

ANEXO I

Laudos dos Testes de Toxicidade

L2401MJA

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O PRODUTO ANTICHLOR (SBS) -
CÓDIGO LET 3213 UTILIZANDO *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
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@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Ensaio 2401 MJA

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Letícia Falcão Veiga

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

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Ensaio de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo-teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de ensaio: Agudo

Tempo de exposição: 96 horas

Resposta do ensaio: Efeitos sobre a sobrevivência

Substância de referência: Zinco (sulfato de zinco heptahidratado)

Faixa de sensibilidade do organismo: 0,21 – 0,43 mg.L⁻¹ (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com zinco em 04/01/2006: 0,26 mg.L⁻¹ (0,24 – 0,28 mg.L⁻¹)

Identificação da amostra pelo solicitante: Produto Antichlor (SBS)

Código LET 3213 - Data da coleta: 16/12/2005

Código de entrada no Labtox: L240105

Data de entrada no Labtox: 29/12/2005

Data de início do ensaio: 09/01/2006

Data de término do ensaio: 13/01/2006

RESULTADOS
CL(I)50; 96h: 342,93 ppm
Intervalo de confiança (IC): 317,82 – 370,03 ppm
Sobrevivência no controle: 100 %

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado de 09 a 13 de janeiro de 2006, teve como objetivo determinar a toxicidade aguda do produto Antichlor (SBS), código LET 3213, sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em Cetesb (1992), com adaptações.

Jovens de *M. juniae* com 4 a 6 dias de idade, foram expostos a diferentes diluições do produto, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do ensaio a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

Foi preparada uma solução-estoque de 1.000 ppm, avolumando-se 2,0 mL do produto para 2.000 mL, com água do mar. A partir desta solução, foram preparadas as seguintes soluções-teste: 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 ppm. Na solução-teste de 1.000 ppm os organismos morreram durante a montagem do ensaio (Fichas em anexo).

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90%.

CONTROLE DOS ENSAIOS DE *Mysidopsis juniae*

Mensalmente é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos cultivados no Labtox encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie pelo laboratório, que é de 0,21 a 0,43 mg.L⁻¹.

O resultado da CL(I)50; 96h obtido no ensaio realizado, em janeiro de 2006, com o zinco foi 0,26 mg.L⁻¹ (IC: 0,24 – 0,28 mg.L⁻¹).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio:	agudo
Temperatura de incubação:	25 ± 1,0 °C
Luminosidade:	12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste:	béquer de 400 mL
Volume de solução-teste:	300 mL
Origem dos organismos:	cultivo Labtox
Idade dos organismos:	4 a 6 dias
Nº de organismos / frasco:	10
Nº de réplicas / solução-teste:	3
Nº de soluções-teste:	6 + 1 controle *
Alimentação:	20 náuplios de <i>Artemia</i> sp. recém eclodidos / misidáceo / dia
Água de diluição:	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste:.....	32 a 33‰
Duração do ensaio:	96 horas
Resposta:	mortalidade
Valor medido:	CL(I)50; 96h (diluição inicial letal a 50% dos organismos em 96h)
Método de cálculo:	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

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

3 – RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas, nas diferentes soluções-teste.

A CL(I)50;96h obtida com o produto Antichlor (SBS) – código LET 3213, foi de 342,93 ppm (IC: 317,82 – 370,03 ppm). A sobrevivência dos organismos no controle foi de 100%.

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

L2401MJA

Tabela I - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no ensaio conduzido com o produto Antichlor (SBS) – cód. LET 3213.

Solução-teste (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
15,62	10	10	10	10	10	3,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	9	9	9	
31,25	10	10	10	10	10	3,3
	10	10	10	10	9	
	10	10	10	10	10	
62,5	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
125	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
250	10	9	9	9	9	6,7
	10	10	10	10	9	
	10	10	10	10	10	
500	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Test Type: agudo Duration: 96 hours Concentration Unit: ppm

Raw Data:

Concentration: 15.62 31.25 62.5 125 250 500

Number Exposed: 30 30 30 30 30 30

Mortalities: 1 1 0 0 2 30

SPEARMAN-KARBER TRIM: 3.33%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 342,93

95% Lower Confidence: 317,82

95% Upper Confidence: 370,03

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB 1992. *Água do mar – Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae SILVA, 1979 (CRUSTACEA – MYSIDACEA)*. Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB 19 p.
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.

5 - EQUIPE TÉCNICA:

DIRETORAS:

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

Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado – CRBio-2 - 32963/02

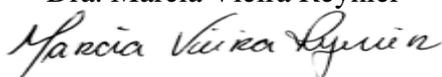
Desideria Lima Calleja – CRBio-2 - 38219/02 P

Gabriele A. Correa da Rocha – CRBio-2 - 42.496/02 P

Viviane Euzébio Luiz – CRBio-2 - 42.535/02 P

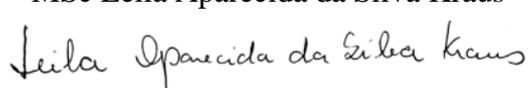
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 13 de janeiro de 2006.



SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

PLANILHA DE ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *MYSIDOPSIS JUNIAE*

Código da Entrada:

6240105

PÁGINA:

1 de 2

Início do ensaio: 09/01/06 Hora: 12:00 Término do ensaio: 13/01/06 Hora: 14:30

Tipo de amostra: Produto Salinidade: 33 ‰ pH: 7,11

Solução-estoque: 2 (mL, g) da substância (amostra bruta) + 1498 mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 1000 (ppm, mg/L, %) Rub.: J

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL

Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —

Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Rub.: JL

Água de diluição: Lote: 062 Barrilete nº 1

Origem dos organismos: Cultivo Labtox Lote: 47242 Idade: 4 a 6 dias

Ensaio: Com aeração () Sem aeração (x) / Estático (x) Semi-estático () renovação: — h

Vol. da solução-teste por béquer: 300 mL Nº de réplicas por solução-teste: 3

Nº de organismos por béquer: 10 Responsável pela adição dos organismos: Gabriele/J

Manutenção do ensaio: Temperatura 25±2°C Fotoperíodo: 12:12 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE		
* Avolumado para <u>1000</u> mL Rub.: <u>J</u>		
Solução-Teste <u>ppm</u>	Vol. sol. estoque mL*	Béquer nº
<u>0,0</u>	<u>—</u>	<u>40 - 42</u>
<u>15,62</u>	<u>15,62</u>	<u>43A - 45A</u>
<u>31,25</u>	<u>31,25</u>	<u>43 - 45</u>
<u>62,5</u>	<u>62,5</u>	<u>46 - 48</u>
<u>125</u>	<u>125</u>	<u>49 - 51</u>
<u>250</u>	<u>250</u>	<u>52 - 54</u>
<u>500</u>	<u>500</u>	<u>55 - 57 57 60</u>
<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>58 - 60</u>

Responsável pelos cálculos: JL

OBS: As diluições foram estabelecidas a partir de ensaio preliminar. JL / Durante a montagem do ensaio os organismos morreram da diluição 1000 ppm.



SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

PLANILHA DE ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *MYSIDOPSIS JUNIAE*

Código da Entrada:

L240A05

PÁGINA:

2 de 2

ACOMPANHAMENTO DO ENSAIO

Béquer nº	Nº de organismos mortos				Béquer nº	Nº de organismos mortos			
	Rub.: <i>CSV</i>	Rub.: <i>CSV</i>	Rub.: <i>CSV</i>	Rub.: <i>CSV</i>		Rub.: <i>CSV</i>	Rub.: <i>CSV</i>	Rub.: <i>CSV</i>	Rub.: <i>CSV</i>
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
40	∅	∅	∅	∅	49	∅	∅	∅	∅
41	∅	∅	∅	∅	50	∅	∅	∅	∅
42	∅	∅	∅	∅	51	∅	∅	∅	∅
43A	∅	∅	∅	∅	52	L	∅	∅	∅
44A	∅	∅	∅	∅	53	∅	∅	∅	L
45A	∅	L	∅	∅	54	∅	∅	∅	∅
43	∅	∅	∅	∅	55	10	—————		
44	∅	∅	∅	L	56	10	—————		
45	∅	∅	∅	∅	57	10	—————		
46	∅	∅	∅	∅					
47	∅	∅	∅	∅					
48	∅	∅	∅	∅					

Alimento: 0h 54 µl Rub.: *CSV* 24h 55 µl Rub.: *CSV* 48h 38 µl Rub.: *CSV* 72h 50 µl Rub.: *CSV*

PARÂMETROS QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Sobrevivência no controle: 100 %

Solução-teste (ppm)	Total de mortos	Mortalidade (%)	Início Rub.: <i>CSV</i>			Término Rub.: <i>CSV</i>			Béquer nº
			S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	
0,0	∅	∅	32	6,19	8,24	32	6,76	7,95	40
15,62	L	3,3	32	6,10	8,20	32	6,64	7,97	43A
31,25	L	3,3	32	6,25	8,14	32	6,86	7,88	43
62,5									
62,5	∅	∅	32	6,22	8,08	32	6,81	7,89	46
125	∅	∅	32	6,27	8,02	32	6,89	7,85	43
250	2	6,7	32	6,33	7,92	33	6,63	7,76	52
500	30	100	32	6,44	7,74	33	5,99	7,54	55
1000	—	—	33	6,49	7,11	—	—	—	—

Código do equipamento utilizado:

Potenciômetro EME 32 Rub.: *CSV* Oxímetro EME04 Rub.: *CSV* Refratômetro EME22 Rub.: *CSV*
Incubadeira — Rub.: *DL* Balança — Rub.: *DL* Micropipeta: EME 28 Rub.: *DL*

Rub. = Rubrica do Operador

Conferido por: Juriane Data: 13 / 01 / 06

L2401LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O PRODUTO ANTICHLOR (SBS) - CÓDIGO LET
3213 UTILIZANDO *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

EXECUTADO POR:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Avenida 24, s/n° - Pólo Bio-Rio - Laboratório 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Ensaio 2401 LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Letícia Falcão Veiga

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

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Ensaio embriolarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

Tempo de exposição: 26 horas

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embriolarval (retardamento e/ou ocorrência
de anomalias)

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos: 1,21 – 1,81 mg.L⁻¹ (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com DSS em 02/01/2006: 1,41 mg.L⁻¹ (1,34 – 1,48 mg.L⁻¹)

Identificação da amostra pelo solicitante: Produto Antichlor (SBS)

Código LET 3213 - Data da coleta: 16/12/2005

Código de entrada no Labtox: L240105

Data de entrada no Labtox: 29/12/2005

Data de início do ensaio: 02/01/2006

Data de término do ensaio: 03/01/2006

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

RESULTADOS	
CENO 31,25 ppm	CEO 62,5 ppm
VC 44,19 ppm	
Controle: 90,5 % de pluteus	

1 - OBJETIVO

O objetivo deste ensaio, realizado em 02 de janeiro de 2006, foi determinar a toxicidade crônica do produto Antichlor (SBS), código LET 3213, sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação a *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), com adaptações. O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições do produto, avaliando-se a solução-teste que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

A cada lote de organismos utilizados é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos mesmos encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

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 a homocedasticidade da proporção de larvas pluteus com desenvolvimento normal foi verificada através dos testes de “Shapiro-wilks” 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.

PREPARO DA AMOSTRA

Foi preparada uma solução-estoque de 1.000 ppm, avolumando-se 1,0 mL do produto para 1.000 mL, com água do mar. A partir desta solução, foram preparadas as seguintes soluções-teste: 3,90; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 ppm (Fichas em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	crônico
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 / solução-teste.....	04
Nº de soluções-teste.....	8 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	32 ‰
Duração do ensaio.....	26 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embriolarval ou anomalias
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.

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 1,21 a 1,81 mg.L⁻¹.

3 – RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus normais e 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 produto Antichlor (SBS) - código LET 3213 foi de 31,25 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 62,5 ppm e o VC (valor crônico) de 44,19 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 90,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,41 mg.L⁻¹ (1,34 – 1,48 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, medidos no início e no final do ensaio, são apresentados nas fichas em anexo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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	0.094				
3.90	0.094	0.082		1.71	k= 1, v=24
7.81	0.097	0.165		1.79	k= 2, v=24
15.62	0.102	0.495		1.82	k= 3, v=24
31.25	0.123	1.813		1.83	k= 4, v=24
62.5	0.143	3.132	*	1.84	k= 5, v=24
125	0.143	3.132	*	1.84	k= 6, v=24
250	0.560	30.661	*	1.85	k= 7, v=24

s = 0.021 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtidos no ensaio realizado com o produto Antichlor (SBS) – cód. LET 3213.

Solução-teste (ppm)	Número de pluteus		Solução-teste (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	91	09	62,5*	89	11
	89	11		86	14
	92	08		87	13
	90	10		81	19
3,90	89	11	125*	86	14
	93	07		85	15
	91	09		89	11
	90	10		83	17
7,81	90	10	250*	44	56
	89	11		41	59
	92	08		43	57
	90	10		48	52
15,62	89	11	500*	0	100
	90	10		0	100
	88	12		0	100
	92	08		0	100
31,25	88	12			
	88	12			
	86	14			
	89	11			

* Diferença significativa em relação ao controle

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. (Echinodermata, Echinoidea)*. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, p20.
- Gulley,D.D.; Boelter,A.M.; Bergman,H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

5 - EQUIPE TÉCNICA

DIRETORAS:

- MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRBio-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

- Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 – 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 – 38219/02 P
Gabrielle A. Correa da Rocha – CRBio-2 – 42496/02 P
Viviane Euzébio Luiz – CRBio-2 – 42535/02 P

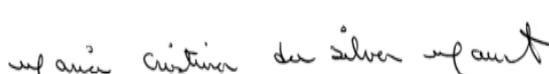
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat



Rio de Janeiro, 16 de janeiro de 2006.

Data Início: 02 / 01 / 06 Hora: 16:15 Término: 03 / 01 / 06

Organismo-teste: L. varicarpus

Tipo de teste: () fecundação (x) embriológico

Tipo de amostra: Produto Cód. entrada L240105 Salinidade: 32 ‰ pH 7,00

Solução-estoque: 1 (mL) (g) da substância (amostra bruta) + 999 mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 1000 (ppm) (mg/L, %)

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL

Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —

Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Ajuste do pH: — µL de HCl — µL de NaOH pH final: —

Água de diluição: Lote: 061

Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 100 µL

Nº de réplicas por diluição: 4

Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 26 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL			
Diluição <u>ppm</u>	Vol. sol. estoque mL	Tubos nº	
		Leitura	F/Q
<u>0,0</u>	<u>—</u>	<u>1 - 9</u>	<u>10</u>
<u>3,90</u>	<u>0,39</u>	<u>71 - 74</u>	<u>75</u>
<u>7,81</u>	<u>0,78</u>	<u>76 - 79</u>	<u>80</u>
<u>15,62</u>	<u>1,56</u>	<u>81 - 84</u>	<u>85</u>
<u>31,25</u>	<u>3,12</u>	<u>86 - 89</u>	<u>90</u>
<u>62,5</u>	<u>6,25</u>	<u>91 - 94</u>	<u>95</u>
<u>125</u>	<u>12,5</u>	<u>96 - 99</u>	<u>100</u>
<u>250</u>	<u>25</u>	<u>101 - 104</u>	<u>105</u>
<u>500</u>	<u>50</u>	<u>106 - 109</u>	<u>110</u>

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (ppm)	Início <i>ca</i>			Término <i>fs</i>		
	S (%)	OD	pH	S (%)	OD	pH
0,0	32	7,50	8,00	32	6,80	8,00
3,90	32	7,84		32	6,91	8,00
7,81	32	7,43		32	6,97	8,00
15,62	32	7,29		32	7,01	8,00
31,25	32	7,42		32	6,82	8,00
62,5	32	7,41		32	6,71	8,00
125	32	7,38		32	6,54	8,00
250	32	7,34		32	6,62	8,00
500	32	7,40	7,00	32	6,46	8,00

OBS: pH medido com fita no início do ensaio fs

Responsável pela adição das soluções-teste aos tubos: Gabiele / fs

Responsável pela adição da solução de ovos aos tubos: Duciana

Responsável pelo preparo dos frascos: Gabiele / fs

Responsável pela fixação (Adição de formol nos frascos): Cristiane Tidal

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O PRODUTO VITEC 3000 –
CÓDIGO LET 3214 UTILIZANDO *Mysidopsis juniae*
(CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PEDDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
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@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Ensaio 2402 MJA

Rio de Janeiro
LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Letícia Falcão Veiga

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

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Ensaio de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo-teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de ensaio: Agudo

Tempo de exposição: 96 horas

Resposta do ensaio: Efeitos sobre a sobrevivência

Substância de referência: Zinco (sulfato de zinco heptahidratado)

Faixa de sensibilidade do organismo: 0,21 – 0,43 mg.L⁻¹ (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com zinco em 04/01/2006: 0,26 mg.L⁻¹ (0,24 – 0,28 mg.L⁻¹)

Identificação da amostra pelo solicitante: Produto Vitec 3000

Código LET 3214 - Data da coleta: 16/12/2005

Código de entrada no Labtox: L240205

Data de entrada no Labtox: 29/12/2005

Data de início do ensaio: 09/01/2006

Data de término do ensaio: 13/01/2006

RESULTADOS
CL(I)50; 96h: 751,85 ppm
Intervalo de confiança (IC): 671,15 – 842,25 ppm
Sobrevivência no controle: 100 %

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado de 09 a 13 de janeiro de 2006, teve como objetivo determinar a toxicidade aguda do produto Vitec 3000, código LET 3214, sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em Cetesb (1992), com adaptações.

Jovens de *M. juniae* com 4 a 6 dias de idade, foram expostos a diferentes diluições do fluido, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do ensaio a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

Foi preparada uma solução-estoque de 5.000 ppm, avolumando-se 10 mL do produto para 2.000 mL, com água do mar. A partir desta solução, foram preparadas as seguintes soluções-teste: 156; 312,5; 625; 1.250; 2.500 e 5.000 ppm. Estas diluições foram estabelecidas a partir de um ensaio preliminar (Fichas em anexo).

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90%.

CONTROLE DOS ENSAIOS DE *Mysidopsis juniae*

Mensalmente é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos cultivados no Labtox encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie pelo laboratório, que é de 0,21 a 0,43 mg.L⁻¹.

O resultado da CL(I)50; 96h obtido no ensaio realizado, em janeiro de 2006, com o zinco foi 0,26 mg.L⁻¹ (IC: 0,24 – 0,28 mg.L⁻¹).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio:	agudo
Temperatura de incubação:	25 ± 1,0 °C
Luminosidade:	12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste:	béquer de 400 mL
Volume de solução-teste:	300 mL
Origem dos organismos:	cultivo Labtox
Idade dos organismos:	4 a 6 dias
Nº de organismos / frasco:	10
Nº de réplicas / solução-teste:	3
Nº de soluções-teste:	6 + 1 controle *
Alimentação:	20 náuplios de <i>Artemia</i> sp. recém eclodidos / misidáceo / dia
Água de diluição:	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste:.....	33±1‰
Duração do ensaio:	96 horas
Resposta:	mortalidade
Valor medido:	CL(I)50; 96h (diluição inicial letal a 50% dos organismos em 96h)
Método de cálculo:	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

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

3 – RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas, nas diferentes soluções-teste.

A CL(I)50;96h obtida com o produto Vitec 3000 – código LET 3214, foi de 751,85 ppm (IC: 671,15 – 842,25 ppm). A sobrevivência dos organismos no controle foi de 100%.

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

L2402MJA

Tabela I - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no ensaio conduzido com o produto Vitec 3000 – cód. LET 3214.

Solução-teste (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
156	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
312,5	10	9	9	9	9	6,7
	10	10	10	10	9	
	10	10	10	10	10	
625	10	8	8	8	8	16,7
	10	9	9	9	8	
	10	9	9	9	9	
1.250	10	2	0	0	0	100
	10	1	0	0	0	
	10	4	3	0	0	
2.500	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	
5.000	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Test Type: Agudo Duration: 96 hours Concentration Unit: ppm

Raw Data:

Concentration:	156	312.5	625	1250	2500	5000
Number Exposed:	30	30	30	30	30	30
Mortalities:	0	2	5	30	30	30
SPEARMAN-KARBER TRIM:						.00%
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	LC50:					751,85
	95% Lower Confidence:					671,15
	95% Upper Confidence:					842,25

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB 1992. *Água do mar – Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae SILVA, 1979 (CRUSTACEA – MYSIDACEA)*. Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB 19 p.
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.

5 - EQUIPE TÉCNICA:

DIRETORAS:

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

Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado – CRBio-2 - 32963/02

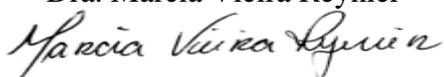
Desideria Lima Calleja – CRBio-2 - 38219/02 P

Gabriele A. Correa da Rocha – CRBio-2 - 42.496/02 P

Viviane Euzébio Luiz – CRBio-2 - 42.535/02 P

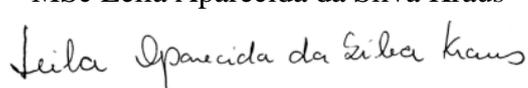
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 13 de janeiro de 2006.



SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

PLANILHA DE ENSAIOS DE
TOXICIDADE AGUDA COM
MYSIDOPSIS JUNIAE

Código da
Entrada:
2240206

PÁGINA:
1 de 2

Início do ensaio: 09 / 01 / 06 Hora: ~~14:30~~ ^{14:30} Término do ensaio: 13 / 01 / 06 Hora: 16:00

Tipo de amostra: Produto Salinidade: 33 ‰ pH 4,47

Solução-estoque: 10 (mL, g) da substância (amostra bruta) + 1990 mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 5000 (ppm, mg/L, %) Rub.: ff

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada - mL Vol. de salmoura: - mL

Vol. amostra - mL Salinidade final da amostra - ‰ Conc. final da amostra: -

Salmoura: Método: - Salinidade: - ‰ pH: -

Rub.: ff

Água de diluição: Lote: 002 Barrilete nº 1

Origem dos organismos: Cultivo Labtox Lote: 4726, H1 e H2 Idade: 4 a 6 dias

Ensaio: Com aeração () Sem aeração (x) / Estático (x) Semi-estático () renovação: - h

Vol. da solução-teste por béquer: 300 mL Nº de réplicas por solução-teste: 3

Nº de organismos por béquer: 10 Responsável pela adição dos organismos: gabriele/ff

Manutenção do ensaio: Temperatura 25±2°C Fotoperíodo: 12:12 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE		
* Avolumado para <u>1000</u> mL Rub.: <u>ff</u>		
Solução-Teste <u>ppm</u>	Vol. sol. estoque mL*	Béquer nº
<u>0,0</u>	<u>-</u>	<u>40 - 42</u>
<u>156</u>	<u>31,25</u>	<u>61 - 63</u>
<u>312,5</u>	<u>62,5</u>	<u>64 - 66</u>
<u>625</u>	<u>125</u>	<u>67 - 69</u>
<u>1250</u>	<u>250</u>	<u>70 - 72</u>
<u>2500</u>	<u>500</u>	<u>73 - 75</u>
<u>5000</u>	<u>1000</u>	<u>76 - 78</u>

Responsável pelos cálculos: ff

OBS: As diluições foram estabelecidas a partir de ensaios previ-
minar ff



SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

PLANILHA DE ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *MYSIDOPSIS JUNIAE*

Código da Entrada: L240206

PÁGINA: 2 de 2

ACOMPANHAMENTO DO ENSAIO

Béquer nº	Nº de organismos mortos				Béquer nº	Nº de organismos mortos			
	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>		Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
40	0	0	0	0	40	8	2	—	—
41	0	0	0	0	41	9	1	—	—
42	0	0	0	0	42	6	1	3	—
61	0	0	0	0	43	10	—	—	—
62	0	0	0	0	44	10	—	—	—
63	0	0	0	0	45	10	—	—	—
64	1	0	0	0	46	10	—	—	—
65	0	0	0	1	47	10	—	—	—
66	0	0	0	0	48	10	—	—	—
67	2	0	0	0					
68	1	0	0	1					
69	1	0	0	0					

Alimento: 0h 54 µl Rub.: CSV 24h 55 µl Rub.: CSV 48h 39 µl Rub.: CSV 72h 50 µl Rub.: CSV

PARÂMETROS QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Sobrevivência no controle: 100 %

Solução-teste (µm)	Total de mortos	Mortalidade (%)	Início Rub.: <u>CSV</u>			Término Rub.: <u>CSV</u>			Béquer nº
			S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	
<u>2,0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>32</u>	<u>6,19</u>	<u>8,24</u>	<u>32</u>	<u>6,76</u>	<u>7,95</u>	<u>40</u>
<u>150</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>32</u>	<u>6,21</u>	<u>7,91</u>	<u>32</u>	<u>6,96</u>	<u>7,82</u>	<u>61</u>
<u>312,5</u>	<u>2</u>	<u>6,7</u>	<u>32</u>	<u>6,24</u>	<u>4,41</u>	<u>32</u>	<u>6,94</u>	<u>7,73</u>	<u>64</u>
<u>625</u>	<u>5</u>	<u>16,7</u>	<u>32</u>	<u>6,43</u>	<u>4,34</u>	<u>32</u>	<u>6,96</u>	<u>7,47</u>	<u>67</u>
<u>1250</u>	<u>30</u>	<u>100</u>	<u>32</u>	<u>6,78</u>	<u>6,33</u>	<u>32</u>	<u>6,86</u>	<u>6,41</u>	<u>72</u>
<u>2500</u>	<u>30</u>	<u>100</u>	<u>32</u>	<u>6,84</u>	<u>5,10</u>	<u>33</u>	<u>6,57</u>	<u>4,73</u>	<u>73</u>
<u>5000</u>	<u>30</u>	<u>100</u>	<u>34</u>	<u>6,63</u>	<u>4,47</u>	<u>34</u>	<u>7,20</u>	<u>4,09</u>	<u>76</u>

Código do equipamento utilizado:

Potenciômetro EME32 Rub.: CSV Oxímetro EMEO4 Rub.: CSV Refratômetro EME22 Rub.: CSV

Incubadeira — Rub.: DL Balança — Rub.: DL Micropipeta: EME 28 Rub.: DL

Rub. = Rubrica do Operador

Conferido por: Juiziane Data: 13 / 01 / 06

L2402LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O PRODUTO VITEC 3000 - CÓDIGO LET 3214
UTILIZANDO *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

EXECUTADO POR:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Avenida 24, s/n° - Pólo Bio-Rio - Laboratório 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Ensaio 2402 LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Letícia Falcão Veiga

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

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Ensaio embriolarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração Tempo de exposição: 25 horas

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embriolarval (retardamento e/ou ocorrência
de anomalias)

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos: 1,21 – 1,81 mg.L⁻¹ (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com DSS em 18/01/2006: 1,25 mg.L⁻¹ (1,20 – 1,30 mg.L⁻¹)

Identificação da amostra pelo solicitante: Produto Vitec 3000

Código LET 3214 - Data da coleta: 16/12/2005

Código de entrada no Labtox: L240205 Data de entrada no Labtox: 29/12/2005

Data de início do ensaio: 18/01/2006 Data de término do ensaio: 19/01/2006

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

RESULTADOS
CENO 1,95 ppm CEO 3,91 ppm VC 2,76 ppm
Controle: 90,7 % de pluteus

1 - OBJETIVO

O objetivo deste ensaio, realizado em 18 de janeiro de 2006, foi determinar a toxicidade crônica do produto Vitec 3000, código LET 3214, sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação a *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), com adaptações. O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições da amostra, avaliando-se a solução-teste que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

A cada lote de organismos utilizados é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos mesmos encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

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 a homocedasticidade da proporção de larvas pluteus com desenvolvimento normal foi verificada através dos testes de “Shapiro-wilks” 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.

PREPARO DA AMOSTRA

Foi preparada uma solução-estoque de 1.000 ppm, avolumando-se 0,1 mL do produto para 100 mL, com água do mar. A partir desta solução, foram preparadas as seguintes soluções-teste: 1,95; 3,91; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 ppm (Fichas em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	crônico
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 / solução-teste.....	04
Nº de soluções-teste.....	8 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	32 a 33‰
Duração do ensaio.....	25 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embriolarval ou anomalias
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.

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 1,21 a 1,81 mg.L⁻¹.

3 – RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus normais e 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 produto Vitec 3000 - código LET 3214 foi de 1,95 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 3,91 ppm e o VC (valor crônico) de 2,76 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 90,7% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,25 mg.L⁻¹ (1,20 – 1,30 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, medidos no início e no final do ensaio, são apresentados nas fichas em anexo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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
Controle	0.093				
1.95	0.102	0.291		1.71	k= 1, v=27
3.91	0.170	2.256	*	1.79	k= 2, v=27
7.81	0.298	5.968	*	1.81	k= 3, v=27
15.62	0.408	9.170	*	1.82	k= 4, v=27
31.25	0.465	10.844	*	1.83	k= 5, v=27
62.5	0.552	13.391	*	1.84	k= 6, v=27
125	0.683	17.176	*	1.84	k= 7, v=27
250	0.915	23.944	*	1.84	k= 8, v=27

s = 0.049

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

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtidos no ensaio realizado com o produto Vitec 3000 – cód. LET 3214.

Solução-teste (ppm)	Número de pluteus		Solução-teste (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	95	05	31,25*	60	40
	93	07		49	51
	85	15		43	57
	90	10		62	38
1,95	91	09	62,5*	47	53
	88	12		46	54
	88	12		40	60
	92	08		46	54
3,91*	87	13	125*	27	73
	83	17		38	62
	84	16		32	68
	78	22		30	70
7,81*	72	28	250*	07	93
	67	33		06	94
	72	28		03	97
	70	30		18	82
15,62*	61	39			
	62	38			
	54	46			
	60	40			

* Diferença significativa em relação ao controle

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. (Echinodermata, Echinoidea)*. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, p20.
- Gulley,D.D.; Boelter,A.M.; Bergman,H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

5 - EQUIPE TÉCNICA

DIRETORAS:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRBio-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 – 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 – 38219/02 P
Gabrielle A. Correa da Rocha – CRBio-2 – 42496/02 P
Viviane Euzébio Luiz – CRBio-2 – 42535/02 P

ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 25 de janeiro de 2006.

Data Início: 18 / 01 / 06 Hora: 15:40 Término: 19 / 01 / 06

Organismo-teste: L. variegatus

Tipo de teste: () fecundação () embriológico

Tipo de amostra: Produto Cód. entrada L240205 Salinidade: 32 ‰ pH 6,39 C

Solução-estoque: 0,1 (mL, g) da substância (amostra bruta) + 99,9 mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 1000 (ppm, mg/L, %) DL

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL

Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —

Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Ajuste do pH: — µL de HCl — µL de NaOH pH final: —

Água de diluição: Lote: 062

Vol. da solução-teste por tubo: 100 mL Vol. solução de ovos: 79 µL

Nº de réplicas por diluição: 4

Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 25 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL <u>DL</u>			
Diluição	Vol. sol. estoque mL	Tubos nº	
		Leitura	F/Q
100 0,0	—	1 - 9	10
1,95	0,195	31 - 34	35
3,91	0,39	36 - 39	40
7,81	0,78	41 - 44	45
15,62	1,56	46 - 49	50
31,25	3,12	51 - 54	55
62,5	6,25	56 - 59	60
125	12,5	61 - 64	65
250	25	66 - 69	70

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (ppm)	Início			Término		
	S (%)	OD	pH	S (%)	OD	pH
0,0	32	6,60	8,36	33	6,59	8,34
1,95	32	6,66	8,31	32	6,62	8,33
3,91	32	6,91	8,30	32	6,79	8,33
7,81	32	6,73	8,32	32	6,44	8,34
15,62	32	6,83	8,29	32	6,79	8,31
31,25	32	6,70	8,27	32	6,61	8,30
62,5	32	6,69	8,19	32	6,86	8,25
125	32	6,68	7,97	32	6,86	8,16
250	32	6,79	7,66	32	6,55	8,01

OBS: As diluições foram estabelecidas a partir do ensaio preliminar de

Responsável pela adição das soluções-teste aos tubos: Divalvia
 Responsável pela adição da solução de ovos aos tubos: Divalvia
 Responsável pelo preparo dos frascos: Christiane Vidal
 Responsável pela fixação (Adição de formol nos frascos): Divalvia

L2375MJA

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O EFLUENTE PROVENIENTE DA UNIDADE
DESSULFATADORA – CÓDIGO LET 3205 UTILIZANDO *Mysidopsis juniae*
(CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
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@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Ensaio 2375 MJA

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Letícia Falcão Veiga

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

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Ensaio de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo-teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de ensaio: Agudo

Tempo de exposição: 96 horas

Resposta do ensaio: Efeitos sobre a sobrevivência

Substância de referência: Zinco (sulfato de zinco heptahidratado)

Faixa de sensibilidade do organismo: 0,21 – 0,43 mg.L⁻¹ (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com zinco em 01/12/2005: 0,39 mg.L⁻¹ (0,36 – 0,42 mg.L⁻¹)

Identificação da amostra pelo solicitante: Efluente proveniente da unidade dessulfatadora
(Plataforma FPSO-Brasil)

Código LET 3205 - Data da coleta: 07/12/2005

Código de entrada no Labtox: L237505

Data de entrada no Labtox: 08/12/2005

Data de início do ensaio: 09/12/2005

Data de término do ensaio: 13/12/2005

RESULTADOS
CL(I)50; 96h: 78,65 %
Intervalo de confiança (IC): 36,21 – 170,82 %
Sobrevivência no controle: 100 %

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado de 09 a 13 de dezembro de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade aguda do efluente proveniente da unidade dessulfatadora – código LET 3205, sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em Cetesb (1992), com adaptações.

Jovens de *M. juniae* com 4 a 7 dias de idade, foram expostos a diferentes diluições da amostra, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do ensaio a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi mantida em temperatura de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ até a realização do ensaio. Sua salinidade foi ajustada de 49 para 33‰, resultando em uma solução-estoque de 67%. A partir dela, foram preparadas as seguintes soluções-teste: 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 33 e 67%. Paralelamente, foi testada a amostra bruta (100%), com a salinidade de 49‰ (Fichas em anexo).

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90%.

CONTROLE DOS ENSAIOS DE *Mysidopsis juniae*

Mensalmente é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos cultivados no Labtox encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie pelo laboratório, que é de 0,21 a 0,43 mg.L^{-1} .

O resultado da CL(I)50; 96h obtido no ensaio realizado, em dezembro de 2005, com o zinco foi 0,39 mg.L^{-1} (IC: 0,36 – 0,42 mg.L^{-1}).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio:	agudo
Temperatura de incubação:	25 ± 1,0 °C
Luminosidade:	12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste:	béquer de 400 mL
Volume de solução-teste:	300 mL
Origem dos organismos:	cultivo Labtox
Idade dos organismos:	4 a 7 dias
Nº de organismos / frasco:	10
Nº de réplicas / solução-teste:	3
Nº de soluções-teste:	7 + 1 controle *
Alimentação:	20 náuplios de <i>Artemia</i> sp. recém eclodidos / misidáceo / dia
Água de diluição:	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste:.....	31 a 49‰
Duração do ensaio:	96 horas
Resposta:	mortalidade
Valor medido:	CL(I)50; 96h (diluição inicial letal a 50% dos organismos em 96h)
Método de cálculo:	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

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

3 – RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas, nas diferentes soluções-teste.

A CL(I)50;96h obtida com o efluente proveniente da unidade dessulfatadora – código LET 3205 foi de 78,65% (IC: 36,21 – 170,82%). A sobrevivência dos organismos no controle foi de 100%.

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

L2375MJA

Tabela I - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no ensaio conduzido com o efluente proveniente da unidade dessulfatadora – código LET 3205.

Solução-teste (%)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
2,0	10	10	10	10	10	6,7
	10	10	10	10	8	
	10	10	10	10	10	
4,0	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
8,0	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
16,0	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
33	10	9	8	8	8	13,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	9	8	8	
67	10	10	9	9	7	43
	10	10	10	10	6	
	10	10	9	9	4	
100	10	10	7	5	4	60
	10	9	7	6	4	
	10	10	9	5	4	

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Test Type: agudo Duration: 96 hours Concentration Unit: %

Raw Data:

Concentration: 2 4 8 16 33 67 100

Number Exposed: 30 30 30 30 30 30 30

Mortalities: 2 0 0 0 4 13 18

SPEARMAN-KARBER TRIM: 40.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 78,65

95% Lower Confidence: 36,21

95% Upper Confidence: 170,82

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Laboratório 4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão

Cep: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Tel/Fax:(5521) 3867-5651 / 3867-5501 R: 220 – e-mail: labtox@labtox.com.br

Visite nosso site: www.labtox.com.br

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB 1992. *Água do mar – Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae SILVA, 1979 (CRUSTACEA – MYSIDACEA)*. Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB 19 p.
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.

5 - EQUIPE TÉCNICA:

DIRETORAS:

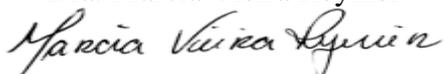
MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRBio-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado – CRBio-2 - 32963/02
Desideria Lima Calleja – CRBio-2 - 38219/02 P
Gabriele A. Correa da Rocha – CRBio-2 - 42.496/02 P
Viviane Euzébio Luiz – CRBio-2 - 42.535/02 P

ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2005.



SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

PLANILHA DE ENSAIOS DE
TOXICIDADE AGUDA COM
MYSIDOPSIS JUNIAE

Código da
Entrada:

2237505

PÁGINA:

1 de 2

Início do ensaio: 09/10/05 Hora: 9:00 Término do ensaio: 13/10/05 Hora: 10:30

Tipo de amostra: EFWENTE Salinidade: 49 ‰ pH 8,00

Solução-estoque: NA (mL, g) da substância (amostra bruta) + NA mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 100 (ppm, mg/L, ‰) Rub.: g

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada 653 mL Vol. de salmoura: NA mL

Vol. amostra 1347 mL Salinidade final da amostra 33 ‰ Conc. final da amostra: 67 ‰

Salmoura: Método: NA Salinidade: NA ‰ pH: NA

Rub.: g

Água de diluição: Lote: 059 Barrilete nº 03

Origem dos organismos: Cultivo Labtox Lote: MJ454-D Idade: 4 a 7 dias

Ensaio: Com aeração () Sem aeração (x) / Estático (α) Semi-estático () renovação: NA h

Vol. da solução-teste por béquer: 300 mL Nº de réplicas por solução-teste: 3

Nº de organismos por béquer: 10 Responsável pela adição dos organismos: gabriel/g

Manutenção do ensaio: Temperatura 25±2°C Fotoperíodo: 12:12 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE		
* Avolumado para <u>1000</u> mL Rub.: <u>g</u>		
Solução-Teste ‰	Vol. sol. estoque mL*	Béquer nº
<u>0,0</u>	<u>NA</u>	<u>1 - 3</u>
<u>2</u>	<u>31,25</u>	<u>4 - 6</u>
<u>4</u>	<u>62,5</u>	<u>7 - 9</u>
<u>8</u>	<u>125</u>	<u>10 - 12</u>
<u>16</u>	<u>250</u>	<u>13 - 15</u>
<u>33</u>	<u>500</u>	<u>16 - 18</u>
<u>67</u>	<u>1000</u>	<u>19 - 21</u>
<u>100*</u>	<u>1000</u>	<u>22 - 24</u>

Responsável pelos cálculos: g

OBS: * 100% → testada sem ajuste de salinidade.



SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

PLANILHA DE ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *MYSIDOPSIS JUNIAE*

Código da Entrada: L2375 05

PÁGINA: 2 de 2

ACOMPANHAMENTO DO ENSAIO

Béquer nº	Nº de organismos mortos				Béquer nº	Nº de organismos mortos			
	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>		Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>	Rub.: <u>CSV</u>
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
1	∅	∅	∅	∅	13	∅	∅	∅	∅
2	∅	∅	∅	∅	14	∅	∅	∅	∅
3	∅	∅	∅	∅	15	∅	∅	∅	∅
4	∅	∅	∅	∅	16	1	1	∅	∅
5	∅	∅	∅	2	17	∅	∅	∅	∅
6	∅	∅	∅	∅	18	∅	1	1	∅
7	∅	∅	∅	∅	19	∅	1	∅	2
8	∅	∅	∅	∅	20	∅	∅	∅	4
9	∅	∅	∅	∅	21	∅	1	∅	5
10	∅	∅	∅	∅	22	∅	3	2	1
11	∅	∅	∅	∅	23	1	2	1	2
12	∅	∅	∅	∅	24	∅	1	4	1

Alimento: 0h 20 µl Rub.: CSV 24h 44 µl Rub.: CSV 48h 65 µl Rub.: CSV 72h 33 µl Rub.: CSV

PARÂMETROS QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Sobrevivência no controle: 100 %

Solução-teste (%)	Total de mortos	Mortalidade (%)	Início Rub.: <u>CSV</u>			Término Rub.: <u>CSV</u>			Béquer nº
			S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	
0,0	∅	∅	31	6,82	8,00	32	6,27	8,00	1
02	2	6,7	31	6,41	8,00	32	6,66	8,00	5
04	∅	∅	31	6,42	8,00	32	6,70	8,00	7
08	∅	∅	31	6,52	8,00	32	6,78	8,00	10
16	∅	∅	32	6,17	8,00	32	7,00	8,00	13
33	4	13,3	32	6,38	8,00	32	6,91	8,00	16
67	13	43	33	6,93	8,00	34	6,84	8,00	20
100	18	60	49	6,57	9,00	49	6,02	9,00	23

Código do equipamento utilizado:

Potenciômetro * Rub.: CSV Oxímetro EME07 Rub.: JU Refratômetro EME22 Rub.: JU

Incubadeira NA Rub.: JU Balança NA Rub.: JU Micropipeta: EME 26 Rub.: h

Rub. = Rubrica do Operador

Conferido por: Diana Data: 13 / 12 / 05

* pH foi lido com fita

L2375LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O EFLUENTE PROVENIENTE DA UNIDADE
DESSULFATADORA – CÓDIGO LET 3205 UTILIZANDO *Lytechinus variegatus*
(ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

EXECUTADO POR:

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

Ensaio 2375LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Letícia Falcão Veiga

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

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Ensaio embrionarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração Tempo de exposição: 28 horas

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embrionarval (retardamento e/ou ocorrência
de anomalias)

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos: 1,21 – 1,81 mg.L⁻¹ (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com DSS em 14/12/2005: 1,71 mg.L⁻¹ (1,68 – 1,74 mg.L⁻¹)

Identificação da amostra pelo solicitante: Efluente proveniente da unidade dessulfatadora
(Plataforma FPSO-Brasil)
Código LET 3205 - Data da coleta: 07/12/2005

Código de entrada no Labtox: L237505 Data de entrada no Labtox: 08/12/2005*

Data de início do ensaio: 14/12/2005 Data de término do ensaio: 15/12/2005

*Parte da amostra foi congelada ao chegar no Labtox.

RESULTADOS	
CENO 67%	CEO 100%
VC 81,85 %	
Controle: 96,7% de pluteus	

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

1 - OBJETIVO

O objetivo deste ensaio, realizado em 14 de dezembro de 2005, foi avaliar a toxicidade crônica do efluente proveniente da unidade dessulfatadora – código LET 3205, sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação a *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), com adaptações. O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições da amostra, avaliando-se a solução-teste que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

A cada série de amostra testada é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos utilizados encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

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 a homocedasticidade da proporção de larvas pluteus com desenvolvimento normal foi verificada através dos testes de “Shapiro-wilks” 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.

PREPARO DA AMOSTRA

Uma alíquota da amostra foi congelada ao chegar no Labtox. No dia do ensaio, foi descongelada em temperatura ambiente e teve a salinidade ajustada de 49 para 33‰, resultando em uma solução-estoque de 67%. A partir dela, foram preparadas as seguintes soluções-teste: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 33 e 67%. Paralelamente, foi testada a amostra bruta (100%), com a salinidade de 49‰ (Fichas em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	crônico
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 / solução-teste.....	04
Nº de soluções-teste.....	9 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	32 a 49 ‰
Duração do ensaio.....	28 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embriolarval ou anomalias
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.

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 1,21 a 1,81 mg.L⁻¹.

3 – RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus normais e 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 efluente proveniente da unidade dessulfatadora – cód. LET 3205, foi de 67%, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 100% e o VC (valor crônico) de 81,85%.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 96,7% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,71 mg.L⁻¹ (1,68 – 1,74 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, medidos no início e no final do ensaio, são apresentados nas fichas em anexo.

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtidos no ensaio realizado com o efluente proveniente da unidade dessulfatadora – cód. LET 3205.

Solução-teste (%)	Número de pluteus		Solução-teste (%)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	97	03	8,0	98	02
	98	02		97	03
	97	03		96	04
	95	05		94	06
0,5	96	04	16	98	02
	94	06		96	04
	98	02		95	05
	98	02		95	05
1,0	93	07	33	96	04
	96	04		97	03
	98	02		94	06
	97	03		97	03
2,0	97	03	67	95	05
	97	03		98	02
	95	05		97	03
	93	07		96	04
4,0	95	05	100*	02	98
	98	02		03	97
	97	03		05	95
	96	04		01	99

* Diferença significativa em relação ao controle

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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
Controle	0.033				
0.5	0.035	0.215		1.70	k= 1, v=30
1.0	0.039	0.553		1.78	k= 2, v=30
2.0	0.039	0.553		1.80	k= 3, v=30
4.0	0.039	0.553		1.81	k= 4, v=30
8.0	0.039	0.553		1.82	k= 5, v=30
16	0.039	0.553		1.83	k= 6, v=30
33	0.039	0.553		1.83	k= 7, v=30
67	0.039	0.553		1.83	k= 8, v=30
100	0.973	80.902	*	1.83	k= 9, v=30

s = 0.016

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

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. (Echinodermata, Echinoidea)*. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, p20.

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

5 - EQUIPE TÉCNICA

DIRETORAS:

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

Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 – 32963/02

Desideria Lima Calleja - CRBio-2 – 38219/02 P

Gabrielle A. Correa da Rocha – CRBio-2 – 42496/02 P

Viviane Euzébio Luiz – CRBio-2 – 42535/02 P

ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2005.

Data Início: 14 / 12 / 05 Hora: 16:00 Término: 15 / 12 / 05

Organismo-teste: L. navigatus

Tipo de teste: () fecundação () embriológico

Tipo de amostra: EFLUENTE Cód. entrada: 237505 Salinidade: 48⁴⁹‰ pH 8,00 (ajuste de pH) esv

Solução-estoque: NA (mL, g) da substância (amostra bruta) + NA mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 100 (ppm, mg/L, %)

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada 782 mL Vol. de salmoura: NA mL

Vol. amostra 172¹⁶⁸ mL Salinidade final da amostra 33‰ Conc. final da amostra: 670‰

Salmoura: Método: NA Salinidade: NA‰ pH: NA

Ajuste do pH: NA µL de HCl NA µL de NaOH pH final: NA

Água de diluição: Lote: 059

Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 100 µL

Nº de réplicas por diluição: 4

Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 28 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL			
Diluição	Vol. sol. estoque mL	Tubos nº	
		Leitura	F / Q
0,0	-	1-9	10
0,5	0,78	351 - 354	355
1	1,56	356 - 359	360
2	3,12	361 - 364	365
4	6,25	366 - 369	370
8	12,5	371 - 374	375
16	25	376 - 379	380
33	50	381 - 384	385
67	100	386 - 389	390
100	100	391 - 394	395

amostra sem ajuste →

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (%)	Início			Término		
	S (‰)	OD	pH	S (‰)	OD	pH
0,0	32	7,08	8,00	32	6,94	8,00
0,5	32	6,59	8,00	32	7,54	8,00
1	32	6,71		32	7,84	
2	32	6,76		32	7,95	
4	32	7,04		32	8,03	
8	32	7,00		32	8,14	
16	32	7,25		32	7,67	
33	33	7,45		33	7,89	
67	33	7,66	8,00	34	7,91	8,00
⊗ 100	49	6,57	8,00	49	7,73	8,00

lido de fita. cv (pointing to pH columns)
lido de fita. cv (pointing to OD columns)

⊗ amostra sem ajuste

OBS: _____

Responsável pela adição das soluções-teste aos tubos: Gabriele / J

Responsável pela adição da solução de ovos aos tubos: Isidoro

Responsável pelo preparo dos frascos: Isidoro

Responsável pela fixação (Adição de formol nos frascos): Gabriele