

**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 Fábria, 59 - 05051-030
São Paulo, SP - Brasil
- IDENTIFICAÇÃO:** Número do Relatório: **RL3516/2011 - 1.0LEP**
Número do Estudo: **3516/2011 - 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.....	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 **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 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 - AL 01 B	3516/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 10:10h	Canal de Santos
Sedimento - AL 01 A	3517/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 10:20h	
Sedimento - AL 03 B	3518/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 10:45h	
Sedimento - AL 03A	3519/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 11:00h	
Sedimento - AL 04 B	3520/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 11:20h	
Sedimento - AL 04 A	3521/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 11:35h	
Sedimento - CORTE B	3522/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 12:00h	
Sedimento - CORTE A	3523/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 12:20h	
Sedimento - IBBC B	3524/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 12:40h	
Sedimento - IBBC A	3525/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 12:55h	
Sedimento - IBSP B	3526/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 13:30h	
Sedimento - IBSP A	3527/2011 - 1.0	18/2/2011	15/02/2011 às 14:00h	
Sedimento - CS 01 B	3528/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 10:00h	
Sedimento - CS 01 A	3529/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 10:15h	
Sedimento - VALONGO B	3530/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 10:30h	
Sedimento - VALONGO A	3531/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 10:45h	
Sedimento - SUG26 B	3532/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 11:25h	
Sedimento - SUG26 A	3533/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 11:44h	
Sedimento - ARM 27 B	3534/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 12:00h	
Sedimento - ARM 27 A	3535/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 12:15h	
Sedimento - 37 pto 1 B	3536/2011 - 1.0	18/2/2011	16/02/2011 às 12:40h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 28/03/2011.

RL3516/2011-1.0LEP

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

3. Condições de teste

Data de início: 29/03/2011.

Data de término: 08/04/2011.

Temperatura média da água: $24,9 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$.

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 (CL₅₀; 96h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,71 mg Zn/L (I.C.: 0,62 a 0,81 mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam (Anexo I), utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL₅₀; 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, 4, 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 no início do teste, os valores das amostras: 3516/2011-1.0 (**Sedimento - AL 01 B**); 3521/2011-1.0 (**Sedimento - AL 04 A**); 3525/2011-1.0 (**Sedimento - IBBC A**); 3526/2011-1.0 (**Sedimento - IBSP B**); 3527/2011-1.0 (**Sedimento - IBSP A**); 3528/2011-1.0 (**Sedimento - CS 01 B**); 3531/2011-1.0 (**Sedimento - VALONGO A**) e 3533/2011-1.0 (**Sedimento - SUG26 A**), estiveram acima do limite de 0,8 mg/L que, isoladamente, pode causar efeito tóxico para *Leptocheirus plumulosus* (USEPA, 2001).

Foi verificado que as amostras de sedimento não apresentaram toxicidade aguda para *Leptocheirus plumulosus* em comparação com o 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. ; Sáfadi, 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 *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	0	20	2	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3516/2011-1.0	1	0	20	2	Não tóxico
	2	0	20		
	3	1	20		
3517/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	1	20		
	3	1	20		
3518/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	2	20		
3519/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	2	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3520/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	2	20		
3521/2011-1.0	1	0	20	5	Não tóxico
	2	2	20		
	3	1	20		
3522/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	2	20		
3523/2011-1.0	1	0	20	5	Não tóxico
	2	2	20		
	3	1	20		
3524/2011-1.0	1	0	20	2	Não tóxico
	2	0	20		
	3	1	20		
3525/2011-1.0	1	0	20	12	Não tóxico
	2	5	20		
	3	2	20		
3526/2011-1.0	1	1	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	1	20		
3527/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		

Amostra	Rép.	N° final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	2	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3528/2011-1.0	1	0	20	5	Não tóxico
	2	2	20		
	3	1	20		
3529/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
3530/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	1	20		
	3	1	20		
3531/2011-1.0	1	3	20	8	Não tóxico
	2	1	20		
	3	1	20		
3532/2011-1.0	1	0	20	15	Não tóxico
	2	4	20		
	3	5	20		
3533/2011-1.0	1	1	20	3	Não tóxico
	2	1	20		
	3	0	20		
3534/2011-1.0	1	2	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
3535/2011-1.0	1	0	20	5	Não tóxico
	2	0	20		
	3	3	20		

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	2	-
	2	0	20		
	3	1	20		
3536/2011-1.0	1	0	20	7	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		

