



**TESTE DE TOXICIDADE COM FLUORENE R2 (CÓDIGO LET 2364)  
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:

LABTOX – Tecnologia Ambiental  
Av. 24, s/nº - Cidade Universitária – Ilha do Fundão  
Pólo BIO-RIO – Incubadeira 3 - 4  
CEP: 21941-590

Teste nº 527

Tel: (21) 3867-5501 ramal 220

Rio de Janeiro



## LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: SEAMB/CENPES/PETROBRAS

Técnico requisitante: Eduardo Platte

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

Telefone: (21) 3865-6100

Avaliações solicitadas: Teste EMBRIOLARVAL

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)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluorene R2 - código LET 2364  
Data 29/01/2002

Código de entrada no LABTOX: 060102

<b>RESULTADO DEFINITIVO</b>	
<b>CENO</b> 200 ppm	<b>CEO</b> 300 ppm
<b>VC = 244,9 ppm</b>	
Controle: 89 % de pluteus	
DSS: CE50 = 1,32 mg/L (IC= 1,25-1,41 mg/L)	



## 1 - OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade crônica de curta duração do produto Fluorene R2 (código LET 2364), sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*, em um teste realizado em 31/01/2002.

## 2 - METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1992). Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes concentrações do poluente, 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.....	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.....	28 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 foi preparada pela equipe do Laboratório de Ecotoxicologia do CENPES/ SEAMB e enviada para o LABTOX, sendo mantida a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  até a realização do teste. Esta amostra teve o pH ajustado de 8,99 para 8,33 com 10 $\mu\text{L}$  de HCl. A partir desta foram retiradas alíquotas para as soluções-teste, sendo testadas as seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 500,0; 700,0 e 1.000 ppm.

#### 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 LABTOX (1,02 - 2,82 mg/L).

### 3 - RESULTADOS

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

O produto Fluorene R2 (código LET 2364), apresentou valor de CENO de 200 ppm, valor de CEO de 300 ppm e VC de 244,9 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89% e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,32 mg/L (IC=1,25-1,41 mg/L).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, nas diferentes diluições, encontram se listados nas fichas em anexo.



Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos às diferentes diluições do Fluorene R2 (código LET 2364), no teste conduzido em 31/01/2002.

Réplicas	Conc. (ppm)	saudáveis	afetados	% afetados	Média afetados	Total	Total afetados
2	Controle	88	12	12,0	11,0	400	44
8		90	10	10,0			
6		92	8	8,0			
5		86	14	14,0			
111	50	69	31	31,0	22,5	400	90
112		84	16	16,0			
113		79	21	21,0			
114		78	22	22,0			
115	100	80	20	20,0	22,5	400	90
116		78	22	22,0			
117		82	18	18,0			
118		70	30	30,0			
120	200	79	21	21,0	22,0	400	88
121		76	24	24,0			
122		84	16	16,0			
123		73	27	27,0			
124	300	47	53	53,0	69,8	400	279 *
125		16	84	84,0			
126		36	64	64,0			
127		22	78	78,0			
128	500	8	92	92,0	87,8	400	351 *
129		17	83	83,0			
130		7	93	93,0			
131		17	83	83,0			
133	700	0	100	100,0	100,0	400	400 *
134		0	100	100,0			
135		0	100	100,0			
136		0	100	100,0			
137	1.000	0	100	100,0	100,0	400	400 *
138		0	100	100,0			
139		0	100	100,0			
140		0	100	100,0			

\* significativamente diferente do controle

ll



#### 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, Fluorene R2 (código LET 2364), apresentou valor de CENO de 200 ppm, valor de CEO de 300 ppm e VC de 244,9 ppm.

#### 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 Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.



## 6 - EQUIPE TÉCNICA

### BIÓLOGAS:

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, 19 de fevereiro de 2002.

