

TÍTULO DO ESTUDO:

**TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM *MYSIDOPSIS JUNIAE*
PARA O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1.**

LABORATÓRIO CONTRATADO: TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

PATROCINADOR: PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A.

PROTOCOLO Nº: 4673/2003.

RELATÓRIO Nº: RL4673-03MYA.

INÍCIO DO ESTUDO: 27/10/2003.

TÉRMINO DO ESTUDO: 24/11/2003.

EMISSÃO DO RELATÓRIO: 11/12/2003.

DIRETOR DE ESTUDO: Regina Sawaia Sáfyadi (PhD).

PESQUISADOR PRINCIPAL: Alice Fumie Aita (Bióloga).

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO	3
RESUMO	4
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS	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	7
RESULTADOS	7
CONCLUSÃO	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
TABELA	9

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com o produto **FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1**, requerido pela empresa **PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A**, foi conduzido de acordo com o protocolo 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 - SP.

Regina Sáfadi

REGINA SAWAIA SÁFADI (PhD)
Diretor de Estudo

11 / 12 / 03

Helio Sales Game

PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A
Patrocinador

22 / 11 / 2004

RL4673-03MYA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda do produto FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 (4673/2003) para *Mysidopsis juniae*. Foi preparada uma mistura 1:9 do fluido com água marinha e a fase de sólidos suspensos (FSS) foi utilizada para preparar as seguintes concentrações do produto: 8000 ppm; 27000 ppm; 90000 ppm; 300000 ppm e 1000000 ppm. Três réplicas de dez animais cada foram expostas a um controle com água marinha e a cada concentração de FSS por 96 horas. Após o período de exposição, foi observado um aumento da mortalidade dos animais expostos com o aumento da concentração. Com os dados de mortalidade, a concentração letal mediana após 96 horas de exposição (CL50; 96h) foi estimada através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton et alii, 1977). A CL50; 96h da FSS, nas condições de teste, foi estimada em 48795 ppm.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the acute toxicity to *Mysidopsis juniae* of the product FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 (4673/2003). A 1:9 fluid to seawater mixture was prepared and the suspended particulate phase (SPP) solution was diluted to the following concentrations: 8000 ppm; 27000 ppm; 90000 ppm; 300000 ppm and 1000000 ppm. Three replicates with ten animals were exposed to control (synthetic seawater) and each SPP concentration for 96 hours. After the period of exposure, the median lethal concentration (96-h LC50) was estimated using the trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton et alii, 1977). Under the test conditions, the 96-h LC50 of the SPP was estimated in 48795 ppm.

INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda do produto FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 para jovens *Mysidopsis juniae*, com base na mortalidade dos animais expostos a diversas concentrações do produto, após um período de exposição de 96 horas.

A metodologia adotada segue a Norma Técnica CETESB L5.251 (CETESB, 1992), com modificações baseadas nos procedimentos da Environmental Protection Agency dos Estados Unidos para testes de toxicidade aguda para *Mysidopsis bahia* com fluidos de perfuração (USEPA, 1993).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Substância-teste

A amostra de FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 (Código Tecam 4673/2003) foi fabricada em 21/10/03 e recebida no laboratório em 22/10/03, acondicionada em frasco plástico, sob refrigeração.

2. Sistema-teste

A espécie utilizada foi *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea) com idade entre 3 e 5 dias. Os jovens foram obtidos junto a um laboratório particular e aclimatados às condições do laboratório por no mínimo 24 horas antes do início do teste.

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.

4. Preparo da amostra e soluções

Os procedimentos utilizados para o preparo das diluições de teste seguiram a metodologia padronizada pela EPA para testes com fluido de perfuração, do qual se prepara uma diluição 1:9 com água marinha e se expõem os organismos a diluições da fase de sólidos suspensos (FSS) da mistura (USEPA, 1993).

O produto foi homogeneizado com agitador industrial por 30 minutos e o pH foi ajustado para $\pm 0,2$ unidades do pH da água de diluição (água marinha sintética). Uma alíquota de 200 mL foi retirada, diluída com 1800 mL de água marinha (diluição 1:9) e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos, com pH ajustado para $7,8 \pm 0,1$. Esta mistura foi mantida em repouso para decantação por 1 hora, na mesma temperatura de teste. A fase de sólidos suspensos (FSS) obtida foi cuidadosamente retirada e as seguintes soluções-teste foram preparadas:

- A. 1000000 ppm: 300 mL da FSS em cada frasco-teste.
- B. 300000 ppm: 300 mL da FSS + água de diluição até 1000 mL.
- C. 90000 ppm: 90 mL da FSS + água de diluição até 1000 mL.
- D. 27000 ppm: 27 mL da FSS + água de diluição até 1000 mL.
- E. 8000 ppm: 8 mL da FSS + água de diluição até 1000 mL.

