

**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:** 03 de Maio de 2011
- LABORATÓRIO EXECUTOR:** TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.
Rua Fábria, 59 - 05051-030
São Paulo, SP - Brasil
- IDENTIFICAÇÃO:** Número do Relatório: **RL4071/2011 - 1.0LEP**
Número do Estudo: **4071/2011 - 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.....	5
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	14

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 Fábria, 59 - São Paulo – SP.

03 de Maio 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 de Coleta	Local de Coleta
Sedimento - CS02 A	4071/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 10:38 h	Canal de Santos
Sedimento - CS03 B	4072/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 10:47 h	
Sedimento - CS03 A	4073/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 11:05 h	
Sedimento - ARM 29 B	4074/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 11:45 h	
Sedimento - ARM 29 A	4075/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 11:55 h	
Sedimento - ARM 29/30 B	4076/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 12:05h	
Sedimento - ARM 29/30 A	4077/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 12:25 h	
Sedimento - ARM 38 B	4078/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 13:05 h	
Sedimento - ARM 38 A	4079/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 13:20 h	
Sedimento - ARM 39 B	4080/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 13:25 h	
Sedimento - ARM 39 A	4081/2011 - 1.0	25/02/2011	22/02/2011 às 13:40 h	
Sedimento - AL 02 B	4082/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 10:14 h	
Sedimento - AL 02 A	4083/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 10:30 h	
Sedimento - PIER BARCAÇA B	4084/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 10:50 h	
Sedimento - PIER BARCAÇA A	4085/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 11:05 h	
Sedimento - ARM 30 B	4086/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 12:10 h	
Sedimento - ARM 30 A	4087/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 12:20 h	
Sedimento - ARM 31 B	4088/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 12:30 h	
Sedimento - ARM 31 A	4089/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 12:50 h	
Sedimento - ARM 31/32 B	4090/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 13:00 h	
Sedimento - ARM 31/32 A	4091/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 13:10 h	
Sedimento - ARM 32 B	4092/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 13:25 h	
Sedimento - ARM 32 A	4093/2011 - 1.0	25/02/2011	23/02/2011 às 13:35 h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 18/04/2011.

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

3. Condições de teste

Data de início: 19/04/2011.

Data de término: 29/04/2011.

Temperatura média da água: $24,6 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$.

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 29/03/2011 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: 1,00 mg Zn/L (I.C.: 0,78 a 1,29 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, 9, 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 4080/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 39 B**); 4081/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 39 A**); 4087/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 30 A**) e 4090/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 31/32 B**) estiveram acima do limite de 0,8 mg/L que, isoladamente, pode causar efeito tóxico para *Leptocheirus plumulosus* (USEPA, 2001).

Foi verificado que a amostra de sedimento 4076/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 29/30 B**) apresentou toxicidade para *Leptocheirus plumulosus*. As demais amostras 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 Sedimento - CS02 A (CODESP) 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	0	-
	2	0	20		
	3	0	20		
4071/2011-1.0	1	0	20	8	Não tóxico
	2	0	20		
	3	5	20		
4072/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	2	20		
4073/2011-1.0	1	3	20	7	Não tóxico
	2	0	20		
	3	1	20		

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	0	-
	2	0	20		
	3	0	20		
4074/2011-1.0	1	10	20	27	Não tóxico
	2	4	20		
	3	2	20		
4075/2011-1.0	1	4	20	30	Não tóxico
	2	6	20		
	3	8	20		
4076/2011-1.0	1	10	20	43	Tóxico
	2	6	20		
	3	10	20		
4077/2011-1.0	1	2	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
4078/2011-1.0	1	4	20	8	Não tóxico
	2	1	20		
	3	0	20		
4079/2011-1.0	1	4	20	33	Não tóxico
	2	6	20		
	3	10	20		
4080/2011-1.0	1	1	20	2	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
4081/2011-1.0	1	0	20	2	Não tóxico
	2	0	20		
	3	1	20		

