

**SEDIMENTOS MARINHOS  
(CODESP/Prog. 25)**

**Teste de Toxicidade Aguda com *Leptocheirus plumulosus***

**Relatório Final**

- MÉTODO DE REFERÊNCIA:** ABNT Qualidade da água – Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarino com anfípodos. **Norma NBR 15638**. Rio de Janeiro, ABNT, 19 p., 2008.
- AUTOR:** Luciane Lopes Morandi (PhD)
- DATA DE FINALIZAÇÃO DO ESTUDO:** 31 de Janeiro de 2011
- LABORATÓRIO EXECUTOR:** TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
Rua Fábria, 59 - 05051-030  
São Paulo, SP - Brasil
- IDENTIFICAÇÃO:** Número do Relatório: **RL19168/2010 - 1.0LEP**  
Número do Estudo: **19168/2010 - 1.0LEP**
- PATROCINADOR:** FUNDESPA – FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISAS AQUÁTICAS.  
Av. Afrânio Peixoto, 412 – CEP: 05507-000.  
São Paulo, SP.

## ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO.....	3
INTRODUÇÃO .....	4
MATERIAIS E MÉTODOS .....	4
1. Dados das amostras .....	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 .....	6
RESULTADOS .....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
TABELAS .....	8
ANEXO 1 .....	10

**DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**, requerido pela empresa **FUNDESPA – FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISAS AQUÁTICAS**, 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.



---

LUCIANE LOPES MORANDI  
**Bióloga (PhD)**  
**CRBio 35375/01-D**

31 de Janeiro de 2011

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda das amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS** para o anfípodo *Leptocheirus plumulosus*, baseados na mortalidade dos organismos após 10 dias de exposição.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para a execução do teste segue os procedimentos recomendados pela ABNT (2008).

### 1. Dados das amostras

Amostra	Protocolo TECAM	Data de Entrada	Data e Hora de Coleta	Local de
Sedimento - Tecon 3 - Acesso	19168/10-1.0	03/12/10	01/12/10 às 13:30h	Porto de Santos
Sedimento - Tecon 3 - Berço	19169/10-1.0	03/12/10	25/11/10 às 15:10h	
Sedimento - Tecon 4 - Berço	19170/10-1.0	03/12/10	30/11/10 às 09:20h	
Sedimento - Tecon 4 - Acesso	19171/10-1.0	03/12/10	01/12/10 às 09:00h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

### 2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 17/01/2011.

Idade/tamanho: jovens com tamanho entre 500 µm e 1000 µm.

### 3. Condições de teste

Data de início: 18/01/2011.

Data de término: 28/01/2011.

Temperatura média da água: 25,4 ± 0,8°C.

Fotoperíodo: iluminação constante.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

Aeração: sim.

Água de diluição: água marinha sintética preparada a partir de sal comercial marca CORAL REEF RED SEA SALT<sup>®</sup>, com salinidade de 20‰.

Sedimento-controle: sedimento coletado em São Sebastião (SP) em 07/12/2010 e filtrado em rede com abertura de malha de 250 µm.

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

Para o presente estudo a espécie utilizada foi *Leptocheirus plumulosus* (Amphipoda, Corophiidae). Os animais foram obtidos de um criador especializado e foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do teste.

Simultaneamente aos testes com as amostras de sedimento, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>; 96h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,86 mg Zn/L (I.C.: 0,41 a 1,81 mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam (Anexo I), utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL<sub>50</sub>; 96h média de 0,90 mg Zn/L, com limites de controle (média ± 2.desvio padrão) de 0,44 a 1,37 mg Zn/L. O valor obtido está dentro da faixa definida de avaliação do sistema-teste.

#### **5. Procedimentos**

Os testes foram realizados utilizando-se três réplicas para cada amostra. Foram transferidas alíquotas de cerca de 175,0 mL de sedimento em cada frasco-teste e adicionados 725,0 mL de água de diluição com auxílio de um disco plástico para minimizar a ressuspensão dos sedimentos. Em cada frasco foi introduzida aeração suave na superfície da água e o conjunto foi mantido sob repouso por 24 horas antes do início do teste.

Animais em boas condições foram distribuídos aleatoriamente nos frascos-teste, sendo utilizados vinte animais em cada réplica. Grupos de vinte animais em três réplicas foram colocados em um sedimento-controle obtido na mesma região de coleta dos organismos.

