

LI494LVC

TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO SCOL (CÓD. 2.6.6)
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 - Polo 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 1494 LVC

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 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 SCOL

Código: 2.6.6 – Fluido base água “genérico”

Data de preparo: 12/08/2004

Código de entrada no Labtox: L149404

Data de entrada no Labtox: 13/08/2004

| RESULTADOS | |
|---|-----------------|
| CENO 62.500 ppm | CEO 125.000 ppm |
| VC = 88.388 ppm | |
| Controle: 91,75 % de pluteus | |
| DSS: CE(I)50 = 1,45 mg.L ⁻¹ (IC = 1,37 – 1,54 mg.L ⁻¹) | |

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 23 de agosto de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de Perfuração SCOL (Código 2.6.6) 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 “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..... | 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 / diluição..... | 04 |
| Nº de diluições..... | 12 + 1 controle* |
| Água de diluição..... | água do mar natural filtrada (0,45 µm) |
| Salinidade das soluções-teste..... | 35 ± 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 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 1.000.000 ppm (Fichas em anexo).

b

VALIDADE DO TESTE

O teste EMBRIOLÓGICO é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% 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 SCOL (Código 2.6.6) foi de 62.500 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 125.000 ppm e o VC (valor crônico) de 88.388 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 91,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,45 mg.L⁻¹ (IC = 1,37 – 1,54 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 | 0.082 | | | | |
| 977 | 0.105 | 0.860 | | 1.70 | k= 1, v=30 |
| 1953 | 0.105 | 0.860 | | 1.78 | k= 2, v=30 |
| 3906 | 0.105 | 0.860 | | 1.80 | k= 3, v=30 |
| 7813 | 0.105 | 0.860 | | 1.81 | k= 4, v=30 |
| 15625 | 0.105 | 0.860 | | 1.82 | k= 5, v=30 |
| 31250 | 0.105 | 0.860 | | 1.83 | k= 6, v=30 |
| 62500 | 0.125 | 1.595 | | 1.83 | k= 7, v=30 |
| 125000 | 0.318 | 8.819 | * | 1.83 | k= 8, v=30 |
| 250000 | 0.790 | 26.552 | * | 1.83 | k= 9, v=30 |

s = 0.038 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido de Perfuração SCOL (Código 2.6.6) no teste conduzido em 23/08/2004.

| Diluição (ppm) | Número de pluteus | | Diluição (ppm) | Número de pluteus | |
|----------------|-------------------|----------|----------------|-------------------|----------|
| | Saudáveis | Afetados | | Saudáveis | Afetados |
| Controle | 91 | 09 | 31.250 | 87 | 13 |
| | 90 | 10 | | 88 | 12 |
| | 94 | 06 | | 89 | 11 |
| | 92 | 08 | | 95 | 05 |
| 488 | 84 | 16 | 62.500 | 86 | 14 |
| | 89 | 11 | | 93 | 07 |
| | 90 | 10 | | 85 | 15 |
| | 91 | 09 | | 86 | 14 |
| 977 | 90 | 10 | 125.000* | 65 | 35 |
| | 89 | 11 | | 75 | 25 |
| | 87 | 13 | | 63 | 37 |
| | 89 | 11 | | 70 | 30 |
| 1.953 | 87 | 13 | 250.000* | 25 | 75 |
| | 90 | 10 | | 18 | 82 |
| | 86 | 14 | | 17 | 83 |
| | 83 | 17 | | 24 | 76 |
| 3.906 | 98 | 02 | 500.000* | 0 | 100 |
| | 88 | 12 | | 0 | 100 |
| | 89 | 11 | | 0 | 100 |
| | 95 | 05 | | 0 | 100 |
| 7.813 | 85 | 15 | 1.000.000* | 0 | 100 |
| | 93 | 07 | | 0 | 100 |
| | 89 | 11 | | 0 | 100 |
| | 90 | 10 | | 0 | 100 |
| 15.625 | 88 | 12 | | | |
| | 97 | 03 | | | |
| | 86 | 14 | | | |
| | 89 | 11 | | | |

*Significativamente diferente do controle.

b

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

COORDENADORA DE PESQUISA E TECNOLOGIA: Viviane Euzébio Luiz

BIÓLOGAS:

- Carina C. Gomes Machado - CRB-2 - 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRB-2 - 38219/02 P

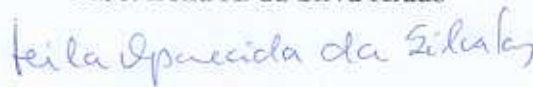
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 08 de setembro de 2004.

