



**Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos:
Atendimento à legislação Ambiental - Orientações para realização
de ensaios e apresentação dos resultados nos documentos
encaminhados à CETESB**

ELHE - Setor de Ecotoxicologia Aquática

Material elaborado com base no Seminário realizado na CETESB em novembro/2017

Apoio



Realização



**GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO**
Secretaria do Meio Ambiente

Os ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos são solicitados pela CETESB em diversas ocasiões, como processos de licenciamento, para caracterização e acompanhamento de impactos de novos empreendimentos, na avaliação de risco em áreas contaminadas, no controle de efluentes, em autorizações para uso de produtos em corpos hídricos e avaliações de acidentes ambientais.

Para a verificação de ocorrência de efeitos tóxicos em amostras (água bruta, sedimento, efluentes ou de produtos) submetidas a ensaios ecotoxicológicos, a CETESB indica a utilização de métodos normatizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). No entanto, caso necessário, a CETESB pode solicitar estudos complementares e, na inexistência de uma publicação daquele órgão, indicará métodos cientificamente reconhecidos como os publicados pela International Standardization Organization (ISO), United States Environmental Protection Agency (USEPA), Environmental Canada ou American Society for Testing Materials (ASTM).

Ressalta-se que, em atendimento à Resolução SMA 100 (2013), os ensaios ecotoxicológicos apresentados à CETESB devem ser realizados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do INMETRO pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025, para o parâmetro de interesse.

A rastreabilidade e a padronização dos procedimentos adotados permitem que os resultados obtidos possam ser utilizados com maior segurança para avaliar os potenciais impactos ambientais, em decorrência da presença de empreendimentos ou atividades poluidoras, e, desta forma nortear as possíveis ações de controle.

As orientações descritas a seguir dispõem sobre a seleção de laboratórios, coleta, preservação e preparo de amostras sobre o conteúdo dos Relatórios de Ensaio Ecotoxicológicos e dos Relatórios Técnicos parciais ou final de interpretação dos dados encaminhados à CETESB para obtenção das licenças, autorizações ou atendimento a exigências. As orientações abaixo elencadas foram apresentadas no Seminário “Ensaio Ecotoxicológicos com Organismos Aquáticos - Atendimento à Legislação Ambiental”, realizado na sede da CETESB em 22.11.2017. Visando contribuir para a análise dos documentos entregues à CETESB recomenda-se que estas orientações sejam observadas.

Salienta-se que este documento aborda itens importantes que poderão ser complementados e atualizados periodicamente.

I - Para selecionar os laboratórios recomenda-se:

1. Consultar o site do INMETRO (<http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/>), para verificar quais laboratórios possuem acreditação da Comissão Geral de Acreditação (CGCRE) do INMETRO, para o parâmetro de interesse, pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025.
2. Verificar se o laboratório adota, integralmente, os procedimentos estabelecidos na norma ABNT de interesse e se existe alguma exigência adicional indicada pela CETESB (consultar este documento e exigências técnicas específicas de cada processo). Caso o laboratório tenha introduzido alguma alteração (desvios, adições ou exclusões específicas de cada processo) no método de ensaio, quando comparado ao método descrito na norma ABNT, recomenda-se que esta informação seja encaminhada para análise para Setor de Ecotoxicologia Aquática (elhe_cetesb@sp.gov.br) ou Divisão de Análises Hidrobiológicas (elh_cetesb@sp.gov.br), para avaliação, antes da realização do ensaio por este laboratório.

3. No caso de análise de amostras de sedimento com ouriço do mar, verificar se o procedimento de ensaio solicitado é com a interface sedimento água, conforme descrito na ABNT NBR 15350. Neste caso, ressalta-se que, para cada réplica recomenda-se preparar um frasco-teste com 150g de sedimento + 600mL de água, totalizando um mínimo de 4 réplicas por amostra.
4. Verificar se o plano de amostragem permite que o laboratório selecionado execute os ensaios ecotoxicológicos dentro dos prazos de validade estabelecidos para cada tipo de amostra. É importante enfatizar que os ensaios devem ser realizados com a amostra fresca (ver item II - 6).

II - Com relação à coleta, preservação e preparo da amostra e organismo-teste devem ser observados os seguintes itens:

1. Seguir os procedimentos estabelecidos pela ABNT NBR 15469 (2007), além das orientações do Guia de Coleta publicado pela CETESB/ANA (CETESB, 2011).
2. Georreferenciar os locais de amostragem e evidenciar, com a apresentação de mapas ou diagramas, e registro fotográfico.
3. Coletar as amostras de água antes das amostras de sedimento em avaliações que incluam ensaios químicos, físicos, biológicos e ecotoxicológicos.
4. A quantidade de amostra coletada dependerá do tipo e número de análises solicitadas.
5. As amostras de água e efluente devem ser acondicionadas em frascos de vidro ou potes de plástico de polímero inerte, como os de polietileno de alta densidade (Símbolo de identificação "2"). No caso de amostras de sedimento, recomenda-se que sejam utilizados potes de boca larga para facilitar o manuseio.
6. As amostras devem ser submetidas aos ensaios ecotoxicológicos o mais rápido possível, para evitar alterações nas suas características físicas, químicas e biológicas (ISO, 2008). Na impossibilidade da análise imediata (12h a partir da coleta), as amostras de água, efluente e sedimento devem ser mantidas no escuro e sob refrigeração (<10°C) e o ensaio iniciado em até 48h, 36h e 60 dias respectivamente, a partir da coleta, conforme ABNT NBR 15.469 (ABNT, 2007).
7. Em casos excepcionais, quando estes prazos não podem ser cumpridos, devido a algum problema técnico (como transporte, problemas no laboratório) as amostras de água e efluente poderão ser congeladas desde que devidamente justificado e comprovado que este procedimento não altera as suas características físico químicas (como pH, oxigênio dissolvido, condutividade e salinidade) (ISO, 2008). Nestes casos, recomenda-se consultar a CETESB. Encaminhar as consultas para Setor de Ecotoxicologia Aquática (elhe_cetesb@sp.gov.br) ou Divisão de Análises Hidrobiológicas (elh_cetesb@sp.gov.br), para avaliação antes da realização do ensaio por este laboratório.
8. O congelamento, como procedimento usual de preservação, só deverá ser adotado quando existir informação prévia sobre a variabilidade e a influência deste procedimento nas características físicas, químicas e ecotoxicológicas da amostra.

9. Caso a amostra tenha sido congelada, a mesma deve ser totalmente descongelada à temperatura ambiente (no máximo a 25°C) e homogeneizada antes do uso:
 - a. Ensaios onde não são exigidas trocas: utilizar no ensaio e descartar o restante.
 - b. Ensaios onde são exigidas trocas: utilizar no ensaio e com o restante da amostra preparar alíquotas correspondentes ao número de renovações, em frascos totalmente preenchidos e mantidos sob refrigeração até o dia da troca. Assim todas as alíquotas serão submetidas às mesmas condições (ISO, 2008).
10. No caso de ensaios com organismos cultivados em laboratório fornecer informações sobre o cultivo.
11. No caso de captura de organismos *in situ*, como por exemplo, espécimes de ouriço-do-mar, o laboratório deve solicitar a autorização de manejo de fauna silvestre, emitida pela Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais (CBRN) da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Essa autorização deve ser anexada aos Relatórios Técnicos parciais ou final de interpretação dos resultados encaminhados à CETESB, para obtenção das licenças ou autorizações.

NOTA: Devido à inclusão do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* na lista de espécies vulneráveis na Portaria Ministério do Meio Ambiente (MMA) 445/2014 (Brasil, 2014), recomenda-se que *Echinometra lucunter* seja utilizada, uma vez que também está indicada para os ensaios ecotoxicológicos na norma ABNT 15.350 (2012). Esta norma está em processo de revisão e, provavelmente, incluirá outra espécie de ouriço além das existentes.

12. Nos estudos de avaliação da toxicidade permissível de efluentes, em atendimento à Resolução da Secretaria do Meio Ambiente (SMA) 03/2000 (São Paulo, 2000), utilizar organismos-teste de água doce nos ensaios referente a lançamentos em corpos de água doce e, organismos-teste marinhos nos ensaios para avaliação de ambientes marinhos ou estuarinos.

NOTA: Para efluentes lançados diretamente em águas marinhas e, nos casos em que for necessária a reavaliação do limite de toxicidade em ambientes continentais, deve ser realizado um estudo de dispersão física do efluente no corpo receptor, para que se possa estabelecer a ecotoxicidade permissível e eliminar (no caso de reavaliação) as incertezas das estimativas iniciais. Detalhes sobre este estudo podem ser obtidos no documento “Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo” (BERTOLETTI, 2013).

III – Requisitos dos Relatórios de Ensaio Ecotoxicológico:

1. Apresentação das seguintes informações de acordo com a norma ABNT 17025:
 - a) Título;
 - b) nome e endereço do laboratório e local onde os ensaios foram realizados, se diferente do endereço do laboratório;
 - c) nome e informações de contato do cliente;
 - d) identificação do método utilizado;

- e) identificação não ambígua do(s) item(s) ensaiados;
- f) referência ao plano e procedimentos de amostragem (incluindo o transporte, acondicionamento, forma de preservação) utilizados desde a coleta até início do ensaio;
- g) data do recebimento dos itens de ensaio e do início e término da realização do ensaio;
- h) condições ambientais (temperatura máxima e mínima, fotoperíodo e luminosidade) do local da realização do ensaio;
- i) resultados dos ensaios com as unidades de medida;
- j) nome(s), função(s) e assinatura ou identificação equivalente da(s) pessoa(s) autorizada(s) para emissão do Relatório de ensaio;
- k) desvios, adições ou exclusões do método de ensaio e informações específicas do ensaio;
- l) declaração, quando aplicável, sobre a incerteza da medição (ensaio com amostras de efluente);
- m) observações, com justificativas, opiniões e interpretações, quando aplicável.

2. Apresentação das seguintes informações adicionais:

- a) Local e horário da amostragem;
- b) informações sobre o preparo da amostra;
- c) identificação e a procedência do lote de organismos-teste (cultivo em laboratório, ambiente natural ou produtor especializado);
- d) no caso de ensaios com organismos marinhos ou estuarinos quando do acerto da salinidade com salmoura ou sais comerciais é necessário apresentar controle adicional preparado com salmoura e a informação das concentrações testadas recalculadas, após o ajuste da salinidade;
- e) dados brutos do ensaio por réplica, assim como os resultados das análises físicas e químicas realizadas durante o experimento (OD, pH, temperatura, amônia e salinidade para amostras marinhas e estuarinas). É importante que a determinação da amônia total seja realizada por laboratório acreditado pela CGCRE do INMETRO para este parâmetro pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025;
- f) os testes estatísticos aplicados aos resultados obtidos devem ser citados e os cálculos anexados. Para tanto, utilizar nesta análise os procedimentos estabelecidos pela USEPA (2000, 2002 a, b). Caso os dados apresentem normalidade e homogeneidade de variâncias, deve ser utilizado o teste “t” por bioequivalência indicando o valor da constante de proporcionalidade “r” adotada;

NOTA: Os valores da constante de proporcionalidade podem ser obtidos de dados de literatura como os dados publicados por BURATINI e BERTOLETTI (2006); BERTOLETTI et al. (2007) e PRÓSPERI et al. (2008, 2016);

- g) carta controle com os resultados dos ensaios para avaliação da sensibilidade do organismo- teste para o período que inclua os ensaios apresentados. Indicar a substância de referência utilizada, respectiva unidade de medida, a forma de expressão dos resultados e a data de realização dos ensaios;
- h) Expressão dos resultados conforme o estabelecido no Quadro 1.

IV - No Relatório Técnico de análise dos resultados, as seguintes informações são necessárias:

- a) Detalhar os procedimentos de amostragem (incluindo o transporte, acondicionamento, forma de preservação) utilizados pelo laboratório;
- b) resumo dos procedimentos de cultivo e manutenção dos organismos-teste;
- c) resumo do método adotado. Caso tenham sido realizados desvios, adições ou exclusões do método de ensaio (ver item I.2) descrever as condições específicas de ensaio;
- d) tabela com os resultados obtidos;
- e) análise/discussão integrada dos resultados ecotoxicológicos com os obtidos nas análises químicas e físicas realizadas, além de comparação com dados históricos, caso existam;
- f) referências bibliográficas;
- g) autorização de manejo de fauna, quando pertinente;
- h) cadeia de custódia das amostras.

Quadro 1- Apresentação dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos, nos Relatórios de Ensaio encaminhados à CETESB, de acordo com a norma ABNT utilizada

Norma ABNT	Organismo teste recomendado	Expressão dos resultados			
		Água	Sedimento	Efluentes	Subst. referência
NBR 12.713: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - método de ensaio com <i>Daphnia</i> spp (Cladocera, Crustacea).	<i>Daphnia similis</i>	Não tóxico Toxico	-	CE50; 48h	CE50;48h
NBR 12.648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Não tóxico Toxico	-	CENO, CEO; 96h	CI50; 96h
NBR 15.088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes	<i>Danio rerio</i>	Não tóxico Toxico	-	CL50; 48 ou 96h	CL50; 48 ou 96h
NBR 15.499: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes	<i>Danio rerio</i>	Não tóxico Toxico agudo Tóxico crônico	-	VCest; 168h	CL50; 168h para letalidade CE50;168h para crescimento
NBR 13373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia</i> spp , (Crustacea, Cladocera)	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Não tóxico Toxico agudo Toxico crônico	-	CENO e CEO;7 dias	CI50; 7dias
NBR 15470: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda e crônica — Método de ensaio com <i>Hyalella</i> spp (Amphipoda) em sedimentos	<i>Hyalella azteca</i>	-	Não tóxico Toxico agudo Tóxico crônico	-	CL50; 96h
NBR 15411 - 1: Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente) Parte 1: Método utilizando bactérias recém-cultivadas	<i>Vibrio fischeri</i>	CE20	CE20	CE20, 15min	% efeito, 30min
NBR 15411 - 2: Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente) Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas	<i>Vibrio fischeri</i>	CE20	CE20	CE20. 15min	% efeito, 30min
NBR 15411 - 3: Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas	<i>Vibrio fischeri</i>	CE20	CE20	CE20, 15min	% efeito, 30min
NBR 15350: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)	<i>Echinometra lucunter*</i>	Não tóxico Tóxico	Não tóxico Tóxico	CENO e CEO; 36-42h	CI50; 36-42h
NBR 15638: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos	<i>Grandidierella bonnieroides</i> <i>Leptocheirus plumulosus</i>	-	Não tóxico Toxico	-	CL50; 96h
NBR 15308: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda - Método de ensaio com misídeos (Crustacea)	<i>Misidopsis juniae</i>	Não tóxico Toxico	-	CL50; 96h	CL50; 96h

* Devido à inclusão do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* na lista de espécies vulneráveis na Portaria MMA 445 (Brasil, 2014), recomenda-se que *Echinometra lucunter* seja utilizada, uma vez que também está indicada para os ensaios ecotoxicológicos na norma ABNT 15.350 (2012). Esta norma está em processo de revisão e, provavelmente, incluirá outra espécie de ouriço além das existentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **NBR 15.469**: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2007. 7p.

ABNT. **NBR 15.350**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Rio de Janeiro: ABNT, 2012. 21p.

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017. 32p.

BERTOLETTI., E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, Série Manuais, 2013. Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/home/wp-content/uploads/sites/11/2015/06/manual-controle-ecotoxicologico-2013.pdf>. Acesso em: 18 de dezembro de 2017.

BERTOLETTI, E.; BURATINI, S. V.; PRÓSPERI, V. A.; ARAUJO, R. P. A.; WERNER, L. I. Selection of Relevant Effect Levels for Using Bioequivalence Hypothesis Testing. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 2, 2007, 139-145.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 dez. 2014. Seção 1, p.126.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E. In: ZAGATTO, P. BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. Rima: São Carlos, S.P, 2006. p.221-249.

CETESB. **Guia Nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e afluentes líquidos. Carlos Jesus Brandão et al. (Orgs). São Paulo: CETESB; Brasília: ANA. 2011. 326p.

ISO (Suíça). **20.665: 2008**: Water quality- Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. Genève. 21p. 2008.

PRÓSPERI V.A.; TIRITAN, A.R; BURATINI, S.V. Determinação da constante de proporcionalidade utilizada no teste t por bioequivalência para o ensaio com o anfípoda *Grandidierella bonnieroides*. **Resumos**. XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2016, Curitiba, nº 453, p. 1706.

PRÓSPERI, V.A.; ROMANELLI, M.F.; BURATINI, S.V.; CACHATTORI, D.; SAFADI, R.S.; TIRITAN, A.R. Determinação da constante de proporcionalidade no teste t por bioequivalência para o ensaio com o anfípoda estuarino *Leptocheirus plumulosus*. **Resumos**. X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2008, Bento Gonçalves, nº 168, p. 158.

São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Resolução SMA n. 03, de 22 de fevereiro de 2000. Aprova a necessidade de implementar o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo **Diário Oficial (do) Estado de São Paulo**. Poder Executivo, São Paulo, 24.02.00, pág. 28 e em 25.02.00, p. 24.

São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Resolução SMA n. 100, de 17 de outubro de 2013. Regulamenta as exigências para os resultados analíticos, incluindo-se a amostragem, objeto de apreciação pelos órgãos integrantes do Sistema Estadual de Administração da Qualidade Ambiental, Proteção, Controle e Desenvolvimento do Meio Ambiente e Uso Adequado dos Recursos Naturais – SEAQUA. **Diário Oficial (do Estado de São Paulo)**. Poder Executivo, São Paulo, 17 out. 2013. Seção 1, p.41.

USEPA. **Method guidance and recommendations for whole effluent toxicity (WET) testing** (40 CFR Part 136). U. S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC., 2000. EPA 821-B-00-004.

USEPA. **Short-term methods for estimating the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5th ed. U. S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. 2002a. EPA-821-R-02-012.

USEPA. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. 4th ed. U. S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. 2002b. EPA-821-R-02-013.