

**Relatório Final RL1283/07 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-40 (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. Fábria, 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-40**, 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-40**, 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-40**.

Protocolo: 1283/07.

Data de Entrada: 12/02/2007.

Data de Coleta: 09/02/2007 às 16:00h.

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

RL1283/07LYC

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.

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-40** 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 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, apenas o sedimento-controle apresentou 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-40**, após o período de exposição.

Amostra	Rép.	Pluteus Normais	Pluteus Anormais	Pluteus Normais (%)	Pluteus Anormais (%)	Efeito (%)	Resultado
<b>Sedimento- controle</b>	1	80	20	83	17	17	-
	2	86	14				
	3	86	14				
	4	81	19				
<b>Sedimento Cód. PSS-40</b>	1	52	48	44	56	56	TÓXICO
	2	20	80				
	3	42	58				
	4	61	39				

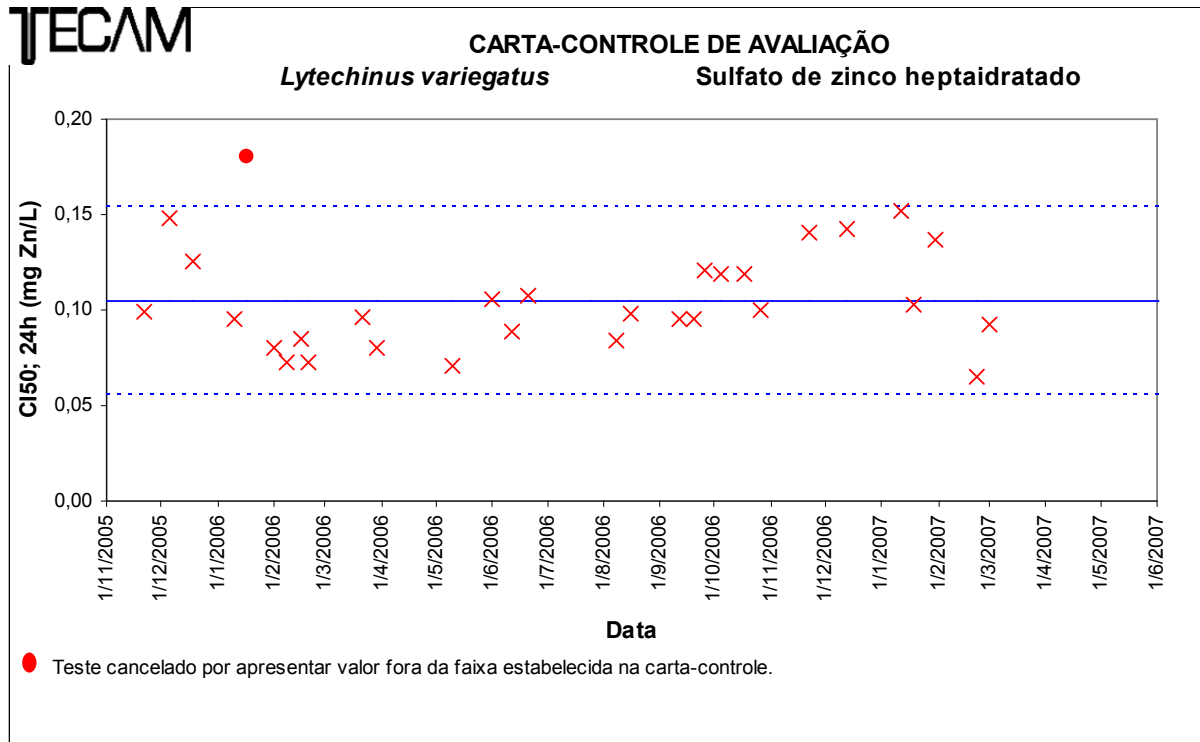
**Tabela 2** – Análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar para a **água de interface** da amostra de **SEDIMENTO CÓD. PSS-40**.

	pH		Salinidade (‰)		OD (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<b>Sedimento- controle</b>	7,83	8,00	33	33	5,0	5,5
<b>Sedimento Cód. PSS-40</b>	7,98	8,02	33	33	5,2	5,2

**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-40**.

	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-40</b>	7,89	7,70	35	33	6,2	4,0	11,75	6,50	0,454	0,156

**ANEXO 1**



RL1283/07LYC