5. Condições de teste e procedimentos

Jovens com 3 a 5 dias idade foram transferidos aleatoriamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, para béqueres de 30 mL com pequeno volume de água marinha e adicionados aleatoriamente aos frascos teste com cerca de 250 mL de solução-teste. Foram colocados dez jovens em cada frasco, com três réplicas em cada concentração das soluções-teste. Um controle com três réplicas e somente com água de diluição foi preparado da mesma forma.

O teste teve início em 27/10/03 e término em 31/10/03. A incubação foi feita sob temperatura média da água de $24,0 \pm 0,0$ °C, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com aeração suave e contínua em todos os frascos.



Diariamente, os animais mortos foram removidos e os animais vivos foram contados e alimentados com uma gota de suspensão concentrada de náuplios de *Artemia* recém-eclodidos por frasco. Para as soluções com turbidez elevada ou com material decantado a contagem dos animais foi realizada somente no final do teste, após 96 horas de exposição. Também diariamente, foram realizadas análises de pH, salinidade e oxigênio dissolvido de uma réplica do controle e de cada concentração.

6. Análises estatísticas

A partir dos dados de mortalidade, deve ser estimada a concentração letal mediana (CL50), isto é, a concentração que causa efeitos letais a 50% dos organismos expostos após um período pré-estabelecido de exposição. A CL50 após 96 horas de exposição (CL50; 96h) e respectivo intervalo de 95% de confiança foram estimados através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton et alii, 1977).

7. Substância de referência

Periodicamente, os organismos são submetidos a um teste de sensibilidade com a substância de referência, sulfato de zinco. A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam, utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL50; 96h média de 0,34 mg Zn/L, com limites de controle (média \pm 2.desvio padrão) de 0,22 a 0,47 mg Zn/L.

RESULTADOS

O resultado do teste com o produto FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 está apresentado na Tabela 1, com dados de mortalidade e análises físicas e químicas efetuadas durante o teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (USEPA, 1993).

Nas maiores concentrações testadas (90000 ppm FSS; 300000 ppm FSS e 1000000 ppm FSS) foi registrada mortalidade de todos os animais após 24 horas de exposição enquanto que nas demais concentrações a mortalidade foi nula ou não

significativamente diferente do controle. A concentração letal mediana da fase de sólidos suspensos do produto, nas condições de teste, foi estimada em 48795 ppm.

Em função dos resultados obtidos, o intervalo de confiança da concentração letal mediana não pode ser estimado.

CONCLUSÃO

A toxicidade aguda da fase de sólidos suspensos (FSS) do produto FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1 para jovens *Mysidopsis juniae*, nas condições de teste, foi estimada em:

CL50; 96 h = 48795 ppm FSS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB Água do Mar - Teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* Silva, 1979 (Crustacea: Mysidacea). **Norma Técnica L5.251**. São Paulo, CETESB, 19p., 1992.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 11, p. 714-19, 1977.
- 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.

RL4673-03MYA

Tabela 1 – Mortalidade e análises físicas e químicas (média ± desvio padrão) obtidas no teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* para o produto FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS 3.4.35.1, após 96 horas de exposição.

Concentração	Mortalidade (%)	pH	Salinidade (‰)	Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)
Controle	0	8,4 ± 0,3	37 ± 1	5,1 ± 1,0
8000 ppm FSS	3	8,4 ± 0,3	38 ± 2	5,2 ± 0,9
27000 ppm FSS	0	8,4 ± 0,3	39 ± 1	5,1 ± 0,7
90000 ppm FSS	100	8,5 ± 0,1	41 ± 3	5,3 ± 0,9
300000 ppm FSS	100	8,1 ± 0,1	54 ± 8	5,1 ± 1,0
1000000 ppm FSS	100	7,6 ± 0,0	> 100	3,7 ± 3,0

FSS: fase de sólidos suspensos.