

**Relatório Final**  
RL1021-04LYC  
07 de Abril de 2004

**Título do Estudo**  
Teste de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus*  
para o produto **BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753**

**Patrocinador**  
PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.  
Av. Hum Quadra 7 s/nº Cidade Universitária  
Ilha do Fundão – Rio de Janeiro - RJ  
Cep: 21.949-900.

**Laboratório executor**  
TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábria, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

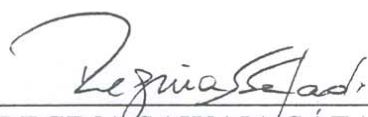
## ÍNDICE

<b>DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO</b> .....	3
<b>RESUMO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	5
1. Substância-teste .....	5
2. Sistema-teste .....	5
3. Água de diluição .....	5
4. Preparo da amostra e soluções.....	6
5. Condições de teste e procedimentos .....	6
6. Análises estatísticas.....	7
7. Substância de referência.....	8
<b>RESULTADOS</b> .....	8
<b>CONCLUSÃO</b> .....	9
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	9
<b>TABELA</b> .....	10

RL1021-04LYC

**DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com o produto **BULAB 6094 - Cód. LET: 2753**, requerido pela empresa **PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.**, foi conduzido de acordo com os princípios das “Boas Práticas de Laboratório (BPL)” conforme descrito nesse relatório e sob a orientação e supervisão do Diretor de Estudo. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM - TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à R. Fábria, 59 - S. Paulo – S.P.



---

REGINA SAWAIA SÁFADI (PhD)

**Diretor de Estudo**

07 / 04 / 04

---

PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.

**Patrocinador**

   /   /

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753 (1021/2004) para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), verificando a ocorrência de retardamento no desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas pluteus. Foi preparada as seguintes soluções de teste: 0,0064 mg/L; 0,0320 mg/L; 0,1600 mg/L; 0,8000 mg/L; 4,00 mg/L; 20,00 mg/L e 100,0 mg/L. Três réplicas com cerca de 300 ovos recém-fecundados cada foram expostas por 24 horas a um controle com água marinha e a cada concentração. Após o período de exposição, foi observado que todas as concentrações exerceram efeitos tóxicos significativos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) não pode ser estimada, sendo considerada inferior a 0,0064 mg/L. Adicionalmente, a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) foi estimada em 0,2642 mg/L, com intervalo de 95% de confiança de 0,2191 a 0,3160 mg/L.

## ABSTRACT

This study was carried out to determine the chronic toxicity of the product BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753 (1021/2004) to embryo-larval development of sea urchin (*Lytechinus variegatus*). Test solutions were prepared to the following concentrations: 0.0064 mg/L; 0.0320 mg/L; 0.1600 mg/L; 0.8000 mg/L; 4.00 mg/L; 20.00 mg/L and 100.0 mg/L. Three groups of 300 eggs newly fertilized were exposed during 24 hours to control (synthetic seawater) at each concentration. After the exposure period, all concentrations showed chronic toxicity to sea urchin, when compared to the control. Therefore, under the test conditions, the no observed effect concentration (NOEC) was considered lower than 0.0064 mg/L. Furthermore, the median inhibition concentration (24-h IC50) was estimated in 0.2642 mg/L, with 95% confidence limits of 0.2191 to 0.3160 mg/L.

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753 para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), com base no grau de desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas. Após o período de 24 a 28 horas, os ovos recém-fecundados devem se desenvolver até o estágio de larva pluteus, a menos que o produto exerça efeitos tóxicos durante este período de exposição.

A metodologia adotada segue a Norma Técnica CETESB L5.250 (CETESB, 1999).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Substância-teste

A amostra de BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753 (Protocolo 1021/2004) foi recebida no laboratório em 11/02/04, acondicionada em frasco plástico.

### 2. Sistema-teste

A espécie utilizada foi *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea). Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas de isopor, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas plásticas contendo água marinha e aeração intensa.

### 3. Água de diluição

Para diluição das soluções-teste foi utilizada água marinha sintética, preparada com água deionizada a partir de sal comercial marca CORAL REEF RED SEA SALT®, com salinidade entre 32 e 35 ‰. O preparo ocorreu no mínimo 24 horas antes de utilização no teste de toxicidade e a água foi mantida sob aeração intensa e filtrada antes de ser utilizada.

#### 4. Preparo da amostra e soluções

A substância-teste foi dissolvida com água marinha sintética. Foram preparadas as seguintes soluções-estoque para o teste:

1. 100,0 mg/L: 0,0250 g do produto + água de diluição até 250 mL.
2. 10,00 mg/L : 10 mL da solução-estoque 1 + água de diluição até 100 mL.
3. 1,00 mg/L: 1 mL da solução-estoque 1 + água de diluição até 100 mL.

A partir dessas soluções, foram preparadas as seguintes soluções-teste:

- A. 100,0 mg/L: 10 mL da solução estoque 1 em cada frasco-teste.
- B. 20,00 mg/L: 20 mL da solução estoque 1 + água de diluição até 100 mL.
- C. 4,00 mg/L: 4 mL da solução estoque 1 + água de diluição até 100 mL.
- D. 0,8000 mg/L: 8 mL da solução estoque 2 + água de diluição até 100 mL.
- E. 0,1600 mg/L: 1,6 mL da solução-teste 2 + água de diluição até 100 mL.
- F. 0,0320 mg/L: 3,2 mL da solução-teste 3 + água de diluição até 100 mL.
- G. 0,0064 mg/L: 0,64 mL da solução-teste 3 + água de diluição até 100 mL.

