



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

TESTE DE TOXICIDADE COM A AMOSTRA DE CÓDIGO LET 2344
(MÉTODOS TARZWELL) COM O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus variegatus*
(Echinodermata-Echinoidea)

SOLICITANTE:

SEAMB/CENPES/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

EXECUTADO POR:

Laboratório de Ecotoxicologia
Departamento de Zoologia - Instituto de Biologia
Universidade Federal do Rio de Janeiro/Fundação Universitária José Bonifácio

Teste nº 466

Projeto: FUJB nº 4096-7 (avulsos)

Tel: (21) 562 6364/6365

Rio de Janeiro



LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: SEAMB/CENPES/PETROBRAS

Técnico requisitante: Ana Paula Falcão

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello, Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7

Telefone: (21) 3865-6100

Avaliações solicitadas: Teste EMBRIOI.ARVAI.

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipos de teste: Crônico de curta duração.

Resposta do teste: Efeito no desenvolvimento dos embriões (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Responsável pelo preparo da amostra: CENPES / Seamb

Identificação da amostra pelo solicitante: Código LET 2344 - Método Tarzwell
Data 14/12/2001

Composição da amostra:	Bulab 6094	300 ppm
	Bulab 9602	200 ppm
	Fluoresceína	40 ppm

Código de entrada no Laboratório de Ecotoxicologia: 121201 UFRJ

RESULTADO DEFINITIVO	
CENO 0,001%	CEO 0,005%
VC = 0,002 %	
Controle: 82% de pluteus	
DSS: CE50 = 1,56 mg/L (IC= 1,51 - 1,61 mg/L)	

Handwritten signature



1 - OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade crônica de curta duração da amostra de código LET 2344 (Método Tarzwell) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*, em um teste realizado em 08 de janeiro de 2002.

2 - METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1992). Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes concentrações do produto, avaliando-se a concentração 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). 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.



A normalidade e homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de “Chi-square” e “Bartlett”, respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de “Dunnetts”.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	estático sem renovação
Temperatura de incubação.....	25 ± 1,0° 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.....	8 + 1 controle*
Alimentação.....	sem alimentação
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Salinidade da água.....	34 ± 1 ‰
Duração do teste.....	28 horas
Resposta.....	embriões mal formados ou com o desenvolvimento retardado
Expressão do resultado.....	CENO E CEO
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

O preparo da amostra (solução estoque) foi realizado pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Cenpes/Seamb. A partir da solução-estoque (100%) foram retiradas alíquotas para as soluções-teste, sendo testadas as seguintes concentrações: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0% (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;
- Os parâmetros de qualidade da água estiverem dentro dos limites estabelecidos para a espécie;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo laboratório de Ecotoxicologia da UFRJ (1,1 - 2,68 mg/L).

3 - RESULTADOS

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, estiveram dentro dos limites aceitáveis para a espécie (fichas em anexo).

A amostra de código Let 2344 (Método Tarzwell) apresentou valor de CENO (concentração de efeito não observado) de 0,001%, valor de CEO (concentração de efeito observado) de 0,005% e VC (valor crônico) de 0,002% menor concentração testada.

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

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 82% e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,56 mg/L (1,51 – 1,61 mg/L).



Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *I. variegatus* expostos às diferentes concentrações da amostra de código LET 2344 (Método Tarzwell) no teste conduzido em 08/01/2002.

Réplicas	Conc. (ppm)	saudáveis	afetados	% afetados	Média afetados	Total	Total afetados
2	Controle	80	20	0,2000	0,1800	400	72
3		85	15	0,1500			
6		81	19	0,1900			
9		82	18	0,1800			
11	0,001	75	25	0,2500	0,2500	400	100
12		75	25	0,2500			
13		74	26	0,2600			
14		76	24	0,2400			
16	0,005	67	33	0,3300	0,3675	400	147*
17		66	34	0,3400			
18		63	37	0,3700			
19		57	43	0,4300			
21	0,01	61	39	0,3900	0,3800	400	152*
22		69	31	0,3100			
23		65	35	0,3500			
24		53	47	0,4700			
26	0,05	66	34	0,3400	0,3500	400	140*
27		60	40	0,4000			
28		71	29	0,2900			
29		63	37	0,3700			
31	0,1	59	41	0,4100	0,4625	400	185*
32		49	51	0,5100			
33		56	44	0,4400			
34		51	49	0,4900			
36	0,5	0	100	1,0000	1,0000	400	400*
37		0	100	1,0000			
38		0	100	1,0000			
39		0	100	1,0000			
41	1	0	100	1,0000	1,0000	400	400*
42		0	100	1,0000			
43		0	100	1,0000			
44		0	100	1,0000			
46	3,0	0	100	1,0000	1,0000	400	400*
47		0	100	1,0000			
48		0	100	1,0000			
49		0	100	1,0000			

* significativamente diferente do controle



4 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no controle, com o padrão e nas análises físicas e químicas estiveram dentro dos limites estabelecidos, garantindo a aceitabilidade do teste.

