

**TESTE DE TOXICIDADE DO FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR-MUL
UTILIZANDO O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus variegatus*
(Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS
Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163
Imboassica - Macaé - RJ
CEP: 27925-290

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 1051LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Hélio Gama

Endereço: Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163 - Imboassica - Macaé - RJ

Tel.: (22) 2761-2644 / 2761-9086

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)

Responsável pelo preparo da amostra: PETROBRAS

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de perfuração não aquoso BR-MUL

Código 1.1.7

Data: 19/05/2003

Código de entrada no Labtox: L105103

RESULTADO DEFINITIVO	
TESTE EMBRIOLÓGICO	
CENO 3.906,0 ppm	CEO 7.813,0 ppm
VC = 5.524,3 ppm	
Controle: 81,5 % de pluteus	
DSS: CE50 1,31 mg.L ⁻¹ (IC = 1,24 – 1,37 mg.L ⁻¹)	

IC = Intervalo de confiança



1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 18 de junho de 2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do fluido de perfuração não aquoso BR-MUL sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), modificada.

Ovos de *L. variegatus* foram expostos a diferentes concentrações do fluido, 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).

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”.

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.

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.....	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.....	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 do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C, até a hora da realização dos testes e sua preparação foi realizada com base nas metodologias propostas por API (1984); Duke *et al.* (1984) e Veiga (1998). Assim, a amostra foi homogeneizada em misturador industrial por 30 minutos a uma velocidade de 1.500 rpm. Preparou-se, então, um extrato aquoso na proporção de 1:9, utilizando-se 100 mL da amostra homogeneizada e 900 mL de água do mar. O extrato foi homogeneizado em misturador industrial por 5 minutos a 150 rpm e decantado. Após 1 hora a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e a partir desta solução foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 488; 976; 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (fichas em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste 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 (0,83 – 3,20 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

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

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido no teste realizado com o fluido de perfuração BR-MUL foi de 3.906 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 7.813 ppm e o VC (valor crônico) de 5.524,3 ppm. O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 81,5 % e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,31mg.L⁻¹ (IC = 1,24 – 1,37mg.L⁻¹).

L1051LVC

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste encontram-se listados nas fichas em anexo e estiveram dentro dos limites aceitáveis para a espécie.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* obtidos nas diferentes diluições do fluido de perfuração BR-MUL no teste conduzido em 18/06/2003.

Concentração (ppm)	Número de pluteus		Concentração (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	80	20	31.250*	77	23
	83	17		75	25
	80	20		72	28
	83	17		68	32
488	87	13	62.500*	75	25
	83	17		68	32
	85	15		62	38
	85	15		65	35
976	84	16	125.000*	67	33
	84	16		58	42
	86	14		69	31
	87	13		55	45
1.953	83	17	250.000*	44	56
	75	25		38	62
	84	16		41	59
	86	14		49	51
3.906	83	17	500.000*	0	100
	86	14		0	100
	85	15		0	100
	87	13		0	100
7.813*	80	20	1.000.000*	0	100
	79	21		0	100
	73	27		0	100
	71	29		0	100
15.625*	80	20			
	75	25			
	70	30			
	71	29			

* Estatisticamente diferente do controle.



4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- API - American Petroleum Institute 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).
- 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
- Duke, T.W.; Parrish, P.R.; Montgomery, R.M. Macauley, S.D.; Macauley, J.M.; Cripe, G.M. 1984. Acute toxicity of eight laboratory-prepared generic drilling fluids to mysids (*Mysidopsis bahia*). Gulf Breeze: Environmental Protection Agency. 4p.
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Release 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.
- Veiga, L. F. 1998. Estudo da toxicidade marinha de fluidos de perfuração de poços de óleo e gás. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 107p.



EQUIPE TÉCNICA

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2003.