Ao final de 10 dias de exposição, o sedimento contido em cada réplica foi peneirado através de uma peneira com abertura de malha de 0,5 mm para o encerramento dos testes. Os organismos sobreviventes ao final do teste foram contados e os organismos não encontrados foram considerados mortos.

Nos dias 0, 2, 8 e 10 foram realizadas análises de pH, salinidade e teor de oxigênio dissolvido da água de interface do controle e de cada amostra. As alíquotas de água

para essas análises foram cuidadosamente coletadas na interface água/sedimento, cerca de 1 cm acima da superfície do sedimento, formando uma amostra composta por alíquotas de cada réplica.

Foi preparada uma réplica adicional do controle e de cada amostra, sem adição de animais, para realização de análises de pH, salinidade, teor de oxigênio dissolvido da água intersticial do sedimento no início e no final dos testes, além de nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada, no início do teste. Estas amostras de água intersticial foram obtidas através da centrifugação do sedimento por 30 minutos a 3500 rpm.

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 10 dias de exposição, a mortalidade dos organismos das amostras foi comparada com a do controle, utilizando-se as seguintes análises estatísticas:

- Teste de normalidade do Chi-Quadrado (Zar, 1999);
- Teste-F para homogeneidade de variância (Zar, 1999), e
- Teste de hipóteses por bioequivalência (Erickson e McDonald, 1995), com aplicação da constante de proporcionalidade (“r”) de 0,80, calculada para a espécie *Leptocheirus plumulosus* (Prósperi *et al.*, 2008).

## RESULTADOS

Os resultados dos testes com as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS** estão apresentados na Tabela 1. Os valores obtidos estão dentro da faixa estabelecida para a aceitação dos resultados (ABNT, 2008).

Com relação às análises químicas realizadas durante os testes, os valores de oxigênio dissolvido, salinidade, pH, nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada da água de interface e da água intersticial estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Quanto à concentração de amônia não ionizada da água intersticial, os valores iniciais das amostras **19168/2010-1.0 (Sedimento - Tecon 3 - Acesso)**; **19170/2010-1.0 (Sedimento - Tecon 4 - Berço)** e **19171/2010-1.0 (Sedimento - Tecon 4 - Acesso)** estiveram acima do

limite de 0,8 mg/L que, isoladamente, pode causar efeito tóxico para *Leptocheirus plumulosus* (USEPA, 2001).

A aplicação das análises estatísticas permitiu verificar que as amostras apresentaram toxicidade para *Leptocheirus plumulosus*, com exceção das amostras 19168/2010-1.0 (**Sedimento - Tecon 3 - Acesso**) e 19171/2010-1.0 (**Sedimento - Tecon 4 - Acesso**), que não apresentaram toxicidade, em comparação com o sedimento-controle, após 10 dias de exposição.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT Qualidade da água – Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarino com anfípodos. **Norma NBR 15638**. Rio de Janeiro, ABNT, 19 p., 2008.
- 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.
- Erickson, W.P.; McDonald, L.L. Tests for bioequivalence of control media and test media in studies of toxicity. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 14, p. 1274-1256, 1995.
- Prósperi, V. A.; Romanelli, M. F.; Buratini, S. V.; Cachattori, D. ; Sáfyadi, R. S. ; Tiritan, A. R. Determinação da constante de proporcionalidade utilizada no Teste t por bioequivalência para o ensaio com o anfípoda estuarino *Leptocheirus plumulosus*. In: X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Livro de Resumos, 2008. Bento Gonçalves, RS. p. 158.
- USEPA **Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus plumulosus***. EPA-600/R-01/020. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 120 p., 2001.
- Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

## TABELAS

**Tabela 1** – Efeito tóxico observado nos testes de toxicidade aguda com *L. plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**, após o período de exposição.

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	0	-
	2	0	20		
	3	0	20		
19168/2010 -1.0	1	2	20	20	Não tóxico
	2	10	20		
	3	0	20		
19169/2010 -1.0	1	15	20	87	Tóxico
	2	17	20		
	3	20	20		
19170/2010 -1.0	1	11	20	58	Tóxico
	2	18	20		
	3	6	20		
19171/2010 -1.0	1	9	20	28	Não tóxico
	2	2	20		
	3	*	20		

\* Réplica excluída da análise estatística.

