tabela 7. Ordenação das médias obtidas nos experimentos e matriz das diferenças observadas

Experimentos n°	2	5	4	1	3
Lugar	1º	2º	3º	4º	5º
Y _{i.}	0,5125	0,4625	0,446	0,440	0,367
	1º	2º	3º	4º	5º
5º	0,1455	0,0955	0,079	0,073	0,0
4º	0,0725	0,0225	0,006	0,0	-
3º	0,0665	0,0165	0,0	-	-
2º	0,05	0,0	-	-	-
1º	0,0	-	-	-	-

O valor de D_{tolerado} é dado por:

$$D_{\text{tolerado}} = D_{\text{tolerado}} (n, n', \alpha) \cdot \frac{S}{\sqrt{r}}$$

onde $S = V QMe$ e r o número de repetições.

Portanto, o erro-padrão da média

$$\frac{S}{\sqrt{r}} = \sqrt{\frac{S^2}{r}} = \sqrt{\frac{0,17196}{6}} = 0,1693$$

Na comparação das diferenças observadas na matriz com os respectivos valores D_{tolerado} , verifica-se que nenhuma delas ultrapassa esses últimos e, portanto, são atribuíveis ao acaso (Tab. 8).

Na Tabela 9, o quadro de médias obtidas.

Da mesma forma que para os bioensaios com BHC e com $HgCl_2$, foram construídos os gráficos para estimativa de CL_{50} (Fig. 5).

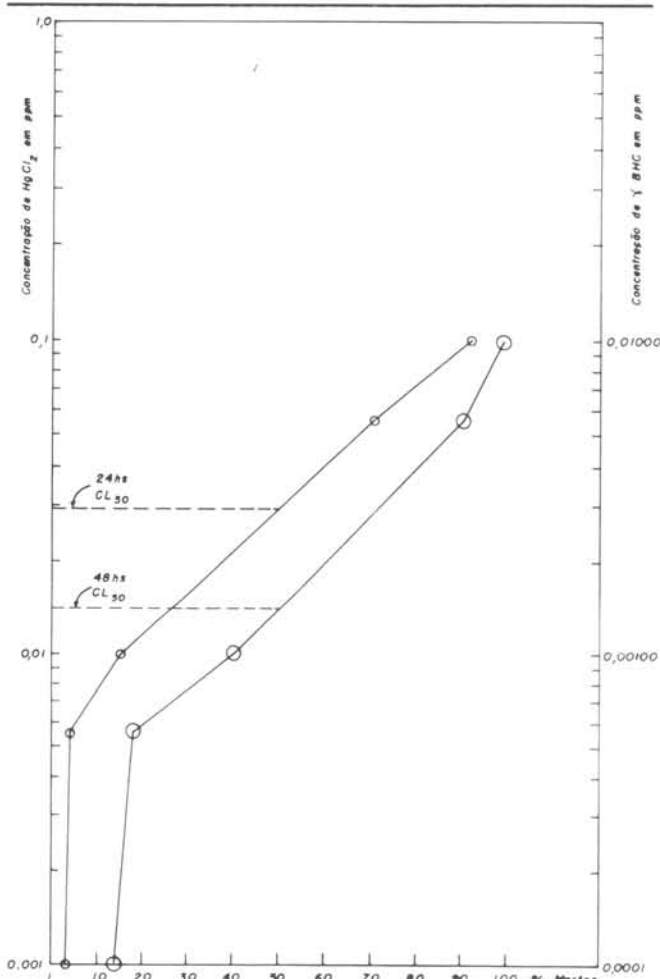


Fig. 5. Estimativa da CL_{50} através de Interpolação.

Igualmente, foram feitas as análises de regressão, tendo-se obtido, para o intervalo de 24 horas, a equação:

$Y = 0,0372 + 8,5476 x$; $r = 0,9830$ e $r^2 = 96,63\%$. Para o intervalo de 48 horas, a equação $Y = 0,01834 + 9,2522 x$; $r = 0,9450$ e $r^2 = 89,30\%$ (Fig. 6).

