

**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: 10 de Agosto de 2011

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

IDENTIFICAÇÃO: Número do Relatório: **RL5670/2011-1.1LEP**
Número do Estudo: **RL5670/2011-1.1LEP**

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° RL5670/2011 – 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.....	4
4. Aclimação e controle de sensibilidade.....	5
5. Procedimentos	5
6. Análises estatísticas	6
RESULTADOS	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
TABELAS	8
ANEXO 1	11

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.

10 de Agosto 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 - 35 PTO 2 A	5670/2011 - 1.1	18/03/2011	15/03/2011 às 12:20h	
Sedimento - ARM 10 B	5675/2011 - 1.1	18/03/2011	16/03/2011 às 11:15h	
Sedimento - ARM 10 A	5676/2011 - 1.1	18/03/2011	16/03/2011 às 11:30h	
Sedimento - ARM 12 B	5677/2011 - 1.1	18/03/2011	16/03/2011 às 11:45h	
Sedimento - ARM 12 A	5678/2011 - 1.1	18/03/2011	16/03/2011 às 12:00h	Canal de Santos
Sedimento - ARM 11 B	5679/2011 - 1.1	18/03/2011	16/03/2011 às 12:40h	
Sedimento - ARM 11 A	5680/2011 - 1.1	18/03/2011	16/03/2011 às 13:00h	
Sedimento - TECON 1 B	5681/2011 - 1.1	18/03/2011	17/03/2011 às 09:10h	
Sedimento - TECON 1 A	5682/2011 - 1.1	18/03/2011	17/03/2011 às 09:20h	
Sedimento - TECON 2 B	5683/2011 - 1.1	18/03/2011	17/03/2011 às 09:40h	

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 02/05/2011.

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

3. Condições de teste

Data de início: 03/05/2011.

Data de término: 13/05/2011.

Temperatura média da água: 24,4 ± 0,5°C.

Fotoperíodo: iluminação constante.

RL5670/2011-1.1LEP

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. 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: 0,69 mg Zn/L (I.C.: 0,54 a 0,87 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, 2, 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. ; 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	1	20	3	-
	2	1	20		
	3	0	20		
5670/2011-1.1	1	2	20	3	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5675/2011-1.1	1	0	20	5	Não tóxico
	2	2	20		
	3	1	20		
5676/2011-1.1	1	0	20	7	Não tóxico
	2	2	20		
	3	2	20		
5677/2011-1.1	1	4	20	10	Não tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		
5678/2011-1.1	1	0	20	8	Não tóxico
	2	5	20		
	3	0	20		
5679/2011-1.1	1	0	20	7	Não tóxico
	2	3	20		
	3	1	20		

RL5670/2011-1.1LEP

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	1	20	3	-
	2	1	20		
	3	0	20		
5680/2011-1.1	1	0	20	0	Não tóxico
	2	0	20		
	3	0	20		
5681/2011-1.1	1	3	20	12	Não tóxico
	2	4	20		
	3	0	20		
5682/2011-1.1	1	0	20	13	Não tóxico
	2	4	20		
	3	4	20		
5683/2011-1.1	1	0	20	3	Não tóxico
	2	2	20		
	3	0	20		

