

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO SALGADO
TRATADO COM AMIDO STA (CÓDIGO 3.3) 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 1315 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 salgado tratado com Amido (STA) - Código: 3.3
Data: 26/02/2004

Código de entrada no Labtox: L131504

Data de entrada no Labtox: 04/03/2004

RESULTADOS	
CENO 50.250 ppm	CEO 100.500 ppm
VC = 71.064,23 ppm	
Controle: 89,5% de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 1,12 mg.L ⁻¹ (IC = 1,08 – 1,17 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 04 de março de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de perfuração Salgado tratado com Amido - STA