As relações entre concentração-efeito ou concentração-resposta, assinaladas nos gráficos com coordenadas aritméticas, especialmente observadas no bioensaio para $HgCl_2$ (Fig. 4), sugerem uma corre-

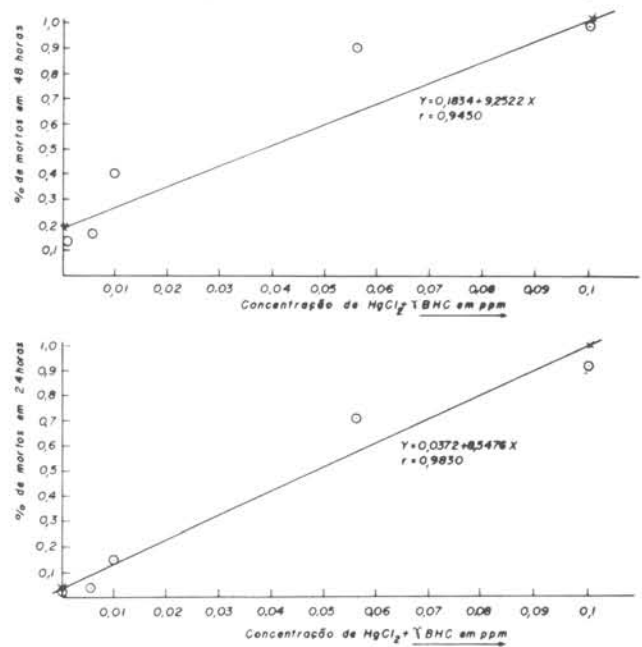


Fig. 6. Regressões lineares para o bioensaio com $HgCl_2 + YBHC$.

Tabela 8. Cálculo dos valores D_{tolerado}

Número de médias abrangidas	D tabelado	$\frac{S}{\sqrt{r}}$	D_{tolerado}
Mínimo 2	3,96	0,1693	= 0,6704
3	4,14	0,1693	= 0,7009
4	4,24	0,1693	= 0,7178
Máximo 5	4,33	0,1693	= 0,7330

Tabela 9. Médias

Concentração em ppm $HgCl_2 + YBHC$	Nº de organismos	24 horas	48 horas
0 controle controle	40	0,0275	0,0925
1 0,0010 0,00010	40	0,0300	0,1375
2 0,0056 0,00056	40	0,0400	0,1775
3 0,0100 0,00100	40	0,1500	0,4000
4 0,0560 0,00560	40	0,7050	0,9025
5 0,1000 0,01000	40	0,9187	0,9875

lação curvilínea, a qual pode ser expressa por uma equação matemática. Na Figura 6, para o bioensaio $HgCl_2 + \gamma BHC$, o número de pontos é menor, mas a tendência para uma curva sigmóide é visível. Já no ambiente com γBHC , essa tendência é notada no gráfico referente ao intervalo de 24 horas.

Um único conjunto de dados pode aceitar igualmente bem diversas equações matemáticas, quando a faixa de variações dos dados é limitada. Portanto, deve-se evitar assumir que os eventos biológicos seguem um modelo matemático específico, a menos que os dados tenham sido coletados dentro de uma ampla faixa de valores (WHO, 1978).

É comum desenvolver-se uma hipótese para um mecanismo de ação tóxica em bases biológicas, derivar a expressão matemática geral para o mecanismo e, então, ajustar os dados à equação para obter os valores para as constantes na equação que serão específicas para as condições do experimento (WHO, *op. cit.*).

A curva sigmóide tem sido obtida com frequência para relações dose-efeito e a muitas relações dose-resposta. A base biológica para esta relação pode ser parcialmente compreendida pela natureza da distribuição de frequência das susceptibilidades individuais ou resistência numa população. A maioria dos indivíduos numa população responderá próximo a um nível de dose central e alguns poucos responderão somente para níveis muito baixos ou muito altos. Isto faz com que a distribuição de frequência para os indivíduos que respondem seja uma função da dose. Contudo, uma distribuição de frequência não descreve um mecanismo biológico para a susceptibilidade ou resistência, mas sim a ocorrência ao acaso de indivíduos com diferentes susceptibilidades.