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



Dr^a. Marcia Vieira Reynier
Diretora Científica
CRB-2 - 07135/02



Dr^a. Maria Cristina da Silva Maurat
Diretora Comercial
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

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

Desideria Lima Calleja
CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

ANEXOS

T1051 lvc
 File: T1051lvc

Transform: NO TRANSFORMATION

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 1 OF 2

GROUP	IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1	Controle	4	0.185	0.185	0.165
2	976	4	0.148	0.148	0.165
3	1953	4	0.180	0.180	0.165
4	3906	4	0.148	0.148	0.165
5	7813	4	0.243	0.243	0.243
6	15625	4	0.260	0.260	0.260
7	31250	4	0.270	0.270	0.270
8	62500	4	0.325	0.325	0.325
9	125000	4	0.378	0.378	0.378
10	250000	4	0.570	0.570	0.570

T1051 lvc
 File: T1051lvc

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
Controle	0.165				
976	0.165	0.656		1.70	k= 1, v=30
1953	0.165	0.656		1.78	k= 2, v=30
3906	0.165	0.656		1.80	k= 3, v=30
7813	0.243	1.885	*	1.81	k= 4, v=30
15625	0.260	2.459	*	1.82	k= 5, v=30
31250	0.270	2.787	*	1.83	k= 6, v=30
62500	0.325	4.591	*	1.83	k= 7, v=30
125000	0.378	6.312	*	1.83	k= 8, v=30
250000	0.570	12.625	*	1.83	k= 9, v=30

s = 0.043

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

TESTE N° 3061 Data: 16 / 06 / 03 Organismo-teste: L. variegatus

Tipo de teste: () fecundação () embriológico

Amostra: Fluío de perfuração rão aquos BR. rãl eãl fluío 1.1.7

Cód. de entrada no laboratório: L 105103

Data de entrada: 21 / 05 / 03 Data do preparo da amostra: 19 / 05 / 03

DADOS DO SOBRENADANTE

Salinidade: 34 ‰ pH: 8,28 OD: 5,65 mg/L

AJUSTE DA SALINIDADE () SIM () NÃO

Volume ¹ 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 () SIM () NÃO

Volume da amostra: — mL	Adição:	— μL de HCl	pH final: —
		— μL de NaOH	pH final: —

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Arçua dos Reis Data: 03 / 06 / 03

Data de filtração: 17 / 06 / 03 Aeração: Data 18 / 06 / 03

Salinidade: 35 ‰ pH: 7,86 OD: 5,79 mg/L

TESTE N° 1051

Amostra: amostra de poluição não aquosa RE-100 cont. Sulfato 3.37

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

Concentração (ppm)	Vol. Amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
00	—	100	1 - 9	30
489	0,049	99,951	71 - 74	75
976	0,098	99,902	76 - 79	80
1953	0,195	99,805	81 - 84	85
3906	0,39	99,61	86 - 89	90
7813	0,78	99,22	91 - 94	95
15625	1,56	98,44	96 - 99	100
31250	3,125	96,875	101 - 104	105
62500	6,25	93,75	106 - 109	110
125000	12,5	87,5	111 - 114	115
250000	25	75	116 - 119	120
500000	50	50	121 - 124	125
1000000	100	—	126 - 129	130

OBS:

TESTE N° 1051

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Temperatura: Sala: 25,1 °C Incubadora: 25,05 °C

Concentração (ppm)	Início			Término		
	OD mg/L	pH	S ‰	OD mg/L	pH	S ‰
00	5,73	7,86	35	5,25	7,84	35
438	6,11	7,86	35	5,48	7,81	35
976	6,26	7,87	35	5,51	7,92	35
1953	6,29	7,77	35	5,37	7,85	35
3906	6,58	7,84	35	5,47	7,88	35
7813	5,82	7,20	35	5,65	7,93	35
15625	5,99	8,22	35	5,73	7,95	35
31250	6,58	8,05	35	5,45	7,98	35
62500	5,40	8,10	35	5,37	8,03	35
125.000	6,47	8,08	35	5,89	8,10	35
250.000	6,30	8,13	35	5,13	8,13	35
500.000	6,76	8,11	35	5,11	8,08	35
1000.000	5,65	8,28	35	5,05	8,18	35