

L1442LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS  
(CÓD. 3.4.30 – SOLUÇÃO DE NH<sub>4</sub>Cl) UTILIZANDO O OURIÇO-DO-MAR  
*Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**

SOLICITANTE:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS  
Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163  
Imboassica - Macaé - RJ  
CEP: 27925-290

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](mailto:labtox@labtox.com.br)  
CEP: 21941-590

Teste 1442 LVC

Rio de Janeiro

b

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Hélio Gama

Endereço: Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163 - Imboassica - Macaé - RJ

Tel.: (22) 2761-2644/2761-9086

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: Fluido Aquoso Isento de Sólidos

Código: 3.4.30 – Solução de NH<sub>4</sub>Cl

Data: 17/06/2004

Código de entrada no Labtox: L144204

Data de entrada no Labtox: 21/06/2004

RESULTADOS	
CENO 977 ppm	CEO 1.953 ppm
VC = 1.381 ppm	
Controle: 93,5% de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 0,95 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 0,92 – 0,99 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC: Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 08 de julho de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Aquoso Isento de Sólidos (código 3.4.30 – Solução de NH<sub>4</sub>Cl) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

## 2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999), com adaptações. Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições do fluido, 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 a homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de “Shapiro-Wilks” e “Bartlett”, respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste 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.....	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 / diluição.....	04
Nº de diluições.....	12 + 1 controle*
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

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C, até a hora da realização do teste e sua preparação foi realizada com base nas metodologias propostas por API (1984); Duke *et al.* (1984) e Veiga (1998). Assim, a amostra foi homogeneizada em misturador industrial por 30 minutos a uma velocidade de 1.500 rpm e preparou-se um extrato aquoso na proporção de 1:9, utilizando-se 100 mL da amostra homogeneizada e 900 mL de água do mar. O extrato foi homogeneizado em misturador industrial por 5 minutos a 150 rpm e decantado por 1 hora. Após este período, a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e a partir dela (solução-estoque de 1.000.000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 488; 977; 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (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;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 0,83 a 3,20 mg.L<sup>-1</sup>.

### 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 Aquoso Isento de Sólidos (código 3.4.30 – Solução de NH<sub>4</sub>Cl) foi de 977 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 1.953 ppm e o VC (valor crônico) de 1.381 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 93,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 0,95 mg.L<sup>-1</sup> (IC = 0,92 – 0,99 mg.L<sup>-1</sup>).

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

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Transform: NO TRANSFORM

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
Controle	0.065				
488	0.091	1.555		1.78	k= 1, v=12
977	0.091	1.555		1.87	k= 2, v=12
1953	0.468	23.842	*	1.90	k= 3, v=12

s = 0.024

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

L1442LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido aquoso isento de sólidos (cód. 3.4.30 – Solução de NH<sub>4</sub>Cl) no teste conduzido em 08/07/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	96	04	31.250*	0	100
	97	03		0	100
	91	09		0	100
	90	10		0	100
488	90	10	62.500*	0	100
	89	11		0	100
	91	09		0	100
	93	07		0	100
977	93	07	125.000*	0	100
	91	09		0	100
	90	10		0	100
	90	10		0	100
1.953*	55	45	250.000*	0	100
	53	47		0	100
	55	45		0	100
	50	50		0	100
3.906*	0	100	500.000*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
7.813*	0	100	1.000.000*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
15.625*	0	100			
	0	100			
	0	100			
	0	100			

\* Significativamente diferente do controle.

b

#### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- API - American Petroleum Institute 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).
- 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.
- Duke, T.W.; Parrish, P.R.; Montgomery, R.M. Macauley, S.D.; Macauley, J.M.; Cripe, G.M. 1984. Acute toxicity of eight laboratory-prepared generic drilling fluids to mysids (*Mysidopsis bahia*). Gulf Breeze: Environmental Protection Agency. 4p.
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Release 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.
- Veiga, L. F. 1998. Estudo da toxicidade marinha de fluidos de perfuração de poços de óleo e gás. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 107p.

#### 5 - EQUIPE TÉCNICA

##### DIRETORAS:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02  
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02  
Dra. 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


ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 19 de julho de 2004.

Data Início: 03 / 07 / 04 Hora: 11:00 Término: 09 / 07 / 04  
 Organismo-teste: L. variegatus Operador(es): Jivane / Cristiane  
 Tipo de teste: ( ) fecundação (  ) embriológico  
 Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L144204 Salinidade: 36 ‰ pH 7,36  
 Solução-estoque: 600 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 5400 mL de água de diluição  
 Concentração final da solução-estoque: 1000.000 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 43 mL µL de NaOH pH final: 7,90  
 Água de diluição: Lote: 020 Salinidade: 34 ‰ pH: 8,13 OD: 554 mg.L<sup>-1</sup>  
 Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 90 µL  
 N° de réplicas por diluição: 5  
 Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 24 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL			
Diluição	Vol. sol. estoque mL	Tubos n°	
		Leitura	F / Q
<u>0,0</u>	<u>—</u>	<u>1-9</u>	<u>10</u>
<u>498</u>	<u>0,498</u>	<u>36-39</u>	<u>40</u>
<u>977</u>	<u>0,977</u>	<u>41-44</u>	<u>45</u>
<u>1.953</u>	<u>0,195</u>	<u>46-49</u>	<u>50</u>
<u>3.906</u>	<u>0,391</u>	<u>51-54</u>	<u>55</u>
<u>7.813</u>	<u>0,782</u>	<u>56-59</u>	<u>60</u>
<u>15.625</u>	<u>1,56</u>	<u>61-64</u>	<u>65</u>
<u>31.250</u>	<u>3,13</u>	<u>66-69</u>	<u>70</u>
<u>62.500</u>	<u>6,25</u>	<u>71-74</u>	<u>75</u>
<u>125.000</u>	<u>12,5</u>	<u>76-79</u>	<u>80</u>
<u>250.000</u>	<u>25</u>	<u>81-84</u>	<u>85</u>
<u>500.000</u>	<u>50</u>	<u>86-89</u>	<u>90</u>
<u>1000.000</u>	<u>100</u>	<u>91-94</u>	<u>95</u>