A distribuição normal apresenta como característica matemática o fato dos pontos de inflexão da curva em ambos os lados do pico ou valor médio se situarem em valores iguais a mais ou menos 1 desvio-padrão (d.p.) da média (m). A integração da função de distribuição normal mostra que a área sob a curva de $m-1$ d.p. a $m+1$ d.p. inclui 68,3% de todos os membros da população. Portanto, 15,9% da população responderá para doses iguais ou menores que $m-1$ d.p. e 84,1% responderá para doses iguais ou

menores que a $m+1$ d.p. Pode-se calcular também que aproximadamente 95,4% da população responderá dentro de uma faixa dada por $m+2$ d.p. e aproximadamente 99,5% entre $m\pm 3$ d.p.

Uma vez que $m-3$ d.p., $m-2$ d.p., $m-1$ d.p., m , $m+1$ d.p., $m+2$ d.p. e $m+3$ d.p. indicam intervalos iguais de doses às porcentagens correspondentes, isto é, respectivamente, 0,1, 2,3, 15,9, 50, 84,1, 97,7 e 99,9, obtêm-se uma linha reta quando estas porcentagens forem colocadas em gráficos em intervalos equidistantes.

Muitos toxicologistas utilizam estimativas através da análise de próbitos para estimar a CL_{50} . Em testes rotineiros, isto requer, no mínimo, que uma linha seja traçada visualmente para ajustar os resultados colocados em coordenadas logarítmicas e probabilísticas (papel prob-log) (A.P.H.A., 1975).

Próbito (Unidade de Probabilidade) é o desvio-padrão ou desvio equivalente normal, aumentado de 5, sendo definido como a abscissa correspondente a uma probabilidade P numa distribuição normal com média 0 e desvio-padrão = 1 (Figs 7-9).

Apresentam-se, a seguir, as estimativas de CL_{50} feitas por meio de interpolação gráfica e análise de próbito (Tabs 10-11).

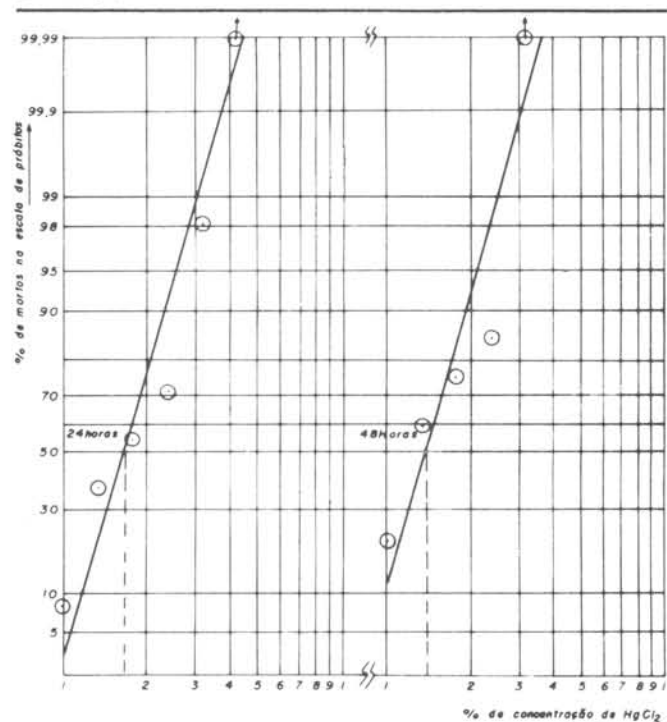


Fig. 7. Estimativa da CL_{50} através da análise de próbito.

Corner & Sparrow (1956) estudaram o efeito tóxico do cloreto de mercúrio, iodeto de mercúrio e etil-cloreto de mercúrio nos adultos do copépode marinho *Acartia clausi*, larvas de *Artemia salina* e larvas de *Elminius modestus*. Os valores de CL₅₀ 2,5h a 23°C ± 2°C em água do mar foram: 0,05 ppm de Hg⁺⁺ para *Acartia*, 0,3 ppm para *Elminius* e 800 ppm para *Artemia*. A toxicidade relativa dos outros compostos foi ligeiramente maior para *Elminius* e *Acartia*, porém, para *Artemia*, foi de 24 a 31 vezes em comparação ao HgCl₂, provavelmente devido a diferentes taxas de penetração. Esses autores verificaram também que, em presença de HgCl₂, as larvas de *Artemia* diminuem sua motibilidade e respiração.

Portmann (1972) estudou a CL₅₀, 48 horas, de seis metais (Cu, Cr, Fe, Hg, Ni, Zn),

todos presentes em efluentes industriais, no camarão europeu *Crangon crangon* e no marisco europeu *Cardium edule*, além de em algumas espécies de peixes. Esse autor verificou que o Hg e o Cu eram os mais tóxicos, confirmando, com isso, os trabalhos de Wisely & Blick (1967, cit. in: Portmann, 1972), que utilizaram larvas de animais marinhos. Para o crustáceo e para o molusco, utilizando-se o Hg, obteve-se CL₅₀ de 3,3 a 10 ppm; para os peixes, a CL₅₀ variou de 1 a 100 ppm.

O mercúrio penetra nos organismos por absorção, através das superfícies livres como a epiderme (Schamberg, 1918 cit. in: Keckes & Miettinen, 1972) ou brânquias (Hannerz, 1968 in: Keckes & Miettinen, op. cit.), pela tomada de água ou alimentos que continham compostos de mercúrio. Brown et al. (1968 cit. in: Portmann op. cit.) mos-

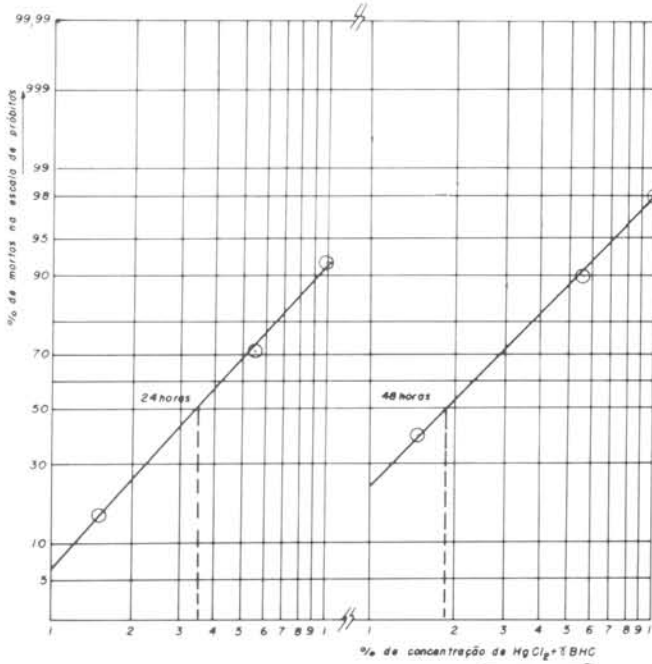


Fig. 8. Estimativa da CL₅₀ através da análise de próbito.

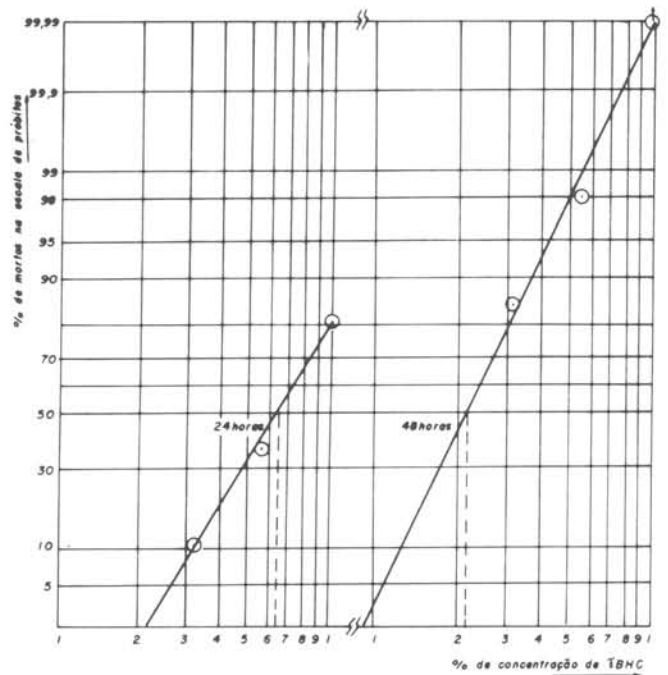


Fig. 9. Estimativa da CL₅₀ através da análise de próbito.