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	0	-
	2	0	20		
	3	0	20		
4082/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
4083/2011-1.0	1	0	20	2	Não tóxico
	2	1	20		
	3	0	20		
4084/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
4085/2011-1.0	1	0	20	7	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		
4086/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		
4087/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
4088/2011-1.0	1	2	20	5	Não tóxico
	2	1	20		
	3	0	20		
4089/2011-1.0	1	0	20	7	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		

Amostra	Rép.	N° final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	20	0	-
	2	0	20		
	3	0	20		
4090/2011-1.0	1	4	20	7	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
4091/2011-1.0	1	6	20	13	Não tóxico
	2	0	20		
	3	2	20		
4092/2011-1.0	1	0	20	7	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		
4093/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		

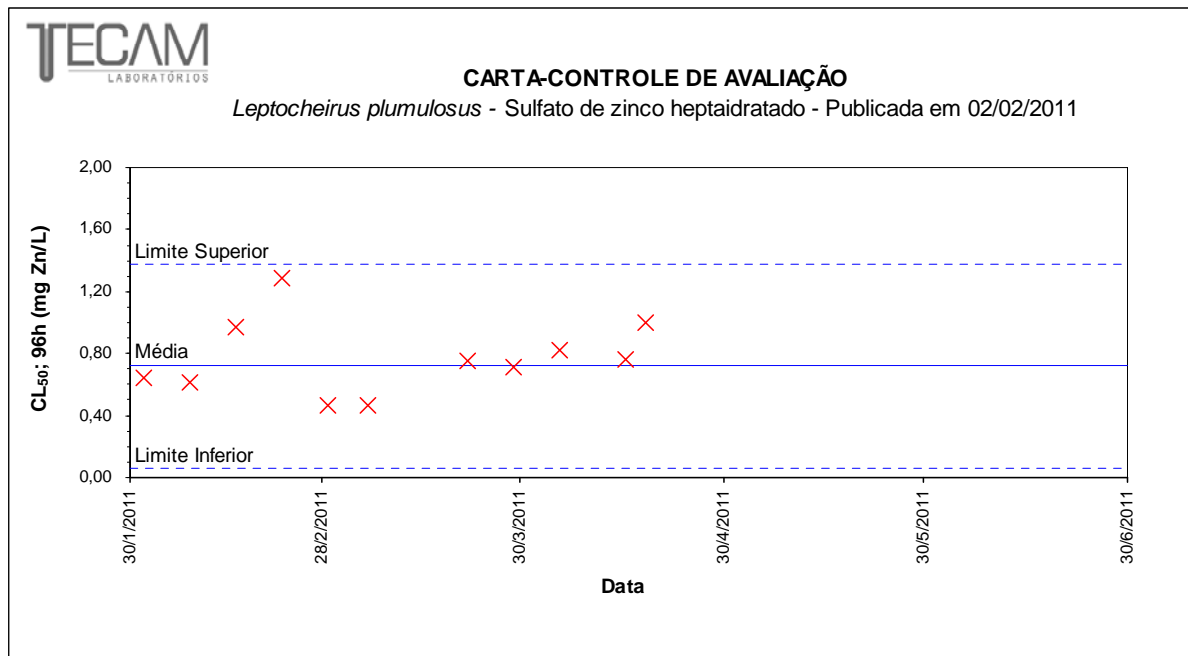
Tabela 2 - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,65	7,99	20	21	6,07	6,66
4071/2011-1.0	7,68	8,18	20	22	6,49	6,65
4072/2011-1.0	7,75	8,39	20	22	6,50	6,60
4073/2011-1.0	7,74	8,35	20	22	6,49	6,63
4074/2011-1.0	7,74	8,10	20	22	6,43	6,50
4075/2011-1.0	7,71	7,99	20	23	6,38	6,54
4076/2011-1.0	7,77	8,27	20	22	6,46	6,38
4077/2011-1.0	7,73	8,40	20	23	6,44	6,54
4078/2011-1.0	7,76	8,27	20	22	6,49	6,60
4079/2011-1.0	7,78	8,14	20	23	6,52	6,57
4080/2011-1.0	7,86	8,34	20	23	6,56	6,67
4081/2011-1.0	7,88	8,38	21	24	6,58	6,64
4082/2011-1.0	7,82	8,28	20	23	6,59	6,72
4083/2011-1.0	7,84	8,31	20	23	6,60	6,70
4084/2011-1.0	7,85	8,44	20	23	6,57	6,70
4085/2011-1.0	7,82	8,05	20	23	6,56	6,72
4086/2011-1.0	7,88	8,29	20	23	6,52	6,72
4087/2011-1.0	7,90	8,40	21	24	6,48	6,68
4088/2011-1.0	7,89	8,27	21	23	6,51	6,72
4089/2011-1.0	7,87	8,28	21	24	6,55	6,68
4090/2011-1.0	7,83	8,70	21	25	6,51	6,63
4091/2011-1.0	7,82	8,39	20	24	6,49	6,65
4092/2011-1.0	7,76	8,35	21	25	6,47	6,64
4093/2011-1.0	7,80	8,26	20	25	6,43	6,51