Data Início: 23 / 08 / 04 Hora: 9:30 Término: 24 / 08 / 04

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

Tipo de teste: () fecundação () embriológico

Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L149404 Salinidade: 35 ‰ pH 8,90

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

Concentração final da solução-estoque: 1.000.000 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: — µL de HCl — µL de NaOH pH final: —

Água de diluição: Lote: 023 Salinidade: 35 ‰ pH: 8,14 OD: 5,40 mg.L⁻¹

Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 80 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: | | | |
|------------------------------|-------------------------|--------------|-----------|
| Avolumado para <u>100</u> mL | | | |
| Diluição <u>ppm</u> | Vol. sol. estoque mL | Tubos nº | |
| | | Leitura | F / Q |
| <u>0,0</u> | <u>—</u> | <u>1-9</u> | <u>10</u> |
| <u>488</u> | <u>0,049</u> | <u>36-39</u> | <u>40</u> |
| <u>977</u> | <u>0,098</u> | <u>41-44</u> | <u>45</u> |
| <u>1.953</u> | <u>0,195</u> | <u>46-49</u> | <u>50</u> |
| <u>3.906</u> | <u>0,391</u> | <u>51-54</u> | <u>55</u> |
| <u>7.813</u> | <u>0,782</u> | <u>56-59</u> | <u>60</u> |
| <u>15.625</u> | <u>1,562</u> | <u>61-64</u> | <u>65</u> |
| <u>31.250</u> | <u>3,125</u> | <u>66-69</u> | <u>70</u> |
| <u>62.500</u> | <u>6,250</u> | <u>71-74</u> | <u>75</u> |
| <u>125.000</u> | <u>12,500</u> | <u>76-79</u> | <u>80</u> |
| <u>250.000</u> | <u>25,000</u> | <u>81-84</u> | <u>85</u> |
| <u>500.000</u> | <u>50,000</u> | <u>86-89</u> | <u>90</u> |
| <u>1.000.000</u> | <u>100,000</u> | <u>91-94</u> | <u>95</u> |

96-99 100
101-104 105
106-109 110
111-114 115
116-119 120
121-124 125
126-129 130
131-134 135
136-139 140
141-144 145
146-149 150
151-154 155

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

| Diluição (ppm) | Início | | | Término | | |
|-------------------|--------|------|------|---------|------|------|
| | S (%) | OD | pH | S (%) | OD | pH |
| 0,0 | 35 | 5,40 | 8,14 | 35 | 6,54 | 7,95 |
| 489 | 35 | 6,85 | 8,15 | 35 | 6,36 | 8,20 |
| 977 | 35 | 6,97 | 8,14 | 35 | 6,31 | 8,22 |
| 1453 | 35 | 6,84 | 8,15 | 35 | 6,14 | 8,23 |
| 3906 | 35 | 6,92 | 8,15 | 35 | 5,87 | 8,21 |
| 7813 | 35 | 6,74 | 8,14 | 35 | 5,66 | 8,20 |
| 15625 | 35 | 6,52 | 8,14 | 35 | 5,77 | 8,21 |
| 31250 | 35 | 6,23 | 8,15 | 35 | 5,84 | 8,24 |
| 62500 | 35 | 6,27 | 8,16 | 35 | 5,52 | 8,18 |
| 125000 | 35 | 6,51 | 8,16 | 35 | 5,73 | 8,21 |
| 250000 | 35 | 6,70 | 8,19 | 35 | 5,43 | 8,25 |
| 500000 | 35 | 6,70 | 8,29 | 35 | 5,62 | 8,13 |
| 1.000.000 | 35 | 4,12 | 8,50 | 35 | 3,85 | 7,98 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

du

of.

OBS: _____