Tabela 10. Valores de CL₅₀, %, estimadas por Interpolação e próbito em período de 24 horas

	YBHC	HgCl ₂	HgCl ₂ + YBHC (ppm)	
24 horas LC ₅₀ , % estimado por interpolação	0,675	0,170	0,0295	0,00295
LC ₅₀ estimado por próbito	0,650	0,170	0,0340	0,00340

Tabela 11. Valores de CL₅₀, %, estimadas por Interpolação e próbito em período de 48 horas

	YBHC	HgCl ₂	HgCl ₂ + YBHC (ppm)	
48 horas CL ₅₀ , % estimado por interpolação	0,081	0,125	0,0142	0,00142
CL ₅₀ estimado por próbito	0,210	0,138	0,0190	0,00190

traram que os metais atuam amplamente sobre a superfície das brânquias onde causam espessamento das paredes epiteliais e finalmente a morte por asfixia, já que o transporte de O_2 é bloqueado.

Portmann (1968) observou que as formas jovens de camarões europeus eram mais susceptíveis ao mercúrio que as formas adultas e que menos da metade da quantidade de mercúrio era necessária para matar 50% dos camarões jovens, quando comparada àquela necessária para fazê-lo em animais maiores. Este mesmo autor testou uma série de inseticidas organoclorados e organofosforados para as mesmas espécies mencionadas anteriormente. A CL_{50} para 48 horas de exposição com γ BHC foi de 0,001 a 0,0033 ppm para *Crangon crangon*, 10 ppm para *Cardium edule* e de 0,01 a 1 ppm para certas espécies de peixes.

Ainda segundo Portmann (*op.cit.*), embora os inseticidas organoclorados estejam atualmente dispersos ao longo do ambiente marinho, seria vantajoso para os animais marinhos se eles fossem capazes de detectar as fontes mais concentradas. Isto aplicar-se-ia também aos compostos

organofosforados menos persistentes. Infelizmente, isto parece não ocorrer, pelo menos para o DDT e Azimphos-metil que foram testados com *Crangon crangon*. Aparentemente, esta espécie é capaz de detectar, apenas, concentrações muito maiores de DDT e de Azimphos-metil que os valores de CL_{50} para 48 horas. Como esses dois tipos de inseticidas são atuantes sobre o sistema nervoso, é possível que qualquer mecanismo de resposta seja bloqueada por sua ação.

Discussão

Os experimentos descritos neste trabalho foram principalmente de natureza exploratória e, conseqüentemente, apenas algumas tentativas de conclusões e algumas hipóteses podem deles decorrer. A Figura 10 (Gráficos 1-3) mostra as curvas de dose-resposta em coordenadas log-prob. Nela, nota-se que, por exemplo, a CL_{50} para o γ BHC é quase que o dobro do valor para o $HgCl_2$. Nota-se, também, que, para o $HgCl_2$, um efeito pode ser observado para aproximadamente 16% da população (CL_{16}) para a primeira dose, ao passo que esse efeito só é obser-