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	7,91	7,67	25	25	5,62	5,39	26,0	24,4	4,50	-	0,183	-
4071/2011-1.0	7,75	7,67	30	24	5,84	5,06	26,0	24,4	15,00	-	0,418	-
4072/2011-1.0	7,75	7,77	30	24	5,54	4,99	26,0	24,4	19,00	-	0,530	-
4073/2011-1.0	7,80	7,78	30	24	5,54	4,32	26,0	24,4	23,00	-	0,717	-
4074/2011-1.0	7,75	7,62	32	23	5,60	5,02	26,0	24,4	23,00	-	0,641	-
4075/2011-1.0	7,75	7,68	34	23	5,56	4,66	26,0	24,4	15,00	-	0,409	-
4076/2011-1.0	7,71	7,76	33	27	5,15	4,84	26,0	24,4	22,50	-	0,573	-
4077/2011-1.0	7,76	7,52	34	23	5,61	4,81	26,0	24,4	24,00	-	0,669	-
4078/2011-1.0	7,67	7,68	32	25	5,17	4,15	26,0	24,4	17,50	-	0,408	-
4079/2011-1.0	7,83	7,70	33	25	5,11	4,57	26,0	24,4	23,50	-	0,783	-
4080/2011-1.0	7,77	7,82	34	25	5,05	4,94	26,0	24,4	42,50	-	1,211	-
4081/2011-1.0	7,86	7,81	35	24	5,52	5,06	26,0	24,4	62,50	-	2,177	-
4082/2011-1.0	7,81	7,59	31	26	5,54	4,94	26,0	24,4	21,00	-	0,669	-
4083/2011-1.0	7,79	7,81	32	23	5,56	5,01	26,0	24,4	19,00	-	0,579	-
4084/2011-1.0	7,67	7,59	30	26	5,15	4,63	26,0	24,4	20,00	-	0,466	-
4085/2011-1.0	7,66	7,76	30	25	5,30	5,10	26,0	24,4	17,00	-	0,387	-
4086/2011-1.0	7,70	7,74	34	26	5,25	4,20	26,0	24,4	16,00	-	0,390	-
4087/2011-1.0	7,80	7,73	34	26	5,20	4,53	26,0	24,4	32,00	-	0,975	-
4088/2011-1.0	7,79	7,75	32	25	5,53	4,90	26,0	24,4	23,00	-	0,701	-
4089/2011-1.0	7,72	7,66	34	26	5,07	4,25	26,0	24,4	21,00	-	0,535	-
4090/2011-1.0	7,82	7,86	33	26	5,34	4,22	26,0	24,4	35,00	-	1,141	-
4091/2011-1.0	7,70	7,84	34	25	5,04	4,98	26,0	24,4	26,00	-	0,633	-
4092/2011-1.0	7,76	7,72	32	26	5,16	4,00	26,0	24,4	26,00	-	0,741	-
4093/2011-1.0	7,78	7,70	34	26	5,44	4,63	26,0	24,4	23,00	-	0,670	-

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

RL 4071/2011-1.0 LEP