

L1438LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS
(CÓD. 3.4.27.5 – SOLUÇÃO DE NaCl) 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 1438 LVC

Rio de Janeiro

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: 3.4.27.5 – Solução de NaCl

Data: 16/06/2004

Código de entrada no Labtox: L143804

Data de entrada no Labtox: 21/06/2004

RESULTADOS	
CENO 810 ppm	CEO 1.620 ppm
VC = 1.145,51 ppm	
Controle: 89,7% de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 2,13 mg.L ⁻¹ (IC = 2,04 – 2,21 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

5

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 28 de junho de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Aquoso Isento de Sólidos (código 3.4.27.5 – Solução de NaCl) 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.

b

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*
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 41‰ para 33‰, resultando em uma solução-estoque de 829.333 ppm. A partir desta solução foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 405; 810; 1.620; 3.240; 6.479; 12.958; 25.917; 51.833; 103.667; 207.333; 414.667 e 829.333 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⁻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 (código 3.4.27.5 – Solução de NaCl) foi de 810 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 1.620 ppm e o VC (valor crônico) de 1.145,51 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89,7% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 2,13 mg.L⁻¹ (IC = 2,04 – 2,21 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
Controle	0.103				
405	0.120	0.443		1.75	k= 1, v=15
810	0.148	1.139		1.84	k= 2, v=15
1620	0.240	3.481	*	1.87	k= 3, v=15
3240	0.648	13.799	*	1.88	k= 4, v=15

s = 0.056

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

L1438LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido aquoso isento de sólidos (cód. 3.4.27.5 – Solução de NaCl) no teste conduzido em 28/06/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	87	13	25.917*	0	100
	92	08		0	100
	90	10		0	100
	90	10		0	100
405	90	10	51.833*	0	100
	89	11		0	100
	88	12		0	100
	85	15		0	100
810	87	13	103.667*	0	100
	85	15		0	100
	88	12		0	100
	81	19		0	100
1.620*	89	11	207.333*	0	100
	78	22		0	100
	62	38		0	100
	75	25		0	100
3.240*	31	69	414.667*	0	100
	36	64		0	100
	40	60		0	100
	34	66		0	100
6.479*	0	100	829.333*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
12.958*	0	100			
	0	100			
	0	100			
	0	100			

* Significativamente diferente do controle.

6

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

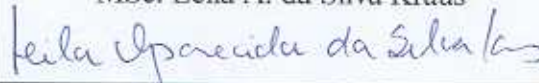
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 19 de julho de 2004.

Data Início: 28 / 06 / 04 Hora: 13:10 Término: 29 / 06 / 04
 Organismo-teste: L. variegatus Operador(es): Juriane
 Tipo de teste: () fecundação () embriológico
 Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L143804 Salinidade: 41 ‰ pH 8,17
 Solução-estoque: 600 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 5400 mL de água de diluição
 Concentração final da solução-estoque: 3.000.000 ppm (mg/L, %) (ppm)

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada 1024 mL Vol. de salmoura: — mL
 Vol. amostra 4976 mL Salinidade final da amostra 33 ‰ Conc. final da amostra: 829.333
 Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Ajuste do pH: — µL de HCl — µL de NaOH pH final: —
 Água de diluição: Lote: 020 Salinidade: 35 ‰ pH: 8,22 OD: 5,44 mg.L⁻¹
 Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 75 µL
 Nº de réplicas por diluição: 5

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

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			Vol. <u>100</u> mL	
Diluição <u>ppm</u>	Vol. sol. estoque mL	Vol. água de diluição mL	Tubos nº	
			Leitura	F / Q
<u>00</u>	<u>—</u>	<u>—</u>	<u>1-9</u>	<u>10</u>
<u>405</u>	<u>0,049</u>	<u>99,95</u>	<u>36-39</u>	<u>40</u>
<u>810</u>	<u>0,098</u>	<u>99,90</u>	<u>41-44</u>	<u>45</u>
<u>1.620</u>	<u>0,195</u>	<u>99,80</u>	<u>46-49</u>	<u>50</u>
<u>3.240</u>	<u>0,39</u>	<u>99,6</u>	<u>51-54</u>	<u>55</u>
<u>6.479</u>	<u>0,78</u>	<u>99,2</u>	<u>56-59</u>	<u>60</u>
<u>12.958</u>	<u>1,56</u>	<u>98,44</u>	<u>61-64</u>	<u>65</u>
<u>25.917</u>	<u>3,13</u>	<u>96,87</u>	<u>66-69</u>	<u>70</u>
<u>51.833</u>	<u>6,25</u>	<u>93,75</u>	<u>71-74</u>	<u>75</u>
<u>103.667</u>	<u>12,5</u>	<u>87,5</u>	<u>76-79</u>	<u>80</u>
<u>207.333</u>	<u>25</u>	<u>75</u>	<u>81-84</u>	<u>85</u>
<u>414.667</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>86-89</u>	<u>90</u>
<u>829.333</u>	<u>100</u>	<u>—</u>	<u>91-94</u>	<u>95</u>