#### 5. Condições de teste e procedimentos

Os gametas foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5 M na região perioral dos animais adultos, conforme metodologia descrita em Cetesb (1999). A fecundação foi feita "in vitro" e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação.

As soluções-teste foram transferidas para tubos de ensaio, em alíquotas de 10 mL, sendo preparadas três réplicas para cada concentração e seis para o controle com água de diluição. Uma réplica extra de algumas concentrações, com 20 mL de solução, foi preparada para realização das análises físico-químicas no final do teste. Com um micro-pipetador, um volume equivalente a 300 ovos foi transferido para cada tubo de ensaio.

O teste teve início em 02/03/04 e término em 03/03/04. A incubação foi feita sob temperatura média da água de  $25,0 \pm 0,5$  °C, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Após 27 horas de incubação, um dos tubos do controle

foi retirado e o estágio de desenvolvimento de 50 embriões foi avaliado. O teste foi encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido.

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5 mL de formol tamponado. Uma sub-amostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgwick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus normais e anormais em cada réplica e concentração.

No início e no final do teste foram realizadas análises de pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água de diluição (controle) e de quatro concentrações do produto (menor, maior e duas intermediárias).

## 6. Análises estatísticas

O grau de desenvolvimento embrio-larval observado no controle e nas soluções-teste foi analisado para obtenção das seguintes estimativas:

- Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO), respectivamente a maior concentração do produto que não causa efeitos significativos no crescimento dos organismos e a menor concentração que causa efeitos significativos, estimados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk (USEPA, 1994), do teste de Bartlett para homogeneidade de variância (USEPA, 1994) e do teste de Williams (Gelber et alii, 1985; Williams, 1971, 1972). A partir da média geométrica entre CENO e CEO foi obtido o valor crônico (VC).
- Concentração de inibição mediana (CI50; 24h - concentração que causa inibição no desenvolvimento de 50% dos organismos após 24 horas de exposição) e intervalo de 95% de confiança, estimados através do método de interpolação linear (USEPA, 1994).

## 7. Substância de referência

Simultaneamente ao teste com o produto, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração de inibição (CI50; 24h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,093 mg Zn/L (I.C.: 0,082 a 0,105 mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam, utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CI50; 24h média de 0,093 mg Zn/L, com limites de controle (média  $\pm$  2.desvio padrão) de 0,049 a 0,137 mg Zn/L.

## RESULTADOS

O resultado do teste com o produto BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753 está apresentado na Tabela 1, com dados de efeito tóxico e análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (CETESB, 1999).

A aplicação das análises estatísticas indicou que todas as concentrações exerceram efeitos tóxicos crônicos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) não pode ser estimada, sendo considerada inferior à menor concentração preparada (0,0064 mg/L). A concentração de efeito observado (CEO) e o valor crônico (VC) também não puderam ser estimados.

A aplicação de outra metodologia de análise estatística indicou que a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) do fluido pode ser estimada em 0,2642 mg/L, com intervalo de 95% de confiança de 0,2191 a 0,3160 mg/L.



## CONCLUSÃO

A toxicidade crônica da fase de sólidos suspensos do produto BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753 para o desenvolvimento embrio-larval de *Lytechinus variegatus*, nas condições de teste, foi estimada em:

**CENO < 0,0064 mg/L**

**CI50; 24h = 0,2642 mg/L (0,2191 - 0,3160 mg/L)**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Método de ensaio. **Norma Técnica L5.250**. São Paulo, CETESB, 22p., 1999.
- Gelber, R.D.; Lavin, P.T.; Mehta, C.R.; Schoenfeld, D.A. Statistical analysis. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, Hemisphere Publ. Co., p. 110-23, 1985.
- USEPA **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. 2. ed., EPA-600/4-91/003. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 483 p., 1994.
- USEPA 40 CFR Part 435 – Oil and gas extraction point source category, Subpart A – Offshore Subcategory, Appendix 2 – Drilling fluids toxicity test. **Federal Register**, 58 FR 12504, 1993.
- Williams, D.A. A test for differences between treatment means when several doses levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v. 27, p. 103-17, 1971.
- Williams, D.A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. **Biometrics**, v. 28, p.519-31, 1972.

Tabela 1 – Efeito tóxico e análises físicas e químicas (média ± desvio padrão) efetuadas no início e no final do teste no teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar para o produto BULAB 6094 - CÓD. LET: 2753, após o período de exposição.

Concentração.	Efeito (%)	pH	Salinidade (‰)	Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)
Controle	16	8,5 ± 0,2	35 ± 0	5,0 ± 0,3
0,0064 mg/L	30	8,5 ± 0,1	35 ± 0	5,0 ± 0,4
0,0320 mg/L	43	N.A.	N.A.	N.A.
0,1600 mg/L	50	8,5 ± 0,1	35 ± 0	5,0 ± 0,2
0,8000 mg/L	82	N.A.	N.A.	N.A.
4,00 mg/L	100	8,5 ± 0,1	35 ± 0	4,9 ± 0,5
20,00 mg/L	100	N.A.	N.A.	N.A.
100,0 mg/L	100	8,5 ± 0,1	35 ± 0	4,9 ± 0,2

N.A.: Não analisado.