

L2004LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO BR-MUL CÓDIGO 1.1
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@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Ensaio 2004 LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico solicitante: Hélio Gama

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

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

Avaliação solicitada: Ensaio embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embriolarval (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido BR-MUL - Código 1.1

Data de preparo: 15/06/2005

Código de entrada no Labtox: L200405

Data de entrada no Labtox: 17/06/2005

Data de início do ensaio: 17/06/2005

Data de término do ensaio: 18/06/2005

RESULTADOS
CEO > 1.000.000 ppm
Controle: 97,25 % de pluteus
DSS: CE(I)50: 1,13 mg.L ⁻¹ (IC: 1,06 – 1,20 mg.L ⁻¹)

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 17 de junho de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido BR-MUL - Código 1.1, sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação à *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999). O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições do fluido, avaliando-se a diluição que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

A cada série de amostra testada é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos utilizados encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

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 a homocedasticidade da proporção de larvas pluteus com desenvolvimento normal foi verificada através dos testes de “Shapiro-Wilks” e “Bartlett”, respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste de “Williams”.

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO.

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox, que é de 0,88 a 2,66 mg.L⁻¹.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C até a hora da realização do ensaio 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 e preparou-se um extrato aquoso na proporção de 1:9, utilizando-se 600 mL da amostra homogeneizada e 5.400 mL de água do mar. O extrato foi homogeneizado em misturador industrial por 5 minutos a 5.400 rpm e decantado por 1 hora. Após este período, a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e a partir dela (solução-estoque de 1.000.000 ppm) foram preparadas as seguintes soluções-teste: 488; 976; 1.953; 3.906; 7.812; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (Fichas em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	crônico
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 / solução-teste.....	04
Nº de soluções-teste.....	12 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	35 ± 1 ‰
Duração do ensaio.....	24 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embrionarval ou anomalias
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.

3 – RESULTADOS

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

O valor de CEO (concentração de efeito observado) obtido no ensaio realizado com o Fluido BR-MUL - Código 1.1 foi superior a 1.000.000 ppm, maior solução-teste utilizada no ensaio. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 97,25% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,13mg.L⁻¹(IC:1,06– 1,20mg.L⁻¹).

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

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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	0.028	0.028		
2	3906	0.067	0.067	2.069	
3	7812	0.055	0.055	1.422	
4	15625	0.053	0.053	1.293	
5	31250	0.075	0.075	2.457	
6	62500	0.058	0.058	1.552	
7	125000	0.067	0.067	2.069	
8	250000	0.065	0.065	1.940	
9	500000	0.063	0.063	1.810	
10	1000000	0.063	0.063	1.810	

Dunnett table value = 2.54 (1 Tailed Value, P=0.05, df=30,9)

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* expostos a diferentes soluções-teste do Fluido BR-MUL - Código 1.1.

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	99	01	31.250	92	08
	96	04		92	08
	96	04		95	05
	98	02		91	09
488	98	02	62.500	94	06
	95	05		90	10
	94	06		98	02
	98	02		95	05
976	91	09	125.000	89	11
	95	05		92	08
	93	07		95	05
	96	04		97	03
1.953	91	09	250.000	92	08
	93	07		95	05
	95	05		96	04
	93	07		91	09
3.906	95	05	500.000	93	07
	96	04		95	05
	92	08		90	10
	90	10		97	03
7.812	97	03	1.000.000	95	05
	92	08		93	07
	91	09		94	06
	98	02		93	07
15.625	93	07			
	97	03			
	98	02			
	91	09			

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.

5 - EQUIPE TÉCNICA

DIRETORAS:

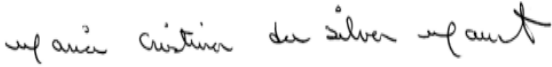

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 – 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 – 38219/02 P
Gabriele A. Correa da Rocha – CRBio-2 – 42.496/02 P
Viviane Euzébio Luiz - CRBio-2 – 42.535/02 P

ELABORADO POR:

REVISADO POR:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat 	MSc Leila Aparecida da Silva Kraus 
---	--

Rio de Janeiro, 22 de junho de 2005.