Nas condições de teste, a amostra de código Let 2344 - Método Tarzwell, apresentou valor de CENO de 0,001%, valor de CEO de 0,005% e VC de 0,002%.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1992. Água do mar. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, p20.
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Release 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, vol. 11, nº 7.
- Nipper, M. G.; Prósperi, V. A.; Zamboni, A. J. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, v.50, p.646-652.



6 - EQUIPE TÉCNICA

BIÓLOGAS:

Dra Ana Cristina Teixeira Bonecker CRB-2 – 07.237/02 – D

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

MSc Marcia Vieira Reynier CRB-2 - 07135/02

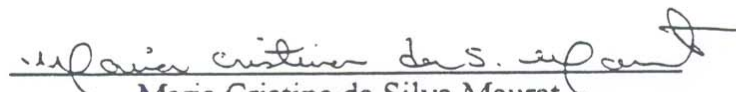
MSc Maria Cristina da Silva Maurat CRB-2 - 12671/02

TÉCNICOS:

Priscila Reis da Silva

Viviane Euzébio Luiz

Rio de Janeiro, 13 de janeiro de 2002.



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

A n e x o s

2344 L. VARIEGATUS

le: T466

Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	0.203	0.041	21.150
Within (Error)	18	0.035	0.002	
Total	23	0.238		

Critical F value = 2.77 (0.05,5,18)
 Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

2344 L. VARIEGATUS

le: T466

Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2

Ho:Control>Treatment

DUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	0.0	0.180	0.180		
2	0.001	0.250	0.250	2.260	
3	0.005	0.368	0.368	6.052	*
4	0.01	0.380	0.380	6.456	*
5	0.05	0.350	0.350	5.488	*
5	0.1	0.463	0.463	9.119	*

Dunnett table value = 2.41 (1 Tailed Value, P=0.05, df=18,5)

2344 L. VARIEGATUS

le: T466

Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2

Ho:Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	0.0	4			
2	0.001	4	0.075	41.5	-0.070
3	0.005	4	0.075	41.5	-0.188
4	0.01	4	0.075	41.5	-0.200
5	0.05	4	0.075	41.5	-0.170
6	0.1	4	0.075	41.5	-0.282



TESTE N° 466 Data: 8 / 01 / 2002 Organismo-teste: L. variegatus

Tipo de teste: () fecundação () embriológico

Amostra: Céclins lit 2344 - Bulab 6094 ^{Fluoresceína (40ppm)} ^(300ppm) Bulab 9602 (200ppm) Cód. de entrada no laboratório: 12/201

Data de entrada: 14 / 12 / 2001 Data do preparo da amostra: / /

DADOS DO SOBRENADANTE

Salinidade: 34 ‰ pH: 7,83 OD: mg/L

AJUSTE DA SALINIDADE () SIM () NÃO

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
<u> </u> mL	<u> </u> mL	<u> </u> mL	<u> </u> ‰	<u> </u> µg/L

SALMOURA

Método de obtenção: Salinidade: ‰ pH:

AJUSTE DO pH () SIM () NÃO

Volume da amostra: <u> </u> mL	Adição: <u> </u> µL de HCl	pH final: <u> </u>
	<u> </u> µL de NaOH	pH final: <u> </u>

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Água nos Reis Data: 29 / 11 / 01

Data de filtração: 08 / 01 / 02 Aeração: Data 08 / 01 / 02

Salinidade: 34 ‰ pH: 8,64 OD: 5,65 mg/L

OBS:



TESTE N° 466

Amostra: lit 2344 - Bulab 6094 (300 ppm), Fluoresceína (40 ppm), Bulab 96 (200 ppm)
 Solução-estoque: 30% Vol. final a ser preparado: 100 mL

Concentração (%)	Vol. amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/D
Control	—	100	1 - 9	10
0,001	0,033	99,96	11 - 14	15
0,005	0,166	99,83	16 - 19	20
0,01	0,33	99,67	21 - 24	25
0,05	1,67	98,33	26 - 29	30
0,1	3,33	96,67	31 - 34	35
0,5	16,67	83,33	36 - 39	40
1,0	33,3	66,7	41 - 44	45
30	6,0	94	46 - 49	50

estoque → volume total = 200 mL

OBS:

PARA A SOLUÇÃO ESTOQUE (30%) FOI PREPARADO UM VOLUME TOTAL DE 200 mL PARA AS DEMPIS CONCENTRAÇÃO O VOLUME TOTAL PREPARADO FOI DE 100 mL

