

L1376LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS
(CÓD. 3.4.29.2 - SOLUÇÃO DE CaCl_2) 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
CEP: 21941-590

Teste 1376 LVC

Rio de Janeiro

L1376LVC

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 sólido

Código: 3.4.29.2 – Solução de CaCl₂

Data: 17/05/2004

Código de entrada no Labtox: L137604

Data de entrada no Labtox: 18/05/2004

RESULTADOS	
CENO 12.974 ppm	CEO 25.948 ppm
VC = 18.348 ppm	
Controle: 89,5 % de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 1,81 mg.L ⁻¹ (IC = 1,78 – 1,83 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 27 de maio de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido aquoso isento de sólidos (Cód. 3.4.29.2 – Solução de CaCl₂) 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 coleta dos no campo
Nº de organismos / frasco.....	300 ovos
Nº de réplicas / diluição.....	04
Nº de diluições.....	12 + 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

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 teve a salinidade ajustada de 82‰ para 35‰, resultando em uma solução-estoque de 415.167 ppm. A partir desta solução foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 203; 406; 811; 1.622; 3.243; 6.487; 12.974; 25.948; 51.896; 103.792; 207.583 e 415.167 ppm (Fichas em anexo).

L1376LVC

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⁻¹.

3 – RESULTADOS

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

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido com o Fluido aquoso isento de sólidos (cód. 3.4.29.2 – solução de CaCl₂) foi de 12.974 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 25.948 ppm e o VC (valor crônico) de 18.348 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,81 mg.L⁻¹ (IC = 1,78 – 1,83 mg.L⁻¹). 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 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	0.100				
203	0.100	0.423		1.71	k= 1, v=27
406	0.100	0.423		1.79	k= 2, v=27
811	0.100	0.423		1.81	k= 3, v=27
1622	0.100	0.423		1.82	k= 4, v=27
3243	0.100	0.423		1.83	k= 5, v=27
6487	0.100	0.423		1.84	k= 6, v=27
12974	0.110	0.423		1.84	k= 7, v=27
25948	0.545	37.187	*	1.84	k= 8, v=27

s = 0.017

L1376LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido aquoso isento de sólidos (Cód. 3.4.29.2 – solução de CaCl₂) no teste conduzido em 27/05/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	93	07	12.974	89	11
	88	12		88	12
	87	13		88	12
	90	10		91	09
203	92	08	25.948*	48	52
	90	10		46	54
	89	11		45	55
	89	11		43	57
406	89	11	51.896*	0	100
	89	11		0	100
	86	14		0	100
	90	10		0	100
811	91	09	103.792*	0	100
	89	11		0	100
	88	12		0	100
	90	10		0	100
1.622	88	12	207.583*	0	100
	91	09		0	100
	90	10		0	100
	89	11		0	100
3.243	90	10	415.167*	0	100
	89	11		0	100
	87	13		0	100
	89	11		0	100
6.487	93	17			
	96	14			
	96	14			
	97	13			

* Significativamente diferente do controle.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

API - American Petroleum Institute 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).

L1376LVC

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:

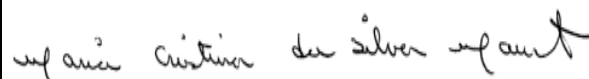
Carina C. Gomes Machado - CRB-2 - 32963/02

Desideria Lima Calleja - CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE: Viviane Euzébio Luiz

ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina Maurat



REVISADO POR

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 18 de junho de 2004.