

L1118LVC

**TESTE DE TOXICIDADE DO FLUIDO SALGADO (KCI) TRATADO COM
POLÍMEROS 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 1118LVC



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 salgado (KCl) tratado com polímeros

Carboxi-metil-celulose. Cód. 2.1

Data: 18/07/2003

Código de entrada no Labtox: L111803

RESULTADO DEFINITIVO	
TESTE EMBRIOLÓGICO	
CENO 31.250 ppm	CEO 62.500 ppm
VC = 44.194,17 ppm	
Controle: 88,7 % de pluteus	
DSS: CE50 1,14 mg.L⁻¹ (IC = 1,10 – 1,19 mg.L⁻¹)	

IC = Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 24 de julho de 2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do fluido salgado (KCl) tratado com polímeros, 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 produto, 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 “Dunnetts”.



L1118LVC

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 do teste 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 400 mL da amostra homogeneizada e 3600 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 dela (solução-estoque de 1.000.000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes concentrações: 488; 977; 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (Ficha 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 salgado (KCl) tratado com polímeros foi de 31.250 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 62.500 ppm e o VC (valor crônico) de 44.194,17 ppm. O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle

L1118LVC

foi de 88,7 % e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,14 mg.L⁻¹ (IC = 1,10 – 1,19 mg.L⁻¹).

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 salgado (KCl) tratado com polímeros no teste conduzido em 24/07/2003.

Concentração (ppm)	Número de pluteus		Concentração (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	88	12	31.250	82	12
	92	08		87	13
	87	13		87	13
	88	12		87	13
488	89	11	62.500*	76	24
	86	14		16	84
	90	10		05	95
	85	15		26	74
977	86	14	125.000*	44	56
	88	12		21	79
	87	13		11	89
	88	12		17	83
1.953	87	13	250.000*	0	100
	85	15		0	100
	89	11		0	100
	88	12		0	100
3.906	89	11	500.000*	0	100
	90	10		0	100
	88	12		0	100
	88	12		0	100
7.813	88	12	1.000.000*	0	100
	86	14		0	100
	89	11		0	100
	88	12		0	100
15.625	88	12			
	81	19			
	86	14			
	88	12			

* Significativamente 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 Realease 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.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12156/02

Marcia Vieira Reynier

Dra. Marcia Vieira Reynier
CRB-2 - 07135/02

Maria Cristina da Silva Maurat

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat
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

fluido salgado KCL tratado com polimeros
 File: t1118 Transform: 1/Y (INVERSE)

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	9	282.636	31.404	20.133
Within (Error)	30	46.795	1.560	
Total	39	329.430		

Critical F value = 2.21 (0.05,9,30)
 Since $F > \text{Critical } F$ REJECT H_0 :All groups equal

fluido salgado KCL tratado com polimeros
 File: t1118 Transform: 1/Y (INVERSE)

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2

H_0 :Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	0.0	9.215	0.113		
2	488	8.225	0.125	1.121	
3	977	7.875	0.128	1.517	
4	1953	7.946	0.128	1.437	
5	3906	8.939	0.112	0.312	
6	7813	8.225	0.123	1.121	
7	15625	7.268	0.143	2.204	
8	31250	7.158	0.143	2.329	
9	62500	1.940	0.693	8.237	*
10	125000	1.345	0.768	8.911	*

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

fluido salgado KCL tratado com polimeros
 File: t1118 Transform: 1/Y (INVERSE)

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2

H_0 :Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	0.0	4			
2	488	4	-0.035	-31.0	-0.012
3	977	4	-0.035	-31.0	-0.015
4	1953	4	-0.035	-31.0	-0.015
5	3906	4	-0.035	-31.0	0.000
6	7813	4	-0.035	-31.0	-0.010
7	15625	4	-0.035	-31.0	-0.030
8	31250	4	-0.035	-31.0	-0.030

Handwritten signature

9	62500	4	-0.035	-31.0	-0.580
10	125000	4	-0.035	-31.0	-0.655

James

TESTE 1118 L.V.S. Data: 24 / 07 / 03 Organismo-teste: L. orientalis
 Tipo de teste: () fecundação () embriológico Operador: V. S. S.

Amostra: Fluido salgado (KCl) tratado com polímeros

Cód. de entrada no laboratório: L111803 Data de entrada: 22 / 07 / 03

DADOS DA AMOSTRA: Salinidade: 25 ‰ pH: 8,64

Preparo da Solução-estoque: 100 mL (mg) da substância (amostra bruta)
900 mL de água de diluição.

Concentração final da solução-estoque: 1000.000 ppm (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>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> ‰	<u>—</u> ppm

SALMOURA

Método de obtenção: — Salinidade: — ‰ pH: —

AJUSTE DO pH () SIM () NÃO

Adição:
— µL de HCl pH final: —
— µL de NaOH pH final: —

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Angra dos Reis Data: 04 / 07 / 03

Salinidade: 34 ‰ pH: 7,95 OD: 5,22 mg/L

TESTE AMX L.V.C.

Solução-estoque: 1.000.000 ppm Vol. final a ser preparado: 100 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
488	0,019	99,981	156-159	160
977	0,038	99,962	161-164	165
977 1.953	0,195	99,805	166-169	170
1953 3.906	0,39	99,61	171-174	175
<i>Marinho</i> 3.906 7.813	0,78	99,22	176-179	180
7.813 15.625	1,56	98,44	181-184	185
15.625 31.250	3,13	96,87	186-189	190
62.500	6,25	93,75	191-194	195
125.000	12,5	87,5	196-199	200
250.000	25	75	201-204	205
500.000	50	50	206-209	210
1.000.000	100	—	211-214	215

OBS:



TESTE MILK L.C.

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Temperatura: Sala: 25 ± 1 °C Incubadora: 25 ± 0,5 °C

Concentração (µg/ml)	Início			Término		
	S‰	OD	pH	S‰	OD	pH
0,0	34	5,22	7,95	34	4,74	8,09
977	34	5,92	7,96	35	4,94	7,62
3906	35	5,93	7,96	35	4,74	7,75
15625	35	5,44	7,76	35	4,72	7,91
62500	35	5,76	7,88	35	5,29	8,14
250.000	35	5,76	8,14	35	4,83	8,28
1000.000	35	5,74	8,64	35	4,77	8,60