

L1775LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO SOLUÇÃO SALINA
(CÓD. 3.4.36.6) 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 1775 LVC

Rio de Janeiro

L1775LVC

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 embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de teste: crônico de curta duração

Resposta do teste: Efeitos no desenvolvimento embriolarval (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Aquoso Solução Salina (Código 3.4.36.6)

Data de preparo: 21/01/2005

Código de entrada no Labtox: L177505

Data de entrada no Labtox: 25/01/2005

Data de início do teste: 15/02/2005

Data de término do teste: 16/02/2005

RESULTADOS	
CENO 31.708 ppm	CEO 63.417 ppm
VC 44.842 ppm	
Controle: 91,75% de pluteus	
DSS: CE(I)50: 1,67 mg.L ⁻¹ (IC: 1,62 – 1,72 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 15 de fevereiro de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Aquoso Solução Salina (Cód. 3.4.36.6) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação à *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999). O 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 larvas pluteus com desenvolvimento normal 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.

L1775LVC

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do teste com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox, que é de 0,74 a 1,86 mg.L⁻¹.

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 600 mL da amostra homogeneizada e 5.400 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 o pH ajustado de 10,45 para 8,50 com 2.500 µL de HCl e a salinidade ajustada de 65 para 33‰, resultando em uma solução-estoque de 507.333 ppm. A partir desta solução-estoque foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 248; 495; 991; 1.982; 3.964; 7.927; 15.854; 31.708; 63.417; 126.833; 253.666 e 507.333 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 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 das soluções-teste.....	32 ± 1 ‰
Duração do teste.....	24 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embrionarval ou anomalias
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.

3 – RESULTADOS

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

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido no teste realizado com o Fluido Aquoso Solução Salina (Cód. 3.4.36.6) foi de 31.708 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 63.417 ppm e o VC (valor crônico) de 44.842 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 91,75% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,67mg.L⁻¹(IC:1,62–1,72 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, 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	0.093				
248	0.098	0.286		1.70	k= 1, v=30
495	0.098	0.334		1.78	k= 2, v=30
991	0.098	0.334		1.80	k= 3, v=30
1982	0.098	0.334		1.81	k= 4, v=30
3964	0.101	0.465		1.82	k= 5, v=30
7964	0.101	0.465		1.83	k= 6, v=30
15854	0.101	0.465		1.83	k= 7, v=30
31708	0.101	0.465		1.83	k= 8, v=30
63417	0.150	3.292	*	1.83	k= 9, v=30

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

L1775LVC

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido Aquoso Solução Salina (Cód. 3.4.36.6).

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	89	11	15.854	87	13
	96	04		90	10
	89	11		91	09
	93	07		89	11
248	91	09	31.708	89	11
	90	10		90	10
	91	09		94	06
	89	11		95	05
495	89	11	63.417*	87	13
	90	10		87	13
	92	08		89	11
	88	12		77	23
991	91	09	126.833*	0	100
	92	08		0	100
	90	10		0	100
	89	11		0	100
1.982	87	13	253.666*	0	100
	90	10		0	100
	91	09		0	100
	93	07		0	100
3.964	90	10	507.333*	0	100
	91	09		0	100
	88	12		0	100
	87	13		0	100
7.964	88	12			
	89	11			
	90	10			
	91	09			

* Diferença significativa em relação ao controle.

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 Realease 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

COORDENADORA DE PESQUISA E TECNOLOGIA: Viviane Euzébio Luiz

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRB-2 – 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRB-2 – 38219/02 P

ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat



REVISADO POR:

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2005.