**Tabela 2** - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

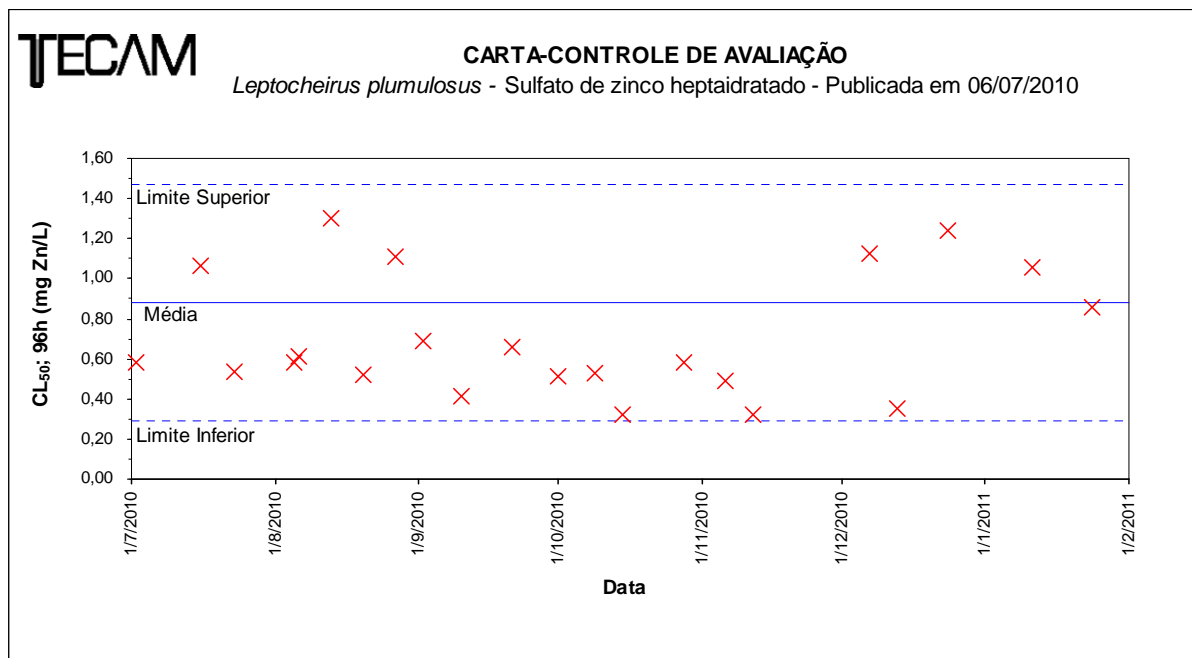
Amostra	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,12	8,15	22,0	24,0	5,21	6,13
19168/2010-1.0	7,73	8,57	22,0	25,0	4,71	5,96
19169/2010-1.0	7,81	8,33	22,0	26,0	5,14	5,86
19170/2010-1.0	7,78	8,47	22,0	26,0	4,38	5,95
19171/2010-1.0	7,83	8,47	23,0	24,0	5,00	6,00



**Tabela 3** – Análises físicas e químicas de salinidade, pH, temperatura, nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada efetuadas na **água intersticial** dos sedimentos no início e no final dos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus*, para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg/L)		Temp. (°C)		Nitrogênio amoniacal (mg/L)		Amônia não ionizada (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,05	7,78	30,0	23,0	5,60	5,65	25,6	24,8	4,25	-	0,023	-
19168/2010-1.0	8,30	7,67	38,0	25,0	5,87	4,19	25,6	24,8	14,00	-	1,232	-
19169/2010-1.0	8,19	7,63	35,0	25,0	5,93	3,71	25,6	24,8	9,75	-	0,679	-
19170/2010-1.0	8,30	7,74	39,0	25,0	5,78	4,85	25,6	24,8	17,50	-	1,540	-
19171/2010-1.0	8,26	7,41	37,0	25,0	5,83	3,80	25,6	24,8	15,00	-	1,213	-

**ANEXO 1**



GLP Compliance: 24/02/09 e 19/11/08  
 INMETRO: ISO17025:CRL 0395,12/02/10 - BPL 0007e0012, 06/09/02  
 Ministério da Agricultura: Port 221, 14/07/09 e Port 180, 05/07/2006  
 ANVISA/REBLAS: ANALI 005 e ANALI 019  
 Certificado de Biossegurança: CQB 0153/01, DOU 14/11/01  
 Secretaria da Agricultura (SP): DOE 01/08/98

RL19168/2010-1.0LEP