

**Relatório Final RL2965/2009 – 1.0 LEP**  
30 de Abril de 2009

**Título do Estudo**  
Teste de Toxicidade Aguda com *Leptocheirus plumulosus*  
para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**  
**(PROJETO IDCPEA 746)**

CONSULTORIA PAULISTA DE ESTUDOS AMBIENTAIS LTDA – EPP.  
Pç D. Idílio J. Soares, 42 – Cj 101 – 11013 - 927  
Santos, SP.


**Laboratório executor**  
TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábica, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

## 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

**DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**, requerido pela empresa **CONSULTORIA PAULISTA DE ESTUDOS AMBIENTAIS LTDA – EPP** 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.



DAVID CACHATTORI  
**Biólogo (BSc)**  
**CRBio 68003/01-D**

30/04/09

\_\_\_\_\_  
CONSULTORIA PAULISTA DE ESTUDOS  
AMBIENTAIS LTDA – EPP  
**Patrocinador**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## 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 USEPA (1994).

### 1. Dados das amostras

Amostra	Protocolo TECAM	Data de Entrada	Data de Coleta	Local de Coleta
Sedimento - PS-22-S	2965/2009	27/03/2009	24/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-23-S	2966/2009	27/03/2009	24/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-24-S	2967/2009	27/03/2009	24/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-25-S	2968/2009	27/03/2009	24/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-26-S	2969/2009	27/03/2009	24/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-28-S	2970/2009	27/03/2009	25/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-29-S	2971/2009	27/03/2009	25/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-31-S	2972/2009	27/03/2009	25/03/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-32-S	2973/2009	27/03/2009	25/03/2009	Canal do Porto de Santos

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

### 2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 13/04/2009.

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

### 3. Condições de teste

Data de início: 14/04/2009.

Data de término: 24/04/2009.

Temperatura média da água: 25,5 ± 0,5°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<sup>®</sup>, com salinidade de 20‰.

Sedimento-controle: sedimento coletado em São Sebastião (SP) em 11/03/2009 e filtrado em rede com abertura de malha de 250µm.

#### **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: 0,81 mg Zn/L (I.C.: 0,63 a 1,03 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 0,71 mg Zn/L, com limites de controle (média ± 2.desvio padrão) de 0,11 a 1,30 mg Zn/L. O valor obtido está dentro da faixa definida de avaliação do sistema-teste.

#### **5. Procedimentos**

Os testes foram realizados utilizando-se cinco réplicas para cada amostra. Foram transferidas alíquotas de cerca de 175mL de sedimento em cada frasco-teste e adicionados 400mL 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 dez animais em cada réplica. Grupos de dez animais em cinco réplicas foram colocados em um sedimento-controle, utilizado no cultivo dos animais.

Ao final de 10 dias de exposição, o sedimento contido em cada réplica foi peneirado através de uma peneira com abertura de malha de 0,5mm 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 1cm 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. Estas amostras de água intersticial foram obtidas através da centrifugação do sedimento por 30 minutos a 3500rpm.

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.

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 *L. plumulosus* em comparação com o controle, após 10 dias de exposição.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods.** EPA-600/R-94/025. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 156 p., 1994.

**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 *L. 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	10	8	-
	2	1	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	2	10		
2965/2009-1.0	1	0	10	6	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	0	10		
	5	3	10		
2966/2009-1.0	1	0	10	8	Não tóxico
	2	1	10		
	3	2	10		
	4	1	10		
	5	0	10		
2967/2009-1.0	1	0	10	6	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	1	10		
	5	2	10		
2968/2009-1.0	1	0	10	4	Não tóxico
	2	1	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	0	10		
2969/2009-1.0	1	1	10	6	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	1	10		
	5	1	10		
2970/2009-1.0	1	0	10	0	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	0	10		
	5	0	10		

RL2965/2009 – 1.0 LEP



Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	0	10	8	-
	2	1	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	2	10		
2971/2009-1.0	1	0	10	2	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	0	10		
	5	1	10		
2972/2009-1.0	1	1	10	2	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	0	10		
	5	0	10		
2973/2009-1.0	1	0	10	4	Não tóxico
	2	0	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	1	10		

**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	7,67	7,82	25	28	6,32	6,05
2965/2009-1.0	7,31	8,02	22	24	6,19	6,33
2966/2009-1.0	7,34	7,97	22	25	5,78	6,18
2967/2009-1.0	7,33	8,05	22	24	6,47	6,30
2968/2009-1.0	7,36	7,85	22	25	6,39	6,26
2969/2009-1.0	7,22	7,88	22	25	6,88	6,27
2970/2009-1.0	7,22	7,93	22	24	5,37	6,13
2971/2009-1.0	7,22	7,75	22	24	5,41	6,20
2972/2009-1.0	7,36	7,35	23	28	6,54	5,96
2973/2009-1.0	7,42	7,78	28	28	6,84	6,25

RL2965/2009 – 1.0 LEP

**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		Salinidade (‰)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	pH	Temp. (°C)	Nitrogênio amoniacal (mg/L)	Amônia não ionizada (mg/L)
Controle	<b>Inicial</b>	25	4,69	7,66	25	4,00	0,087
	<b>Final</b>	27	5,29	7,80	26	-	-
2965/2009-1.0	<b>Inicial</b>	25	4,46	7,37	25	6,25	0,070
	<b>Final</b>	22	5,06	7,16	26	-	-
2966/2009-1.0	<b>Inicial</b>	25	4,05	3,33	25	5,25	< 0,001
	<b>Final</b>	23	5,17	7,36	26	-	-
2967/2009-1.0	<b>Inicial</b>	26	4,24	7,42	25	4,25	0,053
	<b>Final</b>	24	5,01	7,23	26	-	-
2968/2009-1.0	<b>Inicial</b>	27	3,83	7,28	25	5,00	0,046
	<b>Final</b>	24	5,02	7,36	26	-	-
2969/2009-1.0	<b>Inicial</b>	27	3,98	7,28	25	5,50	0,050
	<b>Final</b>	23	5,70	7,43	26	-	-
2970/2009-1.0	<b>Inicial</b>	24	4,17	7,41	25	10,30	0,133
	<b>Final</b>	25	5,73	7,38	26	-	-
2971/2009-1.0	<b>Inicial</b>	23	4,24	7,36	25	13,50	0,155
	<b>Final</b>	22	5,34	7,83	26	-	-
2972/2009-1.0	<b>Inicial</b>	27	3,86	7,34	25	4,75	0,050
	<b>Final</b>	23	5,17	7,39	26	-	-
2973/2009-1.0	<b>Inicial</b>	27	4,03	7,30	25	4,00	0,038
	<b>Final</b>	30	4,82	7,32	26	-	-

**ANEXO 1**

