

**TESTE DE TOXICIDADE COM COM A FORMULAÇÃO COMPOSTA PELOS
PRODUTOS NIPACIDE GT, SISBRAX SQO40C E FLUORENE R2
(CÓDIGO LET 2725) 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 1258LVC

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 embriológico

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: Código do LET 2725

Formulação composta pelos produtos: Nipacide GT (Código LET 2624 – 416,7 ppm)

Sisbrax SQO40C (Código LET 2625 – 216,2 ppm)

Fluorene R2 (Código LET 2719 – 25 ppm)

Data: 25/11/2003

Código de entrada no Labtox: L125803

Data de entrada no Labtox: 27/11/2003

RESULTADOS	
CENO 0,0015 % da formulação	CEO 0,003 % da formulação
VC = 0,002% da formulação	
Controle: 80,25% de pluteus	
DSS: CE50 = 1,40 mg.L ⁻¹ (IC = 1,33 – 1,47 mg.L ⁻¹)	

IC = Intervalo de confiança



1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 01 de dezembro de 2003, teve como objetivo avaliar a toxicidade crônica da Formulação composta pelos produtos Nipacide GT, Sisbrax SQO40C e Fluorene R2 (Código do LET 2725) 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 diluições da formulação, avaliando-se a diluição 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.....	25 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 0,1%, avolumando-se 2 mL da formulação para 2.000 mL, com água do mar. A partir dessa solução, foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 0,0007; 0,0015; 0,003; 0,006; 0,013; 0,025; 0,05 e 0,1% (Fichas em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox (0,83 - 3,20 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 a Formulação composta pelos produtos Nipacide GT, Sisbrax SQO40C e Fluorene R2 (Código do LET 2725) foi de 0,0015%, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 0,003% e o VC (valor crônico) de 0,002% da formulação.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 80,25% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,40 mg.L⁻¹ (IC= 1,33 - 1,47 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, encontram-se listados nas fichas em anexo.

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.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* obtidos nas diferentes diluições da Formulação composta pelos produtos Nipacide GT, Sisbrax SQO40C e Fluorene R2 (Código do LET 2725), no teste conduzido em 01/12/2003.

Diluição da amostra (%)	Número de pluteus saudáveis	Número de pluteus Afetados
Controle	83	17
	80	20
	81	19
	77	23
0,0007	82	18
	81	19
	84	16
	88	12
0,0015	89	11
	72	28
	82	18
	78	22
0,003*	45	55
	34	66
	30	70
	23	77
0,006*	02	98
	29	71
	09	91
	06	94
0,013*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100
0,025*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100
0,05*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100
0,1*	0	100
	0	100
	0	100
	0	100

* Significativamente diferente do controle

EQUIPE TÉCNICA

Rio de Janeiro, 08 de dezembro de 2003.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12156/02

Marcia Vieira Reynier

Dr. Marcia Vieira Reynier
CRB-2 - 07135/02

Maria Cristina da Silva Maurat

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

BIÓLOGAS:

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

Desideria Lima Calleja
CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

ANEXOS

Formulação 3 produtos - LET 2725

File: C:\ESTAT\1\TOXSTAT\T1258.

Transform: NO TRANSFORMATION

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 1 OF 2

GROUP	IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1	0.0	4	0.170	0.170	0.166
2	0.0007	4	0.163	0.163	0.166
3	0.0015	4	0.198	0.198	0.198
4	0.003	4	0.670	0.670	0.670
5	0.006	4	0.885	0.885	0.885

Formulacao 3 produtos - LET 2725

File: C:\ESTAT\1\TOXSTAT\T1258.

Transform: NO TRANSFORMATION

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
0.0	0.166				
0.0007	0.166	0.069		1.75	k= 1, v=15
0.0015	0.198	0.502		1.84	k= 2, v=15
0.003	0.670	9.136	*	1.87	k= 3, v=15
0.006	0.885	13.065	*	1.88	k= 4, v=15

s = 0.077

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

TESTE 1258 LJC Data: 01/12/03 Organismo-teste: L. variegatus
Tipo de teste: () fecundação (☒) embriológico Operador: Guilherme

Amostra: mistura de produtos (COD LET 2624 + COD LET 2625 + COD LET 2719) COD LET
Cód. de entrada no laboratório: L125803 Data de entrada: 27/11/03 2725
DADOS DA AMOSTRA: Salinidade: 34 ‰ pH: 8,0

Preparo da Solução-estoque: 2 mL (mg) da substância (amostra bruta)
1998 mL de água de diluição.

Concentração final da solução-estoque: 40 ppm (mg/L, ‰)
0,1 hos

AJUSTE DA SALINIDADE () SIM (<input checked="" type="checkbox"/>) 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: <u>—</u> Salinidade: <u>—</u> ‰ pH: <u>—</u>				

AJUSTE DO pH () SIM (<input checked="" type="checkbox"/>) NÃO	
Adição:	
<u>—</u> µL de HCl	pH final: <u>—</u>
<u>—</u> µL de NaOH	pH final: <u>—</u>

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO	
Local de coleta: Angra dos Reis	Data: <u>13/11/03</u>
Salinidade: <u>34</u> ‰	pH: <u>8,14</u> OD: <u>5,95</u> mg/L

TESTE 1258 LVC

Solução-estoque: 0,1 % 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
0,0007	0,78	99,22	76-79	80
0,0015	1,56	98,44	81-84	85
0,003	3,13	96,87	86-89	90
0,006	6,25	93,75	91-94	95
0,013	12,5	87,5	96-99	100
0,025	25	75	101-104	105
0,05	50	50	106-109	110
0,1	100	—	111-114	115

OBS:

Temperatura: Sala: 25 ± 1 °C Incubadora: $25 \pm 0,5$ °C

Concentração (%)	Início			Término		
	S%	OD	pH	S%	OD	pH
0,0	34	5,95	8,14	34	4,94	8,12
0,0007	34	5,95	8,20	34	5,47	8,23
0,0015	34	5,99	8,16	34	5,20	8,21
0,003	34	5,94	8,18	34	5,32	8,19
0,006	34	6,07	8,16	34	5,26	8,23
0,013	34	6,17	8,14	34	5,51	8,24
0,025	34	6,30	8,16	34	5,47	8,16
0,05	34	6,45	8,16	34	5,53	8,13
0,1	34	6,65	8,10	34	5,67	8,11