

L1374LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS  
(CÓD. 3.4.29.4 – SOLUÇÃO DE  $\text{CaCl}_2$ ) 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](mailto:labtox@labtox.com.br)  
CEP: 21941-590

Teste 1374 LVC

Rio de Janeiro

L1374LVC

## 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: 3.4.29.4 – Solução de CaCl<sub>2</sub>

Data: 17/05/2004

Código de entrada no Labtox: L137404

Data de entrada no Labtox: 18/05/2004

RESULTADOS	
<b>CENO</b> 11.219 ppm	<b>CEO</b> 22.438 ppm
<b>VC</b> = 15.866 ppm	
Controle: 83 % de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 0,98 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 0,88 – 1,09 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC: Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 21 de maio de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido aquoso isento de sólidos (Cód. 3.4.29.4 - Solução de CaCl<sub>2</sub>) 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.

### PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C, até a 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 600 mL da amostra homogeneizada e 5.400 mL de água do

L1374LVC

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 95 para 34‰, resultando em uma solução-estoque de 359.000 ppm. A partir desta solução foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 175; 351; 701; 1.402; 2.805; 5.609; 11.219; 22.438; 44.875; 89.750; 179.500 e 359.000 ppm (Fichas em anexo).

### 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.

### 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 (Cód. 3.4.29.4 - Solução de  $\text{CaCl}_2$ ) foi de 11.219 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 22.438 ppm e o VC (valor crônico) de 15.866 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 83% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de  $0,98 \text{ mg.L}^{-1}$  (IC = 0,88 – 1,09  $\text{mg.L}^{-1}$ ). 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	0.149				
175	0.149	1.193		1.71	k= 1, v=27
351	0.149	1.193		1.79	k= 2, v=27
701	0.161	0.501		1.81	k= 3, v=27
1402	0.161	0.501		1.82	k= 4, v=27
2805	0.168	0.143		1.83	k= 5, v=27
5609	0.171	0.072		1.84	k= 6, v=27
11219	0.171	0.072		1.84	k= 7, v=27
22438	0.372	11.595	*	1.84	k= 8, v=27

s = 0.025 Note: df used for table values are approximate when  $v > 20$ .

### 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.

L1374LVC

- 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.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido aquoso isento de sólidos (Código: 3.4.29.4 – Solução de CaCl<sub>2</sub>) no teste conduzido em 21/05/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	80	20	11.219	80	20
	84	16		83	17
	83	17		87	13
	85	15		82	18
175	89	11	22.438*	62	38
	87	13		63	37
	87	13		67	33
	85	15		59	41
351	88	12	44.875*	0	100
	85	15		0	100
	85	15		0	100
	83	17		0	100
701	89	11	89.750*	0	100
	80	20		0	100
	83	17		0	100
	82	18		0	100
1.402	86	14	179.500*	0	100
	83	17		0	100
	84	16		0	100
	84	16		0	100
2.805	82	18	359.000*	0	100
	85	15		0	100
	85	15		0	100
	81	19		0	100
5.609	81	19			
	82	18			
	85	15			
	83	17			

\* Significativamente diferente do controle.

## 5 - EQUIPE TÉCNICA

### DIRETORAS:

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

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

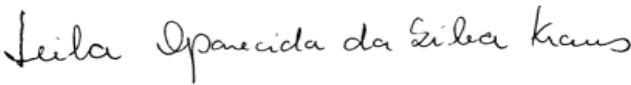

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

### 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:	REVISADO POR
MSc. Leila A. da Silva Kraus	Dra. Marcia Vieira Reynier
	

Rio de Janeiro, 18 de junho de 2004.