

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO SALGADO
(KCL E NACL) – BASE ÁGUA 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 1360 LVC

Rio de Janeiro

5

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 Base Água Código: 2.5.9

Data: 19/04/2004

Código de entrada no Labtox: L136004

Data de entrada no Labtox: 28/04/2004

RESULTADOS	
CENO 7.813 ppm	CEO 15.625 ppm
VC = 11.049 ppm	
Controle: 81,5 % de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 2,83 mg.L ⁻¹ (IC = 2,72 – 2,94 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança



1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 04 de maio de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de Perfuração Salgado (KCl e NaCl) – Base Água 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.....	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 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 seu pH ajustado de 8,95 para 8,15 com 450µL de HCL. A partir desta solução-estoque (1.000.000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 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) – Base Água foi de 7.813 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 15.625 ppm e o VC (valor crônico) de 11.049 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 81,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 2,83 mg.L⁻¹ (IC = 2,72 – 2,94 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: SQUARE ROOT(Y)

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model)

TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
0.0	0.381				
488	0.381	1.492		1.71	k= 1, v=24
977	0.381	1.492		1.79	k= 2, v=24
1953	0.381	1.492		1.82	k= 3, v=24
3906	0.395	1.077		1.83	k= 4, v=24
7813	0.395	1.077		1.84	k= 5, v=24
15625	0.517	2.645	*	1.84	k= 6, v=24
31250	0.602	5.236	*	1.85	k= 7, v=24

s = 0.046

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido de Perfuração Salgado – Base Água no teste conduzido em 04/05/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	81	19	31.250*	63	37
	83	17		62	38
	82	18		65	35
	80	20		65	35
488	89	11	62.500*	0	100
	85	15		0	100
	87	13		0	100
	88	12		0	100
977	86	14	125.000*	0	100
	87	13		0	100
	89	11		0	100
	86	14		0	100
1.953	86	14	250.000*	0	100
	84	16		0	100
	88	12		0	100
	85	15		0	100
3.906	81	19	500.000*	0	100
	91	09		0	100
	83	17		0	100
	80	20		0	100
7.813	82	18	1.000.000*	0	100
	83	17		0	100
	91	09		0	100
	82	18		0	100
15.625*	64	36			
	73	27			
	70	30			
	84	16			

* 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.

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

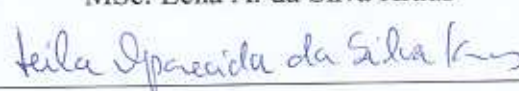
ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina Maurat



REVISADO POR

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 13 de maio de 2004.

Data Início: 04 / 05 / 04 Hora: 16:00 Término: 05 / 05 / 04

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

Tipo de teste: () fecundação () embriológico

Tipo de amostra: fluido Cód. entrada 1136004 Salinidade: 36 ‰ pH 8,95

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

Concentração final da solução-estoque: 1000.000 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: 450 µL de HCl — µL de NaOH pH final: 8,15

Água de diluição: Lote: 0,16 Salinidade: 34 ‰ pH: 7,97 OD: 4,59 mg.L⁻¹

Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 37 µL

Nº de réplicas por diluição: 05

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	Vol. sol. estoque mL	Vol. água de diluição mL	Tubos nº	
			Leitura	F / Q
<u>00</u>	<u>—</u>	<u>100</u>	<u>1-4</u>	<u>10</u>
<u>488</u>	<u>0,049</u>	<u>99,951</u>	<u>176 - 179</u>	<u>180</u>
<u>977</u>	<u>0,098</u>	<u>99,902</u>	<u>181 - 184</u>	<u>185</u>
<u>1953</u>	<u>0,195</u>	<u>99,805</u>	<u>186 - 189</u>	<u>190</u>
<u>3906</u>	<u>0,39</u>	<u>99,61</u>	<u>191 - 194</u>	<u>195</u>
<u>7813</u>	<u>0,78</u>	<u>99,22</u>	<u>196 - 199</u>	<u>200</u>
<u>15625</u>	<u>1,56</u>	<u>98,44</u>	<u>201 - 204</u>	<u>205</u>
<u>31250</u>	<u>3,13</u>	<u>96,87</u>	<u>206 - 209</u>	<u>210</u>
<u>62500</u>	<u>6,25</u>	<u>93,75</u>	<u>211 - 214</u>	<u>215</u>
<u>125000</u>	<u>12,5</u>	<u>87,5</u>	<u>216 - 219</u>	<u>220</u>
<u>250000</u>	<u>25</u>	<u>75</u>	<u>221 - 224</u>	<u>225</u>
<u>500000</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>226 - 229</u>	<u>230</u>
<u>1000000</u>	<u>100</u>	<u>←</u>	<u>231 - 234</u>	<u>235</u>

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (ppm)	Início			Término		
	S (%)	OD	pH	S (%)	OD	pH
0,0	34	4,59	7,97	34	4,60	7,93
488	34	5,45	8,00	34	4,18	7,88
977	34	5,39	7,97	34	4,36	7,91
1953	34	5,39	7,93	34	5,12	7,86
3906	34	5,40	7,96	34	5,11	7,86
4813	34	5,15	7,98	34	4,23	7,75
15625	34	5,26	7,99	34	5,04	7,77
31250	34	5,21	8,04	34	4,60	7,66
62500	34	5,24	8,03	34	3,78	7,55
125000	34	4,92	8,11	34	3,09	7,49
250000	34	5,17	8,11	35	3,14	7,46
500000	35	5,15	8,07	35	2,93	7,63
1000000	36	4,63	8,15	36	2,86	7,70

OBS: _____