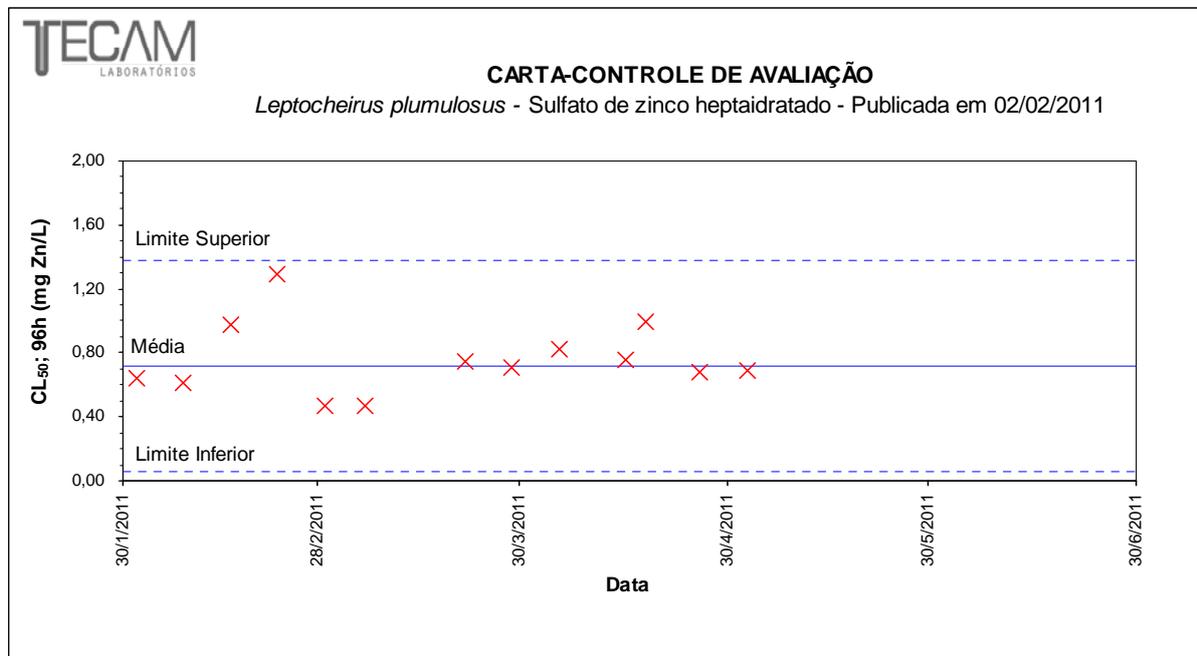
Tabela 2 - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,57	7,95	20	21	6,02	6,66
5670/2011 - 1.1	7,63	8,32	22	23	4,96	6,41
5675/2011 - 1.1	7,71	8,23	23	24	4,42	6,34
5676/2011 - 1.1	7,59	8,10	23	23	4,67	6,31
5677/2011 - 1.1	7,51	8,23	22	22	4,70	6,38
5678/2011 - 1.1	7,51	8,20	22	22	4,87	6,03
5679/2011 - 1.1	7,48	8,04	22	23	4,72	6,09
5680/2011 - 1.1	7,44	8,06	20	23	5,42	6,21
5681/2011 - 1.1	7,65	8,24	21	22	5,31	5,88
5682/2011 - 1.1	7,59	8,23	21	23	5,01	6,27
5683/2011 - 1.1	7,65	8,29	22	23	4,88	6,50

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	7,81	7,70	24	23	6,39	5,20	24,0	25,0	2,75	-	0,081	-
5670/2011 - 1.1	7,71	7,67	35	23	5,07	4,30	24,0	25,0	29,00	-	0,625	-
5675/2011 - 1.1	7,62	7,80	33	24	5,08	4,50	24,0	25,0	5,00	-	0,090	-
5676/2011 - 1.1	7,37	7,61	31	24	5,30	4,82	24,0	25,0	14,50	-	0,148	-
5677/2011 - 1.1	7,66	7,78	30	23	4,98	5,92	24,0	25,0	23,50	-	0,462	-
5678/2011 - 1.1	7,39	7,70	32	25	5,14	4,02	24,0	25,0	19,50	-	0,208	-
5679/2011 - 1.1	7,46	7,70	33	24	4,70	4,82	24,0	25,0	6,00	-	0,075	-
5680/2011 - 1.1	7,67	7,61	33	24	4,96	4,70	24,0	25,0	12,50	-	0,252	-
5681/2011 - 1.1	7,67	7,56	34	25	4,73	5,01	24,0	25,0	29,00	-	0,571	-
5682/2011 - 1.1	7,49	7,39	33	25	5,46	4,08	24,0	25,0	13,00	-	0,174	-
5683/2011 - 1.1	7,60	7,64	35	26	4,85	4,70	24,0	25,0	7,50	-	0,126	-

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

RL5670/2011-1.1LEP