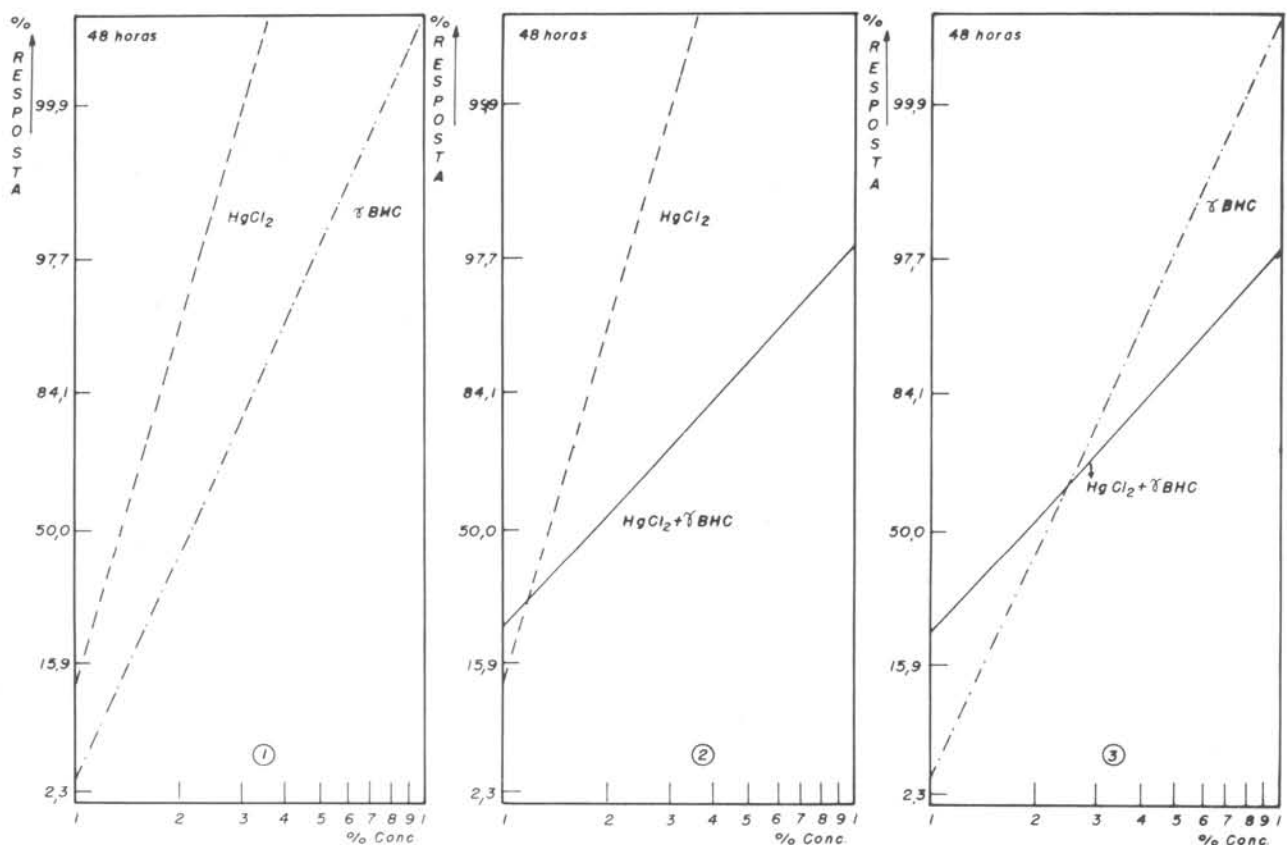


Fig. 10. Comparação das curvas de dose-resposta para os ensaios com $HgCl_2$ e γ BHC.

vado em aproximadamente 2,3% da população submetida ao γ BHC. Por outro lado, as doses subseqüentes mostram ser mais efetivas para o HgCl_2 que para o γ BHC, como se deduz da inclinação da curva.

Inclinações suaves como as observadas para o $\text{HgCl}_2 + \gamma$ BHC e para o γ BHC isolado, freqüentemente são indicativas de fatores tais como absorção pobre, rápida excreção ou desintoxicação ou de efeitos tóxicos que vêm a se manifestar algum tempo após a administração do poluente (WHO, 1978). Inclinações mais agudas como as observadas para o HgCl_2 , freqüentemente indicam rápida absorção e, igualmente, rápida ação dos efeitos tóxicos (WHO, *op. cit.*), o que está de acordo com os efeitos fisiológicos do mercúrio observados por diversos autores. A curva de efeitos do $\text{HgCl}_2 + \gamma$ BHC apresenta inclinação bem suave em relação a essas substâncias agindo isoladamente, possivelmente devido às baixas concentrações que foram preparadas para tornar viável o bioensaio. Assim, na comparação dos CL_{50} para 48 horas, estimado por próbitos, a concentração de γ BHC isolado é cerca de 110 vezes maior que a do γ BHC agindo com o HgCl_2 ; a concentração de HgCl_2 isolado é cerca de sete vezes maior que a do HgCl_2 agindo com o γ BHC.

No gráfico 2, observa-se a maior das diferenças em relação à inclinação da curva e, no gráfico 3, que o ED_{50} (dose efetiva 50%) é, mais ou menos, igual para o γ BHC para o γ BHC + HgCl_2 , não obstante qualquer afirmação sobre a igualdade relativa do efeito só seja verdadeira naquela dose particular. De fato, em doses mais altas, o γ BHC seria mais efetivo que γ BHC + HgCl_2 e, em doses mais baixas, a mistura destes dois últimos seria mais efetiva.

As CL_{50} , 24 e 48 horas, fornecem medidas da toxicidade relativa de substâncias estudadas para organismos sob determinadas condições experimentais. Entretanto, estes valores não representam concentrações seguras em habitats naturais. A exposição a longo prazo às concentrações muito mais baixas pode causar uma debilitação no organismo em sua performance, tais como na habilidade para natação, apetite e crescimento, resistência às doenças, capacidade reprodutora ou habilidade para competir com outras espécies na biota. Uma inspeção nas exigências da qualidade da água para os

peixes, por exemplo, serve como uma introdução geral aos fundamentos ecológicos, fisiológicos e toxicológicos. Várias fórmulas têm sido propostas experimentalmente para estimar taxas de descargas aceitáveis ou taxas de diluição para efluentes industriais e outros poluentes aquáticos baseadas em avaliações de toxicidade aguda. O emprego de fatores de aplicação pelos quais os valores de CL_{50} são multiplicados para se chegar a uma concentração presumivelmente segura de dejetos tóxicos ou químicos tem sido amplamente aceito (A.P.H.A., 1975).

Mount & Stephan (*in*: FWPCA, 1968) deduziram experimentalmente alguns fatores de aplicação e seus estudos demonstraram a existência de muita variação, dependendo da substância, de suas características. Nenhum fator de aplicação pode ser igualmente apropriado para todos os materiais tóxicos.

Resumo

São apresentados os resultados de bioensaios com larvas de *Artemia salina* colocadas em misturas de γ BHC e HgCl_2 , a fim de se compararem os efeitos das mesmas com aqueles obtidos quando essas duas substâncias atuam isoladamente. A CL_{50} para o γ BHC foi quase que o dobro do valor para o HgCl_2 . O efeito da primeira dose foi observado para aproximadamente 16% da população (CL_{16}), enquanto que, para o γ BHC, o foi em 2,3% da população ($\text{CL}_{2,3}$). Assim, as doses subseqüentes foram mais efetivas para o HgCl_2 que para o γ BHC. A dose efetiva 50% (ED_{50}) é mais ou menos igual para o γ BHC e para o γ BHC + HgCl_2 , mas em doses altas o γ BHC seria mais efetivo, enquanto que em doses baixas a mistura é que o seria.

Referências bibliográficas

- A.P.H.A. (American Public Health Association). 1975. Standard methods for the examination of water and wastewater. 14 th ed., Washington, D. C., APHA, AWWA WPCF, p. 685-689.
- CAMPBELL, R. C. 1967. Statistics for biologists. London, Cambridge University Press, p. 134-148.
- CETESB. 1980. Aquatic toxicity seminar - CETESB - UNILEVER - Gessy Lever (not published).

- CORNER, E. D. S. & SPARROW, B. W. 1956. The modes of action of toxic agents. *J. mar. biol. Ass. UK*, Great Britain, 35:531-548.
- DORST, J. 1973. Antes que a natureza morra. São Paulo, Edusp,
- EPA. 1976. Quality criteria for water, pré-ed. Washington, D.C., Environmental Protection Agency, p. 98-102.
- FERNICOLA, N. 1978. Praguicidas organocloradas. Relatório Técnico, CETESB (não publicado).
- FWPCA, 1968. Water quality criteria Washington, D. C., a report of the National Technical Advisory Committee to the Secretary of the Interior, p. 57-59.
- GOMES, F. P. 1977. Curso de estatística experimental. 7a.ed. Piracicaba, SP, ESALQ/USP, p. 385-403.
- KECKES, S. & MIETTINEN, J. K. 1972. Mercury as a marine pollutant. *In*: Ruivo, M., ed. - Marine pollution and sea life, England, FAO, Fishing news (Books) Ltd., p. 276-289.
- PORTMANN, J. E. 1972. Results of acute toxicity tests with marine organisms, using a standard method. *In*: Ruivo, M., ed. - Marine pollution and sea life, England, FAO, Fishing News (Books) Ltd., p. 212-217
- _____ 1972. Toxicity - testing with particular reference to oil - removing materials and heavy metals. *In*: Ruivo, M., ed. - Marine pollution and sea life. England, FAO, Fishing News (Books) Ltd, p. 217-222.
- WHO. 1978. Principles, and methods for evaluating the toxicity of Chemicals. Genebra, World Health Organization, Part I, p. 48-54.

(Recebido 20-abr-1982;
aceito 07-jan-1983)