

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO SALGADO
(KCL E NACL) – POLIMÉRICO 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

Teste 1356 LVC

Rio de Janeiro

5

L1356LVC

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 embriológico

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: Fluido de perfuração Salgado (KCl e NaCl), tratado com polímero catiônico.

Fluido Polimérico Código: 2.5.4

Data: 26/04/2004

Código de entrada no Labtox: L135604

Data de entrada no Labtox: 28/04/2004

RESULTADOS	
CENO 122 ppm	CEO 244 ppm
VC = 172,53 ppm	
Controle: 84,75% de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 0,98 mg.L ⁻¹ (IC = 0,93 – 1,02 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 29 de abril de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de Perfuração Salgado (KCl e NaCl) – Polimérico sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999), com adaptações. Este teste 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 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 a homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos 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 “Willians”.

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
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 coleta.dos no campo
Nº de organismos / frasco.....	300 ovos
Nº de réplicas / diluição.....	04
Nº de diluições.....	14 + 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 e preparou-se 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 por 1 hora. Após este período, a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e teve o pH ajustado de 9,62 para 8,35 com 70 µL de HCl. A partir desta solução- estoque (1.000.000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 122; 244; 488; 977; 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000ppm (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;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 0,83 a 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 com o Fluido de Perfuração Salgado (KCl e NaCl) - Polimérico foi de 122 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 244 ppm e o VC (valor crônico) de 172,53 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 84,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 0,98 mg.L⁻¹ (IC = 0,93 – 1,02 mg.L⁻¹). Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, nas diferentes diluições, encontram-se listados nas fichas em anexo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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	0.151				
122	0.151	0.045		1.75	k= 1, v=15
244	0.225	2.613	*	1.84	k= 2, v=15
488	0.255	3.694	*	1.87	k= 3, v=15
977	0.910	27.298	*	1.88	k= 4, v=15

s = 0.039

L1356LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido de Perfuração Salgado – Polimérico no teste conduzido em 29/04/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	87	13	15.625*	0	100
	82	18		0	100
	84	16		0	100
	86	14		0	100
122	92	08	31.250*	0	100
	83	17		0	100
	84	16		0	100
	81	19		0	100
244*	80	20	62.500*	0	100
	78	22		0	100
	78	22		0	100
	74	26		0	100
488*	73	27	125.000*	0	100
	74	26		0	100
	76	24		0	100
	75	25		0	100
977*	0	100	250.000*	0	100
	14	86		0	100
	09	91		0	100
	13	87		0	100
1.953*	0	100	500.000*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
3.906*	0	100	1.000.000*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
7.813*	0	100			
	0	100			
	0	100			
	0	100			

* 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. 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 - CRB-2 - 32963/02

Desideria Lima Calleja - CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE: Viviane Euzébio Luiz

ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina Maurat



REVISADO POR

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 12 de maio de 2004.

Data Início: 29 / 04 / 04 Hora: 14:30 Término: 1 / 04 / 04

 Organismo-teste: L. variegatus Operador(es): Valéria

 Tipo de teste: () fecundação () embriológico

 Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L135604 Salinidade: 35 ‰ pH 9,6

 Solução-estoque: 600 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 5400 mL de água de diluição

 Concentração final da solução-estoque: 3000000 ppm (mg/L, %)

 Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL

 Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —

 Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

 Ajuste do pH: 70 µL de HCl µL de NaOH pH final: 8,35

 Água de diluição: Lote: 015 Salinidade: — ‰ pH: 8,10 OD: 5,66 mg.L⁻¹

 Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 41 µL

 Nº de réplicas por diluição: 5

 Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 25 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			Vol. <u>100</u> mL	
Diluição <u>ppm</u>	Vol. sol. estoque mL	Vol. água de diluição mL	Tubos nº	
			Leitura	F / Q
<u>0,0</u>	<u>—</u>	<u>100</u>	<u>1-6</u>	<u>10</u>
<u>122</u>	<u>0,012</u>	<u>99,988</u>	<u>76</u>	<u>80</u>
<u>244</u>	<u>0,024</u>	<u>99,976</u>	<u>81-84</u>	<u>85</u>
<u>488</u>	<u>0,049</u>	<u>99,951</u>	<u>96-99</u>	<u>90</u>
<u>977</u>	<u>0,098</u>	<u>99,902</u>	<u>91-94</u>	<u>95</u>
	<u>0,195</u>	<u>99,805</u>	<u>96-99</u>	<u>100</u>
	<u>0,39</u>	<u>99,61</u>	<u>101-104</u>	<u>105</u>
<u>7.813</u>	<u>0,78</u>	<u>99,22</u>	<u>106-109</u>	<u>110</u>
	<u>1,56</u>	<u>98,44</u>	<u>111-114</u>	<u>115</u>
		<u>96,87</u>	<u>116-119</u>	<u>120</u>
<u>62.500</u>		<u>93,75</u>	<u>121-124</u>	<u>125</u>
<u>125.000</u>	<u>12,5</u>	<u>87,5</u>	<u>126-129</u>	
<u>250.000</u>	<u>—</u>	<u>75</u>	<u>131</u>	
<u>500.000</u>		<u>50</u>	<u>139</u>	<u>140</u>
<u>1.000.000</u>	<u>100</u>		<u>141</u>	<u>145</u>

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (µg/ml)	Início			Término		
	S (%)	OD	pH	S (%)	OD	pH
0,0	33	5,66	8,10	33	5,64	8,16
122	33	5,29	8,11	33	5,07	8,12
244	33	5,56	8,18	33	4,96	8,10
488	33	5,57	8,19	33	5,33	8,11
977	33	5,67	8,19	33	5,34	8,15
1953	33	5,58	8,14	33	5,44	8,14
3906	33	5,86	8,17	33	4,91	8,09
7813	33	5,80	8,14 8,16	33	4,82	8,00
15625	33	5,80	8,18	33	4,51	7,88
31250	33	5,81	8,16	34	5,00	7,84
62500	33	5,92	8,22	34	5,02	7,76
125000	34	5,83	8,27	34	5,14	7,74
250000	34	5,94	8,35	35	1,87	7,77
500000	35	5,97	8,47	36	5,61	7,68
1000000	35	6,11	8,35	37	4,74	7,74

OBS: