

TÍTULO DO ESTUDO:

**TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO
COM OURIÇO DO MAR PARA O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE
SÓLIDOS 3.4.35.1.**

LABORATÓRIO CONTRATADO: TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

PATROCINADOR: PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A.

PROTOCOLO Nº: 4673/2003.

RELATÓRIO Nº: RL4673-03LYC.

INÍCIO DO ESTUDO: 11/11/2003.

TÉRMINO DO ESTUDO: 12/11/2003.

EMISSÃO DO RELATÓRIO: 16/12/2003.

DIRETOR DE ESTUDO: Regina Sawaia Sáfydi (PhD).

PESQUISADOR PRINCIPAL: Alice Fumie Aita, Bióloga.

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO	3
RESUMO	4
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS	5
1. Substância-teste	5
2. Sistema-teste	5
3. Água de diluição	5
4. Preparo da amostra e soluções	6
5. Condições de teste e procedimentos	6
6. Análises estatísticas	7
7. Substância de referência	8
RESULTADOS	8
CONCLUSÃO	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
TABELA	10

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com o FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1, requerido pela empresa **PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A**, foi conduzido de acordo com o protocolo descrito nesse relatório e sob a orientação e supervisão do Diretor de Estudo. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM - TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à R. Fábria, 59 - S. Paulo - SP.



REGINA SAWAJA SÁFADI (PhD)
Diretor de Estudo

16 / 12 / 03



PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A
Patrocinador

22 / 11 / 2004

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 (4673/2003) para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), verificando a ocorrência de retardamento no desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas pluteus. Foi preparada uma mistura 1:9 do fluido com água marinha e a fase de sólidos suspensos (FSS) foi utilizada para preparar as seguintes concentrações da amostra: 200 ppm; 1000 ppm; 3900 ppm; 15600 ppm; 62500 ppm; 250000 ppm e 1000000 ppm. Três réplicas com cerca de 300 ovos recém-fecundados cada foram expostas por 24 horas a um controle com água marinha e a cada concentração de FSS. Após o período de exposição, foi observado que as concentrações superiores a 3900 ppm FSS exerceram efeitos tóxicos significativos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 1000 ppm FSS, a concentração de efeito observado (CEO) em 3900 ppm FSS e o valor crônico (VC) em 1975 ppm FSS. Adicionalmente, a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) foi estimada em 34320 ppm FSS, com intervalo de 95% de confiança de 31899 a 36053 ppm FSS.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the chronic toxicity of the product FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 (4673/2003) to embryo-larval development of sea urchin (*Lytechinus variegatus*). A 1:9 fluid to seawater mixture was prepared and the suspended particulate phase (SPP) solution was diluted to the following concentrations: 200 ppm; 1000 ppm; 3900 ppm; 15600 ppm; 62500 ppm; 250000 ppm and 1000000 ppm. Three groups of 300 eggs newly fertilized were exposed during 24 hours to control (synthetic seawater) and each SPP concentration. After the exposure period, concentrations higher than 3900 ppm SPP showed chronic toxicity to sea urchin, when compared to the control. Therefore, under the test conditions, the no observed effect concentration (NOEC) was estimated in 1000 ppm SPP, the lowest observed effect concentration (LOEC) was 3900 ppm SPP, and the chronic value (CV) was 1975 ppm SPP. Furthermore, the median inhibition concentration (24-h IC50) was estimated in 34320 ppm SPP, with 95% confidence limits of 31899 to 36053 ppm SPP.

INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), com base no grau de desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas. Após o período de 24 a 28 horas, os ovos recém-fecundados devem se desenvolver até o estágio de larva pluteus, a menos que o produto exerça efeitos tóxicos durante este período de exposição.

A metodologia adotada segue a Norma Técnica CETESB L5.250 (CETESB, 1999).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Substância-teste

A amostra de FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 (Código Tecam 4673/2003) foi fabricada em 21/10/03 e recebida no laboratório em 22/10/03, acondicionada em frasco plástico, sob refrigeração.

2. Sistema-teste

A espécie utilizada foi *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea). Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas de isopor, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas plásticas contendo água marinha e aeração intensa.

3. Água de diluição

Para diluição das soluções-teste foi utilizada água marinha sintética, preparada com água deionizada a partir de sal comercial marca CORAL REEF RED SEA SALT®, com salinidade entre 32 e 35 ‰. O preparo ocorreu no mínimo 24 horas antes de utilização no teste de toxicidade e a água foi mantida sob aeração intensa e filtrada antes de ser utilizada.

4. Preparo da amostra e soluções

Os procedimentos utilizados para o preparo das diluições de teste seguiram a metodologia padronizada pela EPA para testes com fluido de perfuração, do qual se prepara uma diluição 1:9 com água marinha e se expõem os organismos a diluições da fase de sólidos suspensos (FSS) da mistura (USEPA, 1993).

O produto foi homogeneizado com agitador industrial por 30 minutos e o pH foi ajustado para $\pm 0,2$ unidades do pH da água de diluição (água marinha sintética). Uma alíquota de 25 mL foi retirada, diluída com 225 mL de água marinha (diluição 1:9) e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos, com pH ajustado para $7,8 \pm 0,1$. Esta mistura foi mantida em repouso para decantação por 1 hora, na mesma temperatura de teste. A fase de sólidos suspensos (FSS) obtida foi cuidadosamente retirada e as seguintes soluções-teste foram preparadas:

- A. 1000000 ppm: 10 mL da FSS em cada frasco-teste.
- B. 250000 ppm: 25 mL da FSS + água de diluição até 100 mL.
- C. 62500 ppm: 6,25 mL da FSS + água de diluição até 100 mL.
- D. 15600 ppm: 1,56 mL da FSS + água de diluição até 100 mL.
- E. 3900 ppm: 6,25 mL da solução-teste C + água de diluição até 100 mL.
- F. 1000 ppm: 1,56 mL da solução-teste C + água de diluição até 100 mL.
- G. 200 ppm: 0,32 mL da solução-teste C + água de diluição até 100 mL.

5. Condições de teste e procedimentos

Os gametas foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5M na região perioral dos animais adultos, conforme metodologia descrita em Cetesb (1999). A fecundação foi feita "in vitro" e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação.

As soluções-teste foram transferidas para tubos de ensaio, em alíquotas de 10 mL, sendo preparadas três réplicas para cada concentração e seis para o controle com água de diluição. Uma réplica extra de algumas concentrações, com 20 mL de solução, foi preparada para realização das análises físico-químicas no final do teste. Com um

micro-pipetador, um volume equivalente a 300 ovos foi transferido para cada tubo de ensaio.

O teste teve início em 11/11/03 e término em 12/11/03. A incubação foi feita sob temperatura média da água de $26,0 \pm 0,0$ °C, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Após 24 horas de incubação, um dos tubos do controle foi retirado e o estágio de desenvolvimento de 100 embriões foi avaliado. O teste foi encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido.

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5 mL de formol tamponado. Uma sub-amostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgwick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus normais e anormais em cada réplica e concentração.

No início e no final do teste foram realizadas análises de pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água de diluição (controle) e de quatro concentrações do produto (menor, maior e duas intermediárias).

6. Análises estatísticas

O grau de desenvolvimento embrio-larval observado no controle e nas soluções-teste foi analisado para obtenção das seguintes estimativas:

- Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO), respectivamente a maior concentração do produto que não causa efeitos significativos no crescimento dos organismos e a menor concentração que causa efeitos significativos, estimados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk (USEPA, 1994), do teste de Bartlett para homogeneidade de variância (USEPA, 1994) e do teste de Williams (Gelber et alii, 1985; Williams, 1971, 1972). A partir da média geométrica entre CENO e CEO foi obtido o valor crônico (VC).
- Concentração de inibição mediana (CI50; 24h - concentração que causa inibição no desenvolvimento de 50% dos organismos após 24 horas de exposição) e intervalo de

95% de confiança, estimados através do método de interpolação linear (USEPA, 1994).

7. Substância de referência

Simultaneamente ao teste com o produto, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração de inibição (CI50; 24h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,068 mg Zn/L (I.C.: 0,065 a 0,071 mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam, utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CI50; 24h média de 0,079 mg Zn/L, com limites de controle (média \pm 2.desvio padrão) de 0,039 a 0,118 mg Zn/L.

RESULTADOS

O resultado do teste com o FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 está apresentado na Tabela 1, com dados de efeito tóxico e análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (CETESB, 1999).

Após o período de exposição, o desenvolvimento embrionário foi retardado ou inexistente nas concentrações superiores a 62500 ppm da fase de sólidos suspensos (FSS) do fluido. Na maior concentração preparada, o teor inicial de oxigênio dissolvido foi baixo (1,5 mg/L), porém o teor final foi adequado e superior ao limite recomendado de 3,9 mg/L (CETESB, 1999).

A aplicação das análises estatísticas indicou que as concentrações superiores a 3900 ppm FSS exerceram efeitos tóxicos crônicos, sendo o desenvolvimento embrionário retardado ou inexistente, sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Assim, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 1000 ppm FSS, a concentração de efeito observado (CEO) em 3900 ppm FSS e o valor crônico (VC) em 1975 ppm FSS.

A aplicação de outra metodologia de análise estatística indicou que a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) do fluido pode ser estimada em 34320 ppm FSS, com intervalo de 95% de confiança de 31899 a 36053 ppm FSS.

RL4673-03LYC

CONCLUSÃO

A toxicidade crônica da fase de sólidos suspensos (FSS) do FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 para o desenvolvimento embrio-larval de *Lytechinus variegatus*, nas condições de teste, foi estimada em:

CENO = 1000 ppm FSS

CEO = 3900 ppm FSS

VC = 1975 ppm FSS

CI50; 24h = 34320 ppm FSS (31899 - 36053 ppm FSS)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Método de ensaio. **Norma Técnica L5.250**. São Paulo, CETESB, 22p., 1999.
- Gelber, R.D.; Lavin, P.T.; Mehta, C.R.; Schoenfeld, D.A. Statistical analysis. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, Hemisphere Publ. Co., p. 110-23, 1985.
- USEPA **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. 2. ed., EPA-600/4-91/003. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 483 p., 1994.
- USEPA 40 CFR Part 435 – Oil and gas extraction point source category, Subpart A – Offshore Subcategory, Appendix 2 – Drilling fluids toxicity test. **Federal Register**, 58 FR 12504, 1993.
- Williams, D.A. A test for differences between treatment means when several doses levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v. 27, p. 103-17, 1971.
- Williams, D.A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. **Biometrics**, v. 28, p.519-31, 1972.

Tabela 1 – Efeito tóxico e análises físicas e químicas (média ± desvio padrão) efetuadas no início e no final do teste no teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar para o FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1, após o período de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH	Salinidade (‰)	Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)
Controle	6	8,5 ± 0,1	32 ± 0,0	5,8 ± 0,1
200 ppm FSS	9	8,5 ± 0,0	34 ± 1	5,7 ± 0,1
1000 ppm FSS	12	N.A.	N.A.	N.A.
3900 ppm FSS	22	8,5 ± 0,1	35 ± 1	5,7 ± 0,0
15600 ppm FSS	21	N.A.	N.A.	N.A.
62500 ppm FSS	100	8,3 ± 0,1	41 ± 2	5,5 ± 0,1
250000 ppm FSS	100	N.A.	N.A.	N.A.
1000000 ppm FSS	100	7,7 ± 0,1	> 100	2,8 ± 1,8

FSS: Fase de sólidos suspensos.

N.A.: Não analisado.