



**TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM A AMOSTRA FLUORESCEÍNA
20% (CORANTE) 30 PPM UTILIZANDO O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus*
variegatus (Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

Petróleo Brasileiro S.A. – PETROBRAS
Ativo de Barracuda / Caratinga
Rua General Canabarro, 500 / 10º andar, Maracanã
Telefone: (21) 3876-1546

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@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste nº 891

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Giselle Cederian de Andrade

Endereço: Rua General Canabarro, 500 / 10º andar, Maracanã

Telefone: (21) 3876-1546

Avaliação solicitada: Teste embriolarval

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: Solução de Fluoresceína 20% (corante) 30 ppm

Data: 23/01/2002

Código de entrada no Labtox: 130103 Labtox

RESULTADO DEFINITIVO	
TESTE EMBRIOLÓGICO	
CENO 0,75 ppm	CEO 3,75 ppm
VC = 1,68 ppm	
Controle: 85,5% de pluteus	
DSS: CE50 = 2,27 mg.L ⁻¹ (IC = 2,16 – 2,38 mg.L ⁻¹)	

IC = Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 30/01/2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica da solução de Fluoresceína 20% (corante) 30 ppm sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 - METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999). Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes concentrações da substância, avaliando-se a concentração que causa retardamento no desenvolvimento embriol larval 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 "Williams".

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	estático sem renovação
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.....	4 + 1 controle*
Alimentação.....	sem alimentação
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 de Fluoresceína 20% (corante) 30 ppm foi enviada ao Labtox pela Petrobras. Em função da baixa salinidade da amostra (0‰), esta foi ajustada para 36‰ com 400mL de salmoura, resultando em uma concentração final de 15 ppm (solução-estoque). A partir dessa solução foram retiradas alíquotas para as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 0,75; 3,75; 7,5 e 15 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;
- 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 (1,1 - 2,68 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

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

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) foi de 0,75 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 3,75 ppm e o VC (valor crônico) de 1,68 ppm.

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 85,5 % e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 2,27 mg.L⁻¹ (IC= 2,16 – 2,38 mg.L⁻¹).



Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes concentrações da solução de Fluoresceína 20% (corante) 30 ppm no teste conduzido em 30/01/2003.

Concentração (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados
Controle	83	17
	87	13
	80	20
	92	08
0,75	84	16
	82	18
	93	07
	89	11
3,75*	05	95
	21	79
	13	87
	25	75
7,5*	0	100
	09	91
	12	88
	24	76
15,0*	72	28
	50	50
	60	40
	46	54

* Estatisticamente 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 Solução de Fluoresceína 20% (corante) 30 ppm apresentou valor de CENO de 0,75 ppm, valor de CEO de 3,75 ppm e VC de 1,68 ppm.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, J.W. et al. 1974. Characteristics of dispersal and water soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to marine crustaceans and fish. *Marine Biol.*, 27: 75-78.

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

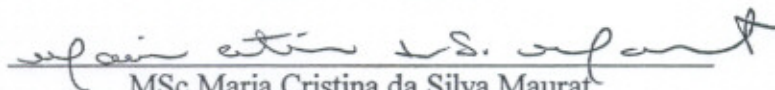
Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

6 - EQUIPE TÉCNICA

Rio de Janeiro, 05 de fevereiro de 2003.

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
Diretora Administrativa e Financeira
CRB-2 - 12156/02


MSc Marcia Vieira Reynier
Diretora Científica
CRB-2 - 07135/02


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

BIÓLOGA:

Priscila Reis da Silva
CRB-2 - 29935/02

Carina C. Gomes Machado
CRB-2 - 32963/02

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

ANEXOS

per

solucao contrastante

File: C:\ESTAT\T1\TOXSTAT\T891.

Transform: NO TRANSFORMATION

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model)

TABLE 1 OF 2

GROUP	IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1	0.0	4	0.145	0.145	0.138
2	0.75	4	0.130	0.130	0.138
3	3.75	4	0.840	0.840	0.719
4	7.5	4	0.888	0.888	0.719
5	15	4	0.430	0.430	0.719

solucao contrastante

File: C:\ESTAT\T1\TOXSTAT\T891.

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	0.138				
0.75	0.138	0.124		1.75	k= 1, v=15
3.75	0.719	9.530	*	1.84	k= 2, v=15
7.5	0.719	9.530	*	1.87	k= 3, v=15
15	0.719	9.530	*	1.88	k= 4, v=15

s = 0.085

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

ml

TESTE N° 891 Data: 30 / 01 / 03 Organismo-teste: L. variegatus

Tipo de teste: () fecundação (☒) embriológico

Amostra: solução contrastante (30ppm) Fluoresceína 20% (corante)

Cód. de entrada no laboratório: 130103

Data de entrada: 23 / 01 / 03 Data do preparo da amostra: 23 / 01 / 03

DADOS DO SOBRENADANTE

Salinidade: 0 ‰ pH: 8,34 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>400</u> mL	<u>400</u> mL	<u>36</u> ‰	<u>15</u> ^{µm} ppm

SALMOURA

Método de obtenção: congelamento Salinidade: 70 ‰ pH: 8,14

AJUSTE DO pH () SIM (☒) NÃO

Volume da amostra:	Adição:	
<u>—</u> mL	<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: Reserva dos Brasileiros Data: 23 / 01 / 03

Data de filtração: 29 / 01 / 03 Aeração: Data 30 / 01 / 03

Salinidade: 35 ‰ pH: 8,01 OD: 5,21 mg/L

TESTE N° 891

Amostra: salvata conservata (30 ppm) Fluorelina

Solução-estoque: 15 ppm Vol. final a ser preparado: 100 mL

[illegible]

OBS:

TESTE N° 891

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Temperatura: Sala: 25 °C Incubadora: 25 °C

[illegible]