

**SEDIMENTOS MARINHOS
(CODESP)**

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:	David Cachattori (BSc)
DATA DE FINALIZAÇÃO DO ESTUDO:	14 de Abril de 2011
LABORATÓRIO EXECUTOR:	TECAM Tecnologia Ambiental Ltda. Rua Fábica, 59 - 05051-030. São Paulo, SP - Brasil.
IDENTIFICAÇÃO:	Número do Relatório: RL3024/2011 - 1.1LEP Número do Estudo: 3024/2011 - 1.1LEP
PATROCINADOR:	FUNDESPA – FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISAS AQUÁTICAS. Av. Afrânio Peixoto, 412 – CEP: 05507-000. São Paulo, SP.

Este relatório cancela e substitui o relatório N° RL3024/2010 – 1.0LEP.

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.....	5
4. Aclimação e controle de sensibilidade.....	5
5. Procedimentos	5
6. Análises estatísticas	6
RESULTADOS	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
TABELAS	8
ANEXO 1	13

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**, requerido pela empresa **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 Fábica, 59 - São Paulo – SP.

14 de Abril de 2011

DAVID CACHATTORI
Biólogo (BSc)
CRBio 68003/01-D

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 Coleta
Sedimento - ARM 16/17 B	3024/2011-1.1	11/02/2011	07/02/2011 às 12:10h	
Sedimento - ARM 16/17 A	3025/2011-1.1	11/02/2011	07/02/2011 às 12:20h	
Sedimento - ARM 19 B	3026/2011-1.1	11/02/2011	07/02/2011 às 13:00h	
Sedimento - ARM 19 A	3027/2011-1.1	11/02/2011	07/02/2011 às 13:20h	
Sedimento - ARM 20/21 B	3028/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 9:40h	
Sedimento - ARM 20/21 A	3029/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 10:00h	
Sedimento - ARM 22 B	3030/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 10:15h	
Sedimento - ARM 22 A	3031/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 10:30h	Canal de Santos
Sedimento - ARM 23 B	3032/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 10:40h	
Sedimento - ARM 23 A	3033/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 10:55h	
Sedimento - ARM CURVA 23 B	3034/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 11:25h	
Sedimento - ARM CURVA 23 A	3035/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 11:40h	
Sedimento - ARM ARM FRIG B	3036/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 11:55h	
Sedimento - ARM ARM FRIG A	3037/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 12:10h	
Sedimento - ARM 25 B	3038/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 12:40h	
Sedimento - ARM 25 A	3039/2011-1.1	11/02/2011	08/02/2011 às 13:10h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 21/03/2011.

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

3. Condições de teste

Data de início: 22/03/2011.

Data de término: 01/04/2011.

Temperatura média da água: $24,9 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$.

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[®], com salinidade de 20‰.

Sedimento-controle: sedimento coletado em São Sebastião (SP) em 22/02/2011 e filtrado em rede com abertura de malha de 500 μm .

4. Aclimação 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_{50} ; 96h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,75 mg Zn/L (I.C.: 0,56 a 1,01 mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam (Anexo I), utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL_{50} ; 96h média de 0,72 mg Zn/L, com limites de controle (média \pm 2.desvio padrão) de 0,06 a 1,38 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, 3, 7 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 no início do teste, os valores obtidos foram inferiores ao limite de 0,8 mg/L aceito para essa espécie (USEPA, 2001).

A aplicação das análises estatísticas permitiu verificar que as amostras não apresentaram toxicidade para *L. plumulosus*, com exceção da amostra **Sedimento - ARM ARM FRIG A** (3037/2011-1.1), que apresentou 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 porbioequivalência 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 *Leptocheirus 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	1	20	3	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3024/2011-1.1	1	4	20	12	Não Tóxico
	2	0	20		
	3	3	20		
3025/2011-1.1	1	2	20	10	Não Tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		
3026/2011-1.1	1	0	20	8	Não Tóxico
	2	2	20		
	3	3	20		
3027/2011-1.1	1	0	20	10	Não Tóxico
	2	3	20		
	3	3	20		
3028/2011-1.1	1	2	20	27	Não Tóxico
	2	7	20		
	3	7	20		

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	1	20	3	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3029/2011-1.1	1	2	20	8	Não Tóxico
	2	3	20		
	3	0	20		
3030/2011-1.1	1	6	20	10	Não Tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
3031/2011-1.1	1	1	20	5	Não Tóxico
	2	1	20		
	3	1	20		
3032/2011-1.1	1	0	20	8	Não Tóxico
	2	1	20		
	3	4	20		
3033/2011-1.1	1	1	20	2	Não Tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
3034/2011-1.1	1	0	20	5	Não Tóxico
	2	1	20		
	3	2	20		
3035/2011-1.1	1	1	20	2	Não Tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	1	20	3	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3036/2011-1.1	1	4	20	10	Não Tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		
3037/2011-1.1	1	20	20	98	Tóxico
	2	20	20		
	3	19	20		
3038/2011-1.1	1	2	20	17	Não Tóxico
	2	3	20		
	3	5	20		
3039/2011-1.1	1	14	20	42	Não Tóxico
	2	4	20		
	3	7	20		

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**.

