

**TESTE DE TOXICIDADE COM FLUIDO DE PREENCHIMENTO - NIPACIDE
GT E SISBRAX SQO-40C (CÓDIGO LET 2632) UTILIZANDO
O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus variegatus*
(Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão – Cidade Universitária – Q 7
CEP: 21.949-900 - Tel: (21) 3865-6100

Executado por:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. 24, s/nº - Pólo BIO-RIO – Laboratório - 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste 1083LVC



Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: CENPES/PDEDS/AMA

Gerência de Avaliação e Monitoramento Ambiental

Técnico requisitante: Letícia Falcão Veiga

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello Ilha do Fundão Cidade
Universitária Q7

Telefone: (21) 3865 7128

Avaliação solicitada: Teste embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de teste: crônico de curta duração

Resposta do teste: Efeitos no desenvolvimento dos embriões (retardamento e/ou
ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de Preenchimento
Código do LET 2632

Composição: Nipacide GT (Biocida) 416,7 ppm

Sisbrax SQO-40C (Sequestrante de O₂) 216,2 ppm

Código de entrada no Labtox: L108303

RESULTADO DEFINITIVO	
TESTE EMBRIOLÓGICO	
CENO 0,013 ppm	CEO 0,025 ppm
VC = 0,018 ppm	
Controle: 89% de pluteus	
DSS: CE50 = 1,42 mg.L ⁻¹ (IC = 1,36 – 1,47 mg.L ⁻¹)	

IC = Intervalo de confiança



1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 26 de junho de 2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de Preenchimento - Nipacide GT e Sisbrax SQO-40C (Código do LET 2632) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 - METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999). Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes concentrações da substância, avaliando-se a concentração que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de teste.

A cada série de amostra testada é realizado um teste de toxicidade com o padrão, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida.

CÁLCULO DA CENO, CEO E VC

O valor de CENO (maior concentração utilizada que não causa efeito significativamente diferente do controle) e CEO (menor concentração utilizada que causa efeito significativamente diferente do controle) foi obtido através do teste de hipóteses utilizando-se o programa estatístico TOXSTAT versão 3.3 (Gulley *et al.*, 1991).

A normalidade e homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de "Chi-square" e "Bartlett", respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de "Williams".

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO e indica a concentração máxima aceitável da amostra.



RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	estático sem renovação
Temperatura de incubação.....	25 ± 0,5° C
Fotoperíodo.....	12:12h luz e escuro
Frasco-teste.....	tubos de ensaio
Volume de solução-teste.....	10 mL
Origem dos organismos.....	gametas obtidos de organismos coletados no campo
Nº de organismos / frasco.....	300 ovos
Nº de réplicas / diluição.....	04
Nº de diluições.....	8 + 1 controle*
Alimentação.....	sem alimentação
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Salinidade da água.....	34 ± 1 ‰
Duração do teste.....	24 horas
Resposta.....	embriões mal formados ou com o desenvolvimento retardado
Expressão do resultado.....	CENO, CEO e VC
Método de cálculo.....	Toxstat (Gulley <i>et al.</i> , 1991)

*Controle: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

PREPARO DA AMOSTRA

Foi preparada uma solução-estoque com a mistura dos produtos Nipacide GT (Biocida) e Sisbrax SQO-40C (Sequestrante de O₂), utilizando, respectivamente, os volumes de 0,209 mL e 0,108 mL e avolumando para 500 mL com água do mar. A partir dessa solução, considerada 100%, foram retiradas alíquotas para as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 0,003; 0,006; 0,013; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 % (Fichas em anexo).



VALIDADE DO TESTE

O teste EMBRIOLÓGICO é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- Os parâmetros de qualidade da água estiverem dentro dos limites estabelecidos para a espécie;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox (1,1 - 2,68 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus mal formados e/ou com atraso no desenvolvimento são apresentados na tabela I.

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido com o Fluido de Preenchimento - Nipacide GT e Sisbrax SQO-40C (Código do LET 2632) foi de 0,013 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 0,025 ppm e o VC (valor crônico) de 0,018 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89 % e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,42 mg.L⁻¹ (IC= 1,36 – 1,47 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, encontram-se listados nas fichas em anexo e estiveram dentro dos limites aceitáveis para a espécie.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1999. Água do mar. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, 22 p

Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

L1083LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* obtidos nas diferentes concentrações do Fluido de Preenchimento - Nipacide GT e Sisbrax SQO-40C (Código do LET 2632) no teste conduzido em 26/06/2003.

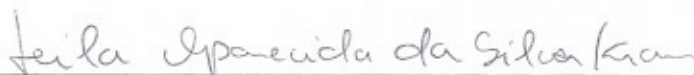
Concentração (ppm)	Número de pluteus saudáveis	Número de pluteus afetados
Controle	89	11
	90	10
	88	12
	89	11
0,003	85	15
	86	14
	87	13
	87	13
0,006	86	14
	87	13
	85	15
	84	16
0,013	85	15
	89	11
	84	16
	91	09
0,025*	70	30
	84	16
	63	37
	70	30
0,05*	36	64
	16	84
	17	83
	14	86
0,1*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100
0,2*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100
0,4*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100

* Estatisticamente diferente do controle

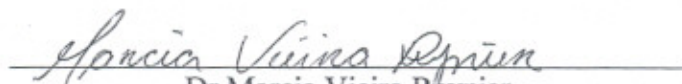


EQUIPE TÉCNICA

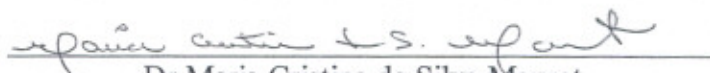
Rio de Janeiro, 30 de junho de 2003.



MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
Diretora Administrativa e Financeira
CRB-2 - 12156/02



Dr Marcia Vieira Reynier
Diretora Científica
CRB-2 - 07135/02



Dr Maria Cristina da Silva Maurat
Diretora Comercial
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGA:

Carina C. Gomes Machado
CRB-2 - 32963/02

Desideria Lima Calleja
CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

ANEXOS

Fluido de Preenchimento (Nipacide e Sisbrax) - Cod LET
 File: t1083 Transform: LOG BASE 10(Y)

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 1 OF 2

GROUP	IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1	0.0	4	0.110	-0.960	-0.960
2	0.003	4	0.138	-0.862	-0.869
3	0.006	4	0.145	-0.840	-0.869
4	0.013	4	0.128	-0.906	-0.869
5	0.025	4	0.283	-0.568	-0.568
6	0.05	4	0.793	-0.104	-0.104

Fluido de Preenchimento (Nipacide e Sisbrax) - Cod LET
 File: t1083 Transform: LOG BASE 10(Y)

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
0.0	-0.960				
0.003	-0.869	1.459		1.73	k= 1, v=18
0.006	-0.869	1.459		1.82	k= 2, v=18
0.013	-0.869	1.459		1.85	k= 3, v=18
0.025	-0.568	6.341	*	1.86	k= 4, v=18
0.05	-0.104	13.869	*	1.87	k= 5, v=18

s = 0.087

Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Handwritten signature

TESTE 1083 L.v.c Data: 26 / 06 / 03 Organismo-teste: L. variegatus

Tipo de teste: () fecundação (☒) embriológico Operador: Viviane

Amostra: cultura de Nipacide + Salmoura

Cód. de entrada no laboratório: L 108303

Data de entrada: 23 / 06 / 03

DADOS DA AMOSTRA: Salinidade: 35 ‰ pH: 8.21

Preparo da Solução-estoque:

0,209 Nipacide

0,108 Salmoura mL (mg) da substância (amostra bruta)

500 mL de água de diluição.

Concentração final da solução-estoque: 400 ppm (mg/L, ‰)

AJUSTE DA SALINIDADE () SIM (☒) NÃO

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
<u>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> ‰	<u>—</u> ppm

SALMOURA

Método de obtenção: — Salinidade: — ‰ pH: —

AJUSTE DO pH () SIM (☒) NÃO

Adição:

— µL de HCl pH final: —

— µL de NaOH pH final: —

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Angra dos Reis

Data: 03 / 06 / 03

Salinidade: 35 ‰ pH: 8,34 OD: 4,8 mg/L

TESTE 1083 L.v.c

Solução-estoque: 100% ppm Vol. final a ser preparado: 100 mL

Concentração (%)	Vol. Amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
0,0	—	100	1-9	10
0,003	0,75 *	99,25	381-384	385
0,006	1,5 *	98,5	386-389	390
0,013	0,013	99,987	391-394	395
0,025	0,025	99,975	396-399	400
0,05	0,05	99,95	401-404	405
0,1	0,1	99,90	406-409	410
0,2	0,2	99,80	411-414	415
0,4	0,4	99,60	416-419	420

OBS:

* da solução teste 0,4%