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





# A n e x o s

*ref*

t 2364 tarzwell L.variegatus  
 File: t527 Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	2.103	0.350	70.000
Within (Error)	21	0.105	0.005	
Total	27	2.207		

Critical F value = 2.57 (0.05,6,21)  
 Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

t 2364 tarzwell L.variegatus  
 File: t527 Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	0.0	0.110	0.110		
2	10	0.200	0.200	1.800	
3	50	0.225	0.225	2.300	
4	100	0.225	0.225	2.300	
5	200	0.220	0.220	2.200	
6	300	0.698	0.698	11.750	*
7	500	0.878	0.878	15.350	*

Dunnett table value = 2.46 (1 Tailed Value, P=0.05, df=20,6)

t 2364 tarzwell L.variegatus  
 File: t527 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	10	4	0.123	111.8	-0.090
3	50	4	0.123	111.8	-0.115
4	100	4	0.123	111.8	-0.115
5	200	4	0.123	111.8	-0.110
6	300	4	0.123	111.8	-0.588
7	500	4	0.123	111.8	-0.768



TESTE N° 527 Data: 31/01/02 Organismo-teste: L. variegatus  
Tipo de teste: ( ) fecundação (x) embriológico

FLORÉNE RR  
 Amostra: COULET-2364 - 5L de 1000 ppm Cód. de entrada no laboratório: 060102  
Tax. 3.000  
 Data de entrada: 29/01/02 Data do preparo da amostra: 29/01/02

**DADOS DO SOBRENADANTE**

Salinidade: 34 ‰ pH: 8,99 OD: 5,99 mg/L

**AJUSTE DA SALINIDADE ( ) SIM (x) NÃO**

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
— mL	— mL	— mL	— ‰	— ppm

**SALMOURA**

Método de obtenção: \_\_\_\_\_ Salinidade: \_\_\_\_\_ ‰ pH: \_\_\_\_\_

**AJUSTE DO pH (x) SIM ( ) NÃO**

Volume da amostra:	Adição:			
<u>± 400</u> mL	<u>10</u> µL de HCl	pH final: <u>8,33</u>		
	— µL de NaOH	pH final: <u>—</u>		

**DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO**

Local de coleta: Água do Rio Data: 29/11/01  
 Data de filtração: 29/01/02 Aeração: Data 31/01/02  
 Salinidade: 34 ‰ pH: 8,50 OD: 5,97 mg/L

OBS: \_\_\_\_\_

TESTE N° 527

FLUORENE R2				
Amostra: <u>CODLET 2364 - sít de 1000 ppm - Taizwell</u>				
Solução-estoque: <u>1000</u> ppm Vol. final a ser preparado: <u>100</u> mL				
Concentração (ppm)	Vol. amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
0,0	—	100	1-9	10
0,1	0,01	99,99	88-91	92
0,5	0,05	99,95	93-96	150
1,0	0,1	99,9	97-100	101
5,0	0,5	99,5	102-105	151
10	1,0	99	106-109	110
50	5,0	95	111-114	152
100	10	90	115-118	119
200	20	80	120-123	153
300	30	70	124-127	154
500	50	50	128-131	132
700	70	30	133-136	155
1000	100	—	137-140	141

OBS:



TESTE N° 527

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Temperatura: Sala:      °C Incubadora: 25 °C

Concentração (ppm)	Início			Término		
	OD mg/L	pH	S ‰	OD mg/L	pH	S ‰
0,0	5,97	8,50	34	5,08	8,43	34
01	5,97	8,66	34	4,80	8,50	34
05	5,96	8,67	34	4,82	8,54	34
10	5,93	8,66	34	4,93	8,58	34
50	5,93	8,68	34	5,15	8,55	34
100	5,96	8,61	34	4,47	8,45	34
500	5,96	8,61	34	4,59	8,44	34
1000	5,97	8,66	34	4,46	8,42	34
2000	5,92	8,67	34	4,34	8,34	34
3000	5,92	8,65	34	4,63	8,33	33
5000	5,95	8,67	34	4,71	8,31	33
7000	5,94	8,65	34	3,74	8,34	33
10000	5,99	8,33	34	3,75	8,37	33