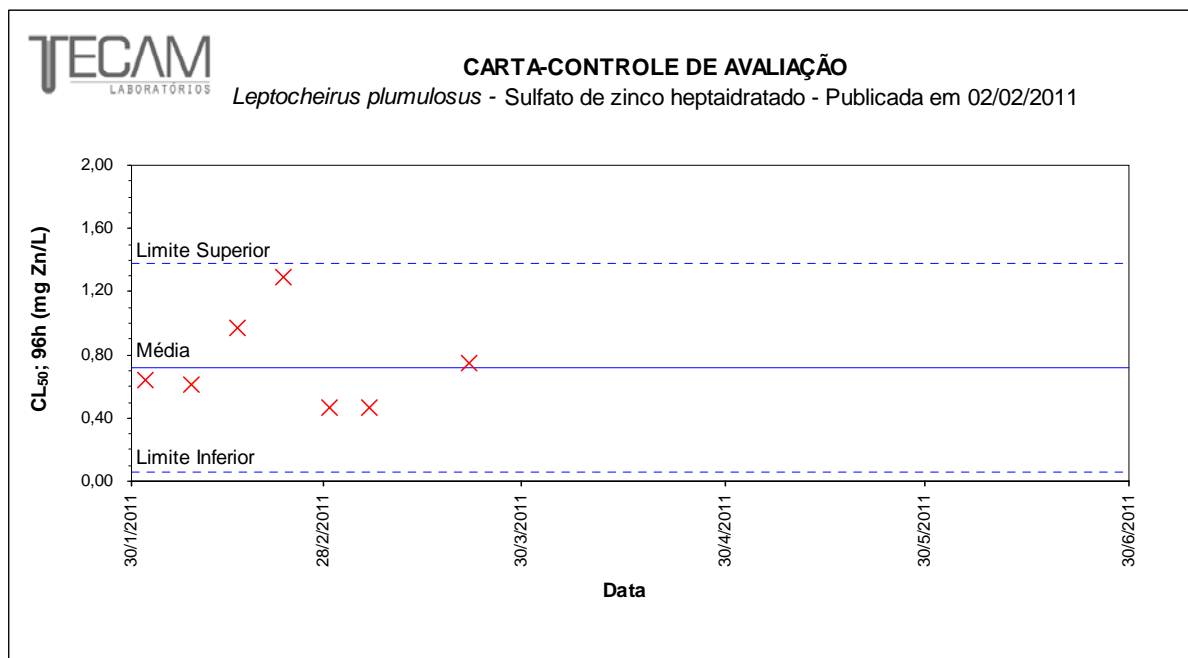
Amostra	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,88	7,97	21	21	5,85	6,10
3024/2011-1.1	7,92	8,49	21	22	4,32	5,90
3025/2011-1.1	7,94	8,22	21	24	4,79	5,79
3026/2011-1.1	7,55	8,26	22	22	3,82	5,71
3027/2011-1.1	7,62	8,43	22	24	4,05	5,59
3028/2011-1.1	7,44	8,41	21	23	3,15	5,48
3029/2011-1.1	7,62	8,11	22	24	4,36	5,72
3030/2011-1.1	7,92	8,32	21	25	5,22	5,73
3031/2011-1.1	7,73	8,25	21	24	4,05	5,65
3032/2011-1.1	8,06	8,28	21	25	5,13	5,74
3033/2011-1.1	7,96	8,13	21	25	5,54	5,92
3034/2011-1.1	7,96	8,08	21	24	4,88	5,34
3035/2011-1.1	8,06	8,09	22	23	4,65	5,77
3036/2011-1.1	7,93	8,18	22	24	4,68	5,84
3037/2011-1.1	8,04	8,13	22	24	5,32	5,90
3038/2011-1.1	7,97	8,23	22	24	4,97	5,87
3039/2011-1.1	7,86	8,12	22	25	4,13	5,74

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	7,84	7,85	23	21	5,73	5,45	24,2	24,0	1,50	-	0,048	-
3024/2011-1.1	7,67	7,70	32	22	4,93	5,25	24,2	24,0	11,00	-	0,225	-
3025/2011-1.1	7,71	7,79	32	23	4,98	4,96	24,2	24,0	16,00	-	0,358	-
3026/2011-1.1	7,69	7,75	32	23	4,93	4,85	24,2	24,0	3,50	-	0,075	-
3027/2011-1.1	7,63	7,88	32	23	4,99	4,90	24,2	24,0	8,25	-	0,154	-
3028/2011-1.1	7,78	7,96	31	22	4,96	4,91	24,2	24,0	6,50	-	0,170	-
3029/2011-1.1	7,58	7,84	34	24	4,82	5,06	24,2	24,0	8,50	-	0,138	-
3030/2011-1.1	7,61	7,97	33	24	4,67	5,30	24,2	24,0	3,00	-	0,054	-
3031/2011-1.1	7,61	7,97	33	24	4,78	5,28	24,2	24,0	14,00	-	0,250	-
3032/2011-1.1	*	7,84	*	25	*	5,00	24,2	24,0	*	-	*	-
3033/2011-1.1	7,76	7,96	31	23	5,18	4,53	24,2	24,0	15,50	-	0,388	-
3034/2011-1.1	7,69	7,96	31	23	4,46	4,96	24,2	24,0	4,00	-	0,085	-
3035/2011-1.1	7,65	7,91	33	24	4,69	5,07	24,2	24,0	13,50	-	0,264	-
3036/2011-1.1	7,68	7,89	32	24	4,51	5,00	24,2	24,0	6,25	-	0,131	-
3037/2011-1.1	7,74	7,83	32	24	4,62	5,13	24,2	24,0	13,50	-	0,323	-
3038/2011-1.1	7,67	7,89	32	26	4,73	5,18	24,2	24,0	2,00	-	0,041	-
3039/2011-1.1	7,71	7,81	34	25	4,50	4,62	24,2	24,0	10,50	-	0,229	-

* Não foi obtida água intersticial suficiente para a leitura dos parâmetros físico-químicos, após a centrifugação do sedimento.

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

RL3024/2011-1.1LEP