

TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO BR-CARB (CÓDIGO 2.7.3)
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 1178 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 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)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido BR-CARB

Código: 2.7.3

Data: 18/09/2003

Código de entrada no Labtox: L: 7803

RESULTADO DEFINITIVO	
TESTE EMBRIOLÓGICO	
CENO 31.250 ppm	CEO 62.500 ppm
VC = 44.194 ppm	
Controle: 83,5% de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 1,51 mg.L ⁻¹ (IC = 1,46 – 1,56 mg.L ⁻¹)	



1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 01/10/2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido BR-CARB (código: 2.7.3) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 - METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB 1999). Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes concentrações da substância, 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 a 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”.

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..... $25 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$
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..... $34 \pm 1 \text{‰}$
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 *et al.*, 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 teve o pH ajustado de 9,89 para 8,15 com 80 µL 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 1.000.000 ppm (Ficha 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 (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 com o Fluido BR-CARB (código: 2.7.3) 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 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 83,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,51 mg.L⁻¹ (IC = 1,46 – 1,56 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, nas diferentes diluições, são apresentados nas fichas em anexo.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido BR-CARB (código: 2.7.3) no teste conduzido em 01/10/2003.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	83	17	31.250	76	24
	83	17		87	13
	81	19		69	31
	87	13		69	31
488	86	14	62.500*	60	40
	88	12		69	31
	89	11		65	35
	90	10		46	54
977	87	13	125.000*	17	83
	89	11		24	76
	90	10		14	86
	89	11		10	90
1.953	86	14	250.000*	0	100
	89	11		0	100
	87	13		0	100
	85	15		0	100
3.906	90	10	500.000*	0	100
	87	13		0	100
	88	12		0	100
	88	12		0	100
7.813	85	15	1.000.000*	0	100
	82	18		0	100
	83	17		0	100
	89	11		0	100
15.625	84	16			
	87	13			
	90	10			
	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.



5 - EQUIPE TÉCNICA

Rio de Janeiro, 14 de outubro de 2003.

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

ANEXOS



fluido 2.7.3
File: t11781vc

Transform: LOG BASE 10(Y)

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	9	2.935	0.326	42.699
Within (Error)	30	0.229	0.008	
Total	39	3.165		

Critical F value = 2.21 (0.05,9,30)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

fluido 2.7.3
File: t11781vc

Transform: LOG BASE 10(Y)

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	0.0	-0.787	0.165		
2	488	-0.933	0.118	-2.374	
3	977	-0.951	0.113	-2.657	
4	1953	-0.881	0.133	-1.521	
5	3906	-0.932	0.118	-2.351	
6	7813	-0.824	0.153	-0.608	
7	15625	-0.901	0.128	-1.846	
8	31250	-0.631	0.248	2.521	
9	62500	-0.408	0.400	6.134	*
10	125000	-0.078	0.838	11.469	*

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

fluido 2.7.3
File: t11781vc

Transform: LOG BASE 10(Y)

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2 Ho: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	0.050	30.0	0.048
3	977	4	0.050	30.0	0.053
4	1953	4	0.050	30.0	0.033
5	3906	4	0.050	30.0	0.048
6	7813	4	0.050	30.0	0.013
7	15625	4	0.050	30.0	0.038
8	31250	4	0.050	30.0	-0.082

62500
.25000

050
050

30

235
.673

up

TESTE 1178 Luc Data: 01 / 10 / 03 Organismo-teste: L. variegatus
 Tipo de teste: () fecundação () embriológico Operador: Junior

Amostra: Fluido cod. 2.7.3
 Cód. de entrada no laboratório: L117803 Data de entrada: 23 / 09 / 03
 DADOS DA AMOSTRA: Salinidade: 34 ‰ pH: 8,89

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 (<input checked="" type="checkbox"/>) 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: <u>—</u> Salinidade: <u>—</u> ‰ pH: <u>—</u>				

AJUSTE DO pH () SIM NÃO

Adição: 30 µL de HCl pH final: 8,15
— µL de NaOH pH final: —

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Angra dos Reis Data: 23 / 09 / 03

Salinidade: 34 ‰ pH: 8,53 OD: 6,43 mg/L

Solução-estoque: 1000.000 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	0,049	99,95	196 - 199	200
977	0,098	99,90	202 - 204	205
1953	0,195	99,80	206 - 209	210
3906	0,39	99,61	211 - 214	215
7813	0,78	99,22	216 - 219	220
15.625	1,56	98,44	221 - 224	225
31.250	3,13	96,87	226 - 229	230
62.500	6,25	93,75	231 - 234	235
125.000	12,5	87,5	236 - 239	240
250.000	25	75,0	241 - 244	245
500.000	50	50,0	246 - 249	250
1.000.000	100	—	251 - 254	255

OBS:

