

**Relatório Final RL1282/07 LYC**  
18 de Fevereiro de 2008

**Título do Estudo**

Teste de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus*  
com interface sedimento/água para amostra de  
**SEDIMENTO CÓD. PSS-39 (Projeto CPEA – 466)**

**Patrocinador**

FUNDAÇÃO RICARDO FRANCO.  
Praça General Tibúrcio, nº 80 - 22.290-270.  
Rio de Janeiro, R.J.

**Laboratório executor**

TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábila, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO.....      | 3  |
| INTRODUÇÃO.....                                | 4  |
| MATERIAIS E MÉTODOS .....                      | 4  |
| 1. Dados da amostra .....                      | 4  |
| 2. Dados dos organismos-teste .....            | 4  |
| 3. Condições de teste.....                     | 4  |
| 4. Aclimação e controle de sensibilidade ..... | 5  |
| 5. Procedimentos .....                         | 5  |
| 6. Análises estatísticas.....                  | 7  |
| RESULTADOS .....                               | 7  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....               | 8  |
| TABELAS .....                                  | 9  |
| ANEXO 1 .....                                  | 11 |

## **DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com a água de interface da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-39**, requerido pela empresa **FUNDAÇÃO RICARDO FRANCO**, foi conduzido dentro dos preceitos estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à Rua Fábria, 59-São Paulo – SP.

---

**MARIA FERNANDA ROMANELLI**  
**Bióloga (MSc)**  
**CRB 35816/01-D**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**FUNDAÇÃO RICARDO FRANCO**  
**Patrocinador**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica da água de interface sedimento/água da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-39**, para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), com base no grau de desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos, gástrulas e larvas. Após o período de 24 a 28 horas, os ovos recém-fecundados devem se desenvolver até o estágio de larva pluteus, a menos que ocorram efeitos tóxicos durante este período de exposição.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada segue a Norma ABNT NBR 15350:2006 (ABNT, 2006).

### 1. Dados da amostra

Nome: **SEDIMENTO CÓD. PSS-39**.

Protocolo: 1282/07.

Data de Entrada: 12/02/2007.

Data de Coleta: 09/02/2007 às 15:32h.

Local de coleta: não informado.

Coletor: solicitante.

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

### 2. Dados dos organismos-teste

Espécie: *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Idade: ovos fecundados em laboratório, utilizados até 30 minutos após a fecundação.

### 3. Condições de teste

Data de início: 01/03/2007.

Data de término: 02/03/2007.

Temperatura média da água:  $25,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

RL1282/07LYC

Fotoperíodo: 16h luz e 8h escuro.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

Aeração: superficial e suave.

Água de diluição: água marinha sintética preparada a partir de sal comercial marca CORAL REEF RED SEA SALT<sup>®</sup>, com salinidade entre 32 e 35‰.

Sedimento-controle: sedimento coletado em Ilhabela (SP), em 14/01/2007.

#### **4. Aclimação e controle de sensibilidade**

Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas de isopor, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas plásticas contendo água marinha sintética e aeração intensa.

Simultaneamente ao teste com a amostra, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração de inibição (CI50; 24h) e respectivo intervalo de confiança obtido foram: 0,092mg Zn/L (I.C.: 0,086 a 0,100mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam (Anexo I), utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CI50; 24h média de 0,105mg Zn/L, com limites de controle (média  $\pm$  2.desvios-padrão) de 0,056 a 0,154mg Zn/L. Portanto, o resultado do teste simultâneo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste.

#### **5. Procedimentos**

Os procedimentos utilizados para o preparo do teste com interface sedimento/água foram baseados em ANDERSON *et al.* (1996) e PRÓSPERI (2002).

A amostra de sedimento foi homogeneizada manualmente e foram transferidas alíquotas de cerca de 175mL de sedimento para cada recipiente de 750mL e adicionados 600mL de água de diluição, com auxílio de um disco plástico, para minimizar a ressuspensão do sedimento. Foram preparadas quatro réplicas desta mesma forma. Um frasco-teste de cerca de 200mL foi mantido submerso e suspenso dentro do

recipiente contendo o sedimento, posicionado de forma que a abertura inferior ficasse a aproximadamente 1cm da superfície do sedimento. Esta abertura foi coberta com uma rede com abertura de malha de 63 $\mu$ m, permitindo a livre passagem da água de interface e garantindo a permanência dos ovos dentro do frasco-teste. Foi introduzida aeração suave na superfície da água e o conjunto foi mantido sob repouso por 24 horas antes do início do teste. Da mesma forma, foram preparadas quatro réplicas contendo o sedimento-controle.

Os gametas foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5M na região perioral dos animais adultos, conforme metodologia descrita em ABNT (2006). A fecundação foi feita “in vitro” e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação. Com um micro-pipetador, um volume equivalente a 600 ovos foi adicionado em cada frasco-teste.

Após 24 horas de incubação, uma subamostra de uma réplica do sedimento-controle foi retirada e o estágio de desenvolvimento de 100 embriões foi avaliado. O teste foi encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido.

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5mL de formol tamponado. Uma subamostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgwick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus normais e anormais em cada réplica.

Foram realizadas análises de pH, salinidade, teor de oxigênio dissolvido, nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada da água intersticial da amostra e do sedimento-controle, no início e no final do teste. Estas amostras de água intersticial foram obtidas através da centrifugação do sedimento por 30 minutos a 3500rpm.

Também foram realizadas análises de pH, salinidade, teor de oxigênio dissolvido da água de interface da amostra e do sedimento-controle, no início e no final do teste. As alíquotas de água para essas análises foram cuidadosamente coletadas na interface sedimento/água, cerca de 1cm acima da superfície do sedimento.

RL1282/07LYC

Os valores de amônia não ionizada foram obtidos por cálculo a partir dos valores de nitrogênio amoniacal, pH, salinidade e temperatura de cada amostra, conforme descrito por Bower & Bidwell (1978).

## 6. Análises estatísticas

Após 24 horas de exposição, o grau de desenvolvimento embrio-larval observado na água de interface do sedimento-teste foi comparado com o grau de desenvolvimento observado na água de interface do sedimento-controle, utilizando-se os Testes F e T (Zar, 1999).

## RESULTADOS

Os resultados do teste com a interface sedimento/água da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-39** estão apresentados na Tabela 1, com as porcentagens de larvas pluteus normais e anormais. No cômputo de larvas pluteus anormais foram incluídas todas as fases do desenvolvimento embrio-larval e também as larvas em estágio não bem desenvolvido.

As análises estatísticas para avaliação da toxicidade da amostra de sedimento foram aplicadas sobre o total de organismos que atingiu o estágio de larva pluteus bem desenvolvido, em comparação com o resultado obtido para o sedimento-controle.

Foi verificado que a interface sedimento/água da amostra **apresentou toxicidade** crônica para *L. variegatus* (Tabela 1).

Com relação às análises químicas realizadas durante o teste, os valores de oxigênio dissolvido, salinidade, pH, nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada da água de interface e da água intersticial do sedimento estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2006).

Quanto à concentração de amônia não ionizada da água intersticial, tanto da amostra quanto do sedimento-controle, os valores iniciais estiveram acima do limite de

RL1282/07LYC

0,05mg/L que, isoladamente, pode causar efeito tóxico sobre o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* (ABNT, 2006). Após o período de 24 horas de exposição, o sedimento-controle e a amostra de sedimento apresentaram valores abaixo do limite de tolerância do organismo-teste (Tabela 3).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma NBR 15350. Rio de Janeiro, ABNT, 17 p., 2006.
- ANDERSON, B.S; HUNT, J.W.; HESTER, M. & PHILLIPS, B.M. Assessment of sediment toxicity at the sediment-water interface. In: **Techniques in Aquatic Toxicology**. G.K. Ostrander (ed.), Lewis Publishers, Chapter 33, p. 609-624, 1996.
- Bower, C.E. & Bidwell, J.P. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. **J. Fish. Res. Board. Can.**, n. 35, p. 1012-1016, 1978.
- PRÓSPERI, V. A. **Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimento marinho e estuarinos**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2002.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.



## TABELAS

**Tabela 1** – Efeito tóxico obtido no teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar com a interface sedimento/água da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-39**, após o período de exposição.

| Amostra                          | Rép. | Pluteus Normais | Pluteus Anormais | Pluteus Normais (%) | Pluteus Anormais (%) | Efeito (%) | Resultado     |
|----------------------------------|------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|------------|---------------|
| <b>Sedimento-<br/>controle</b>   | 1    | 80              | 20               | 83                  | 17                   | 17         | -             |
|                                  | 2    | 86              | 14               |                     |                      |            |               |
|                                  | 3    | 86              | 14               |                     |                      |            |               |
|                                  | 4    | 81              | 19               |                     |                      |            |               |
| <b>Sedimento<br/>Cód. PSS-39</b> | 1    | 12              | 88               | 25                  | 76                   | 76         | <b>TÓXICO</b> |
|                                  | 2    | 21              | 79               |                     |                      |            |               |
|                                  | 3    | 41              | 59               |                     |                      |            |               |
|                                  | 4    | 24              | 76               |                     |                      |            |               |

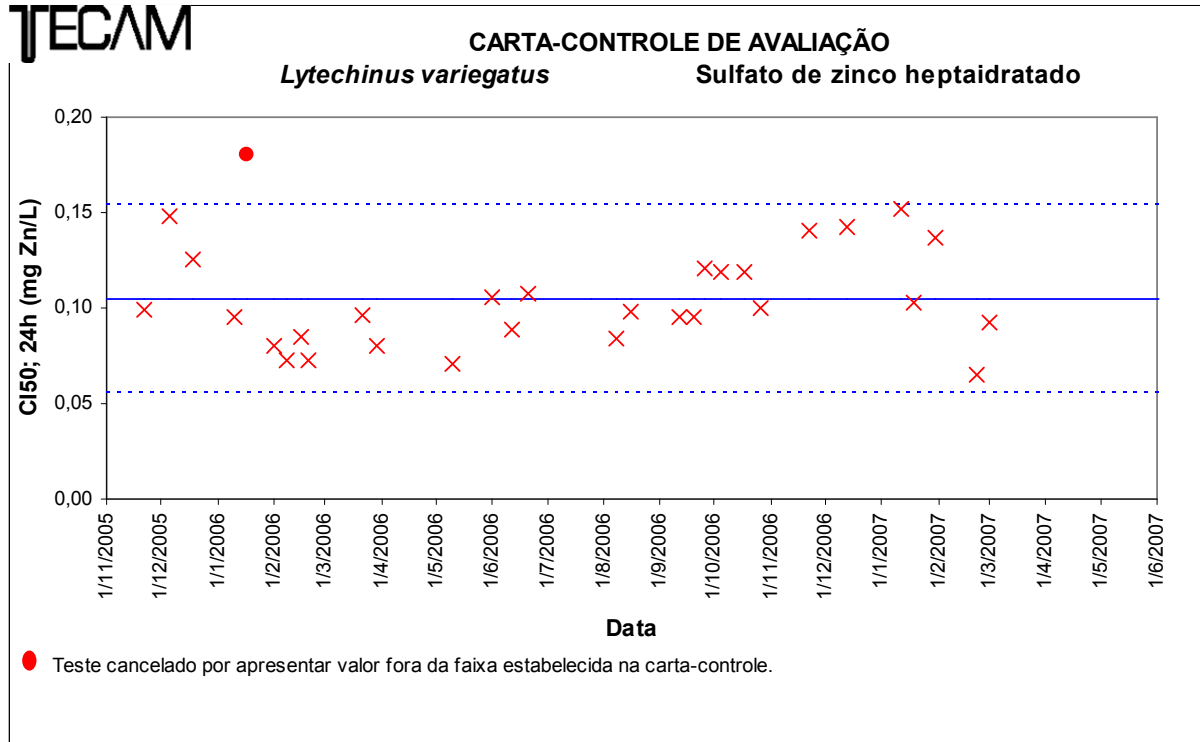
**Tabela 2** – Análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar para a **água de interface** da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-39**.

|                                  | pH      |       | Salinidade (%) |       | OD (mg/L) |       |
|----------------------------------|---------|-------|----------------|-------|-----------|-------|
|                                  | Inicial | Final | Inicial        | Final | Inicial   | Final |
| <b>Sedimento-<br/>controle</b>   | 7,83    | 8,00  | 33             | 33    | 5,0       | 5,5   |
| <b>Sedimento<br/>Cód. PSS-39</b> | 7,89    | 7,99  | 33             | 33    | 5,0       | 5,3   |

**Tabela 3** – Análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar para a **água intersticial** da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-39**.

|                              | pH      |       | Salinidade (%) |       | OD (mg/L) |       | Nitrogênio amoniacal (mg/L) |       | Amônia não ionizada (mg/L) |       |
|------------------------------|---------|-------|----------------|-------|-----------|-------|-----------------------------|-------|----------------------------|-------|
|                              | Inicial | Final | Inicial        | Final | Inicial   | Final | Inicial                     | Final | Inicial                    | Final |
| <b>Sedimento-controle</b>    | 7,61    | 7,39  | 33             | 33    | 6,9       | 4,6   | 4,75                        | 3,75  | 0,100                      | 0,045 |
| <b>Sedimento Cód. PSS-39</b> | 7,76    | 7,42  | 35             | 34    | 6,2       | 3,4   | 8,00                        | 3,25  | 0,231                      | 0,041 |

**ANEXO 1**



RL1282/07LYC