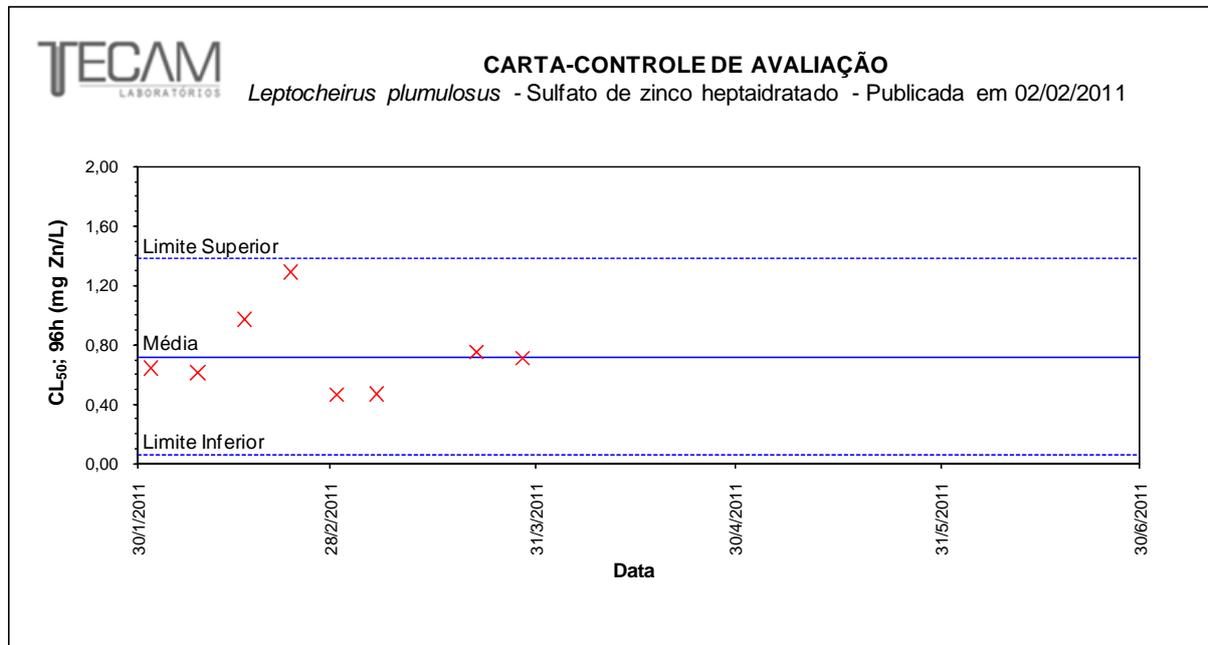
Tabela 2 - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,70	8,05	20	21	6,11	6,17
3516/2011-1.0	7,86	8,23	21	21	4,92	6,12
3517/2011-1.0	7,93	8,35	21	21	4,76	6,12
3518/2011-1.0	8,07	8,43	21	22	4,88	6,19
3519/2011-1.0	8,06	8,23	21	22	4,95	6,12
3520/2011-1.0	8,06	8,45	22	22	5,43	6,05
3521/2011-1.0	8,10	8,25	21	22	4,81	6,03
3522/2011-1.0	8,08	8,55	22	22	4,73	5,95
3523/2011-1.0	8,06	8,47	21	23	5,01	5,99
3524/2011-1.0	8,11	8,39	21	22	4,87	5,96
3525/2011-1.0	8,06	8,42	21	22	4,49	5,96
3526/2011-1.0	8,08	8,35	22	22	4,52	5,88
3527/2011-1.0	8,08	8,39	21	22	4,38	5,90
3528/2011-1.0	8,17	8,52	21	23	4,28	5,80
3529/2011-1.0	8,11	8,40	22	24	4,50	5,79
3530/2011-1.0	8,12	8,37	21	25	4,32	5,70
3531/2011-1.0	8,11	8,42	22	24	4,25	5,71
3532/2011-1.0	8,08	8,57	21	24	4,66	5,85
3533/2011-1.0	8,13	8,45	21	25	4,67	5,93
3534/2011-1.0	8,04	8,35	22	25	4,99	5,89
3535/2011-1.0	7,95	8,20	20	25	4,92	5,86
3536/2011-1.0	8,01	8,47	22	25	4,70	5,92

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	7,88	7,90	26	24	5,29	4,62	24,6	24,8	3,50	-	0,120	-
3516/2011-1.0	7,80	7,87	32	24	4,44	4,82	24,6	24,8	30,00	-	0,845	-
3517/2011-1.0	7,79	7,88	31	24	4,70	4,82	24,6	24,8	24,00	-	0,661	-
3518/2011-1.0	7,70	7,83	31	24	4,29	4,67	24,6	24,8	23,50	-	0,529	-
3519/2011-1.0	7,78	7,84	32	25	4,39	4,15	24,6	24,8	19,00	-	0,512	-
3520/2011-1.0	7,68	7,91	32	25	4,21	4,67	24,6	24,8	12,00	-	0,258	-
3521/2011-1.0	7,82	7,93	32	28	4,50	4,97	24,6	24,8	47,50	-	1,399	-
3522/2011-1.0	7,65	7,85	31	26	4,34	4,85	24,6	24,8	22,00	-	0,442	-
3523/2011-1.0	7,78	7,75	30	25	4,48	4,34	24,6	24,8	18,50	-	0,498	-
3524/2011-1.0	7,62	7,82	31	25	4,25	4,51	24,6	24,8	32,50	-	0,611	-
3525/2011-1.0	7,89	7,76	34	27	4,32	4,90	24,6	24,8	35,00	-	1,178	-
3526/2011-1.0	7,98	7,70	32	26	4,53	4,68	24,6	24,8	22,00	-	0,924	-
3527/2011-1.0	7,88	7,94	32	21	5,00	5,22	24,6	24,8	30,00	-	1,010	-
3528/2011-1.0	8,03	7,87	31	26	4,74	5,01	24,6	24,8	22,50	-	1,055	-
3529/2011-1.0	7,72	8,02	31	26	4,53	5,09	24,6	24,8	20,00	-	0,471	-
3530/2011-1.0	7,76	7,99	32	25	4,48	5,14	24,6	24,8	22,00	-	0,566	-
3531/2011-1.0	8,00	7,84	32	25	4,37	4,66	24,6	24,8	25,00	-	1,098	-
3532/2011-1.0	7,87	7,95	33	25	5,11	4,71	24,6	24,8	23,50	-	0,774	-
3533/2011-1.0	7,93	7,93	32	25	4,93	4,76	24,6	24,8	27,50	-	1,035	-
3534/2011-1.0	7,80	7,95	34	26	4,53	4,73	24,6	24,8	13,00	-	0,358	-
3535/2011-1.0	7,86	7,73	33	26	5,28	4,76	24,6	24,8	14,00	-	0,451	-
3536/2011-1.0	7,93	7,78	34	26	4,54	4,43	24,6	24,8	16,00	-	0,589	-

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

RL3516/2011-1.0LEP