

**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: 24 de Maio de 2011

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

IDENTIFICAÇÃO: Número do Relatório: **RL5684/2011 - 1.0LEP**
Número do Estudo: **5684/2011 - 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
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 **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.

24 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 - TECON 2 A	5684/2011-1.0	18/03/2011	17/03/2011 às 09:55h	Canal de Santos
Sedimento - CARGILL 1 B	5685/2011-1.0	18/03/2011	17/03/2011 às 10:20h	
Sedimento - CARGILL 1 A	5686/2011-1.0	18/03/2011	17/03/2011 às 10:30h	
Sedimento - CARGILL 2 B	5687/2011-1.0	18/03/2011	17/03/2011 às 10:45h	
Sedimento - CARGILL 2 A	5688/2011-1.0	18/03/2011	17/03/2011 às 11:00h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 09/05/2011.

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

3. Condições de teste

Data de início: 10/05/2011.

Data de término: 20/05/2011.

Temperatura média da água: 24,4 ± 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.

RL5684/2011-1.0LEP

Sedimento-controle: sedimento coletado em São Sebastião (SP) em 27/04/2011 e filtrado em rede com abertura de malha de 500 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 (CL₅₀; 96h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,81 mg Zn/L (I.C.: 0,57 a 1,16 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, o mesmo utilizado na manutenção 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, 6, 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 obtidos foram inferiores ao limite de 0,8 mg/L aceito para essa espécie (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	5	-
	2	1	20		
	3	2	20		
5684/2011-1.0	1	0	20	8	Não tóxico
	2	0	20		
	3	5	20		
5685/2011-1.0	1	2	20	8	Não tóxico
	2	0	20		
	3	3	20		
5686/2011-1.0	1	0	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	2	20		
5687/2011-1.0	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5688/2011-1.0	1	3	20	12	Não tóxico
	2	2	20		
	3	2	20		

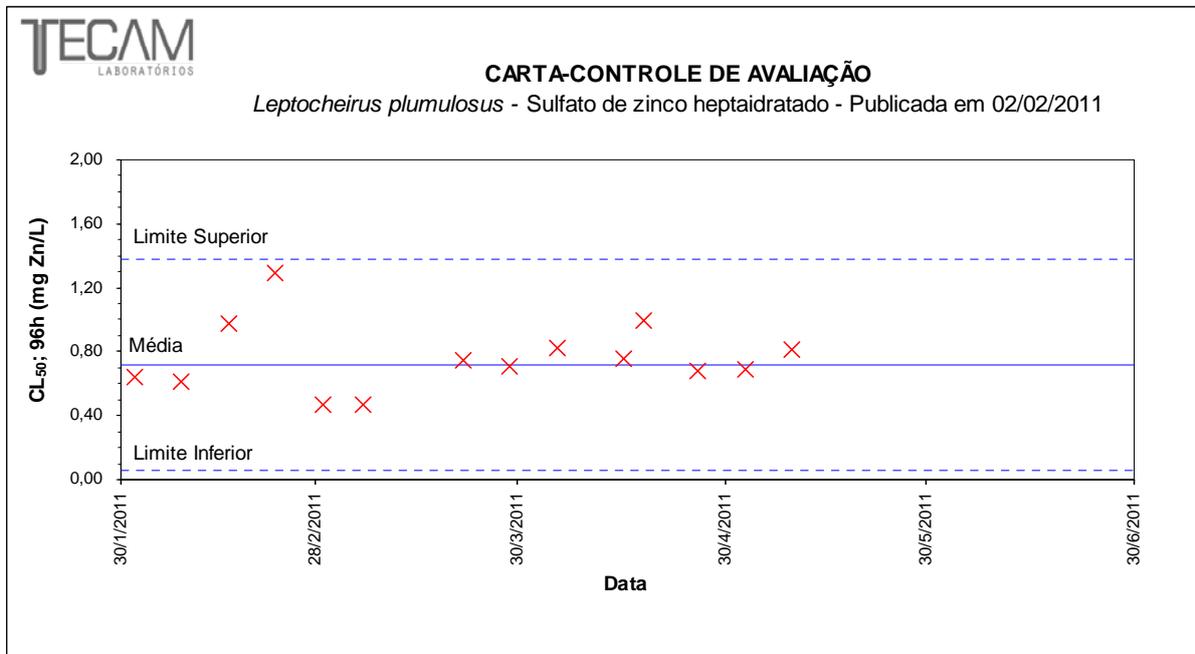
Tabela 2 - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,91	7,99	20	23	6,64	6,75
5684/2011-1.0	7,92	8,24	20	24	6,60	6,66
5685/2011-1.0	7,92	8,22	21	24	6,52	6,69
5686/2011-1.0	7,94	8,24	21	24	6,49	6,68
5687/2011-1.0	7,99	8,21	22	25	6,49	6,41
5688/2011-1.0	7,93	8,15	22	25	6,27	6,55

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	7,85	7,88	23	21	6,05	6,63	24,4	25,4	1,75	-	0,058	-
5684/2011-1.0	7,37	7,84	34	24	4,60	5,55	24,4	25,4	5,00	-	0,051	-
5685/2011-1.0	7,51	7,79	30	22	5,14	5,46	24,4	25,4	19,50	-	0,281	-
5686/2011-1.0	7,44	7,67	35	24	4,84	5,50	24,4	25,4	12,00	-	0,144	-
5687/2011-1.0	7,70	7,84	32	24	5,36	5,60	24,4	25,4	21,50	-	0,477	-
5688/2011-1.0	7,80	7,82	34	23	6,20	5,57	24,4	25,4	7,00	-	0,190	-

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

RL5684/2011-1.0LEP