

**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: 13 de Maio de 2011

LABORATÓRIO EXECUTOR: TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.
Rua Fábria, 59 - 05051-030
São Paulo, SP - Brasil

IDENTIFICAÇÃO: Número do Relatório: **RL5657/2011 - 1.0LEP**
Número do Estudo: **5657/2011 - 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.....	4
4. Aclimação e controle de sensibilidade.....	5
6. Análises estatísticas	6
RESULTADOS	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
TABELAS	8
ANEXO 1	12

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.

13 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 - TEV B	5657/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 09:00h	Canal de Santos
Sedimento - TEV A	5658/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 09:16h	
Sedimento - ARM 33 B	5659/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 09:30h	
Sedimento - ARM 33 A	5660/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 09:45h	
Sedimento - ARM 33/34 B	5661/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 10:00h	
Sedimento - ARM 33/34 A	5662/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 10:15h	
Sedimento - ARM 34 B	5663/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 10:25h	
Sedimento - ARM 34 A	5664/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 10:40h	
Sedimento - ARM 35 B	5665/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 11:00h	
Sedimento - ARM 35 A	5666/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 11:20h	
Sedimento - 35 PTO 1 B	5667/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 11:35h	
Sedimento - 35 PTO 1 A	5668/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 11:50h	
Sedimento - 35 PTO 2 B	5669/2011 - 1.0	18/03/2011	15/03/2011 às 12:00h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 25/04/2011.

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

3. Condições de teste

Data de início: 26/04/2011.

Data de término: 06/05/2011.

Temperatura média da água: 24,2 ± 0,3°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. Acimação 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: 0,68 mg Zn/L (I.C.: 0,62 a 0,75 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 ± 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, 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 das amostras 5661/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 33/34 B**); 5664/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 34 A**); 5665/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 35 B**); 5666/2011-1.0 (**Sedimento - ARM 35 A**); 5667/2011-1.0 (**Sedimento - 35 PTO 1 B**); 5668/2011-1.0 (**Sedimento - 35 PTO 1 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. ; 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 *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	2	20	5	-
	2	0	20		
	3	1	20		
5657/2011-1.0	1	0	20	5	Não tóxico
	2	0	20		
	3	3	20		
5658/2011-1.0	1	0	20	7	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		
5659/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5660/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5661/2011-1.0	1	0	20	7	Não tóxico
	2	0	20		
	3	4	20		
5662/2011-1.0	1	2	20	10	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		
5663/2011-1.0	1	6	20	13	Não tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		

RL 5657/2011-1.0 LEP

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	2	20	5	-
	2	0	20		
	3	1	20		
5664/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		
5665/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5666/2011-1.0	1	0	20	5	Não tóxico
	2	0	20		
	3	3	20		
5667/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5668/2011-1.0	1	0	20	17	Não tóxico
	2	6	20		
	3	4	20		
5669/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		

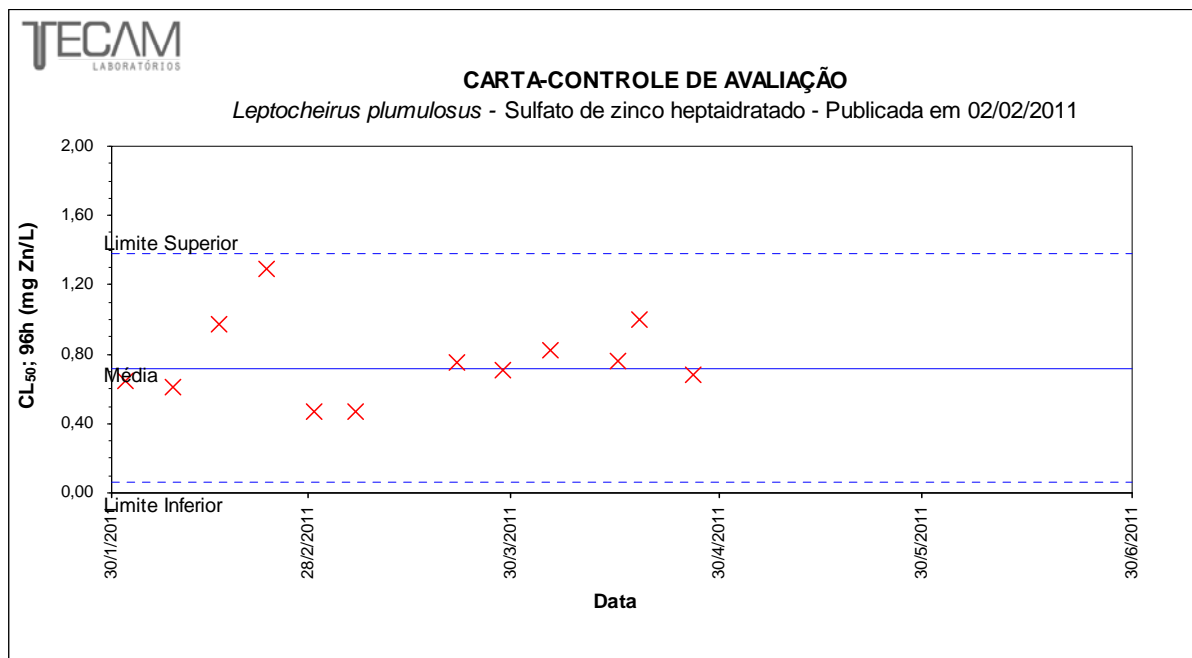
Tabela 2 - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,79	7,97	20	22	6,47	6,67
5657/2011-1.0	7,93	8,52	21	24	5,76	6,32
5658/2011-1.0	7,76	8,46	21	24	5,18	6,54
5659/2011-1.0	7,98	8,37	21	24	5,48	6,55
5660/2011-1.0	7,85	8,43	21	23	5,28	6,59
5661/2011-1.0	7,78	8,38	21	22	5,00	6,40
5662/2011-1.0	7,95	8,41	21	23	5,01	6,50
5663/2011-1.0	7,91	8,25	21	22	5,71	6,65
5664/2011-1.0	8,01	8,42	22	24	5,67	6,58
5665/2011-1.0	8,04	8,44	21	23	5,54	6,62
5666/2011-1.0	8,02	8,51	21	23	5,00	6,60
5667/2011-1.0	8,10	8,46	22	24	5,43	6,53
5668/2011-1.0	8,01	8,45	21	24	5,01	6,54
5669/2011-1.0	7,94	8,40	21	23	5,00	6,64

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	25	22	6,22	5,81	24,2	24,8	3,00	-	0,100	-
5657/2011-1.0	7,73	7,71	35	24	4,81	4,75	24,2	24,8	32,50	-	0,743	-
5658/2011-1.0	7,73	7,67	34	23	5,18	5,04	24,2	24,8	32,50	-	0,743	-
5659/2011-1.0	7,62	7,68	32	22	5,04	4,90	24,2	24,8	25,00	-	0,456	-
5660/2011-1.0	7,88	7,65	35	25	5,10	5,00	24,2	24,8	25,00	-	0,800	-
5661/2011-1.0	7,67	7,40	34	25	4,65	4,56	24,2	24,8	42,50	-	0,849	-
5662/2011-1.0	7,76	7,30	35	25	5,01	4,31	24,2	24,8	27,50	-	0,673	-
5663/2011-1.0	7,58	7,78	34	24	5,01	5,19	24,2	24,8	22,50	-	0,367	-
5664/2011-1.0	7,78	7,64	34	26	4,94	5,30	24,2	24,8	40,00	-	1,023	-
5665/2011-1.0	7,78	7,86	34	24	5,15	5,32	24,2	24,8	37,50	-	0,959	-
5666/2011-1.0	7,81	7,60	35	25	5,22	4,85	24,2	24,8	35,00	-	0,958	-
5667/2011-1.0	7,81	7,41	35	25	4,92	4,84	24,2	24,8	37,50	-	1,026	-
5668/2011-1.0	7,83	7,34	35	24	4,79	4,93	24,2	24,8	37,50	-	1,073	-
5669/2011-1.0	7,72	7,73	35	25	5,01	5,43	24,2	24,8	35,00	-	0,782	-

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 5657/2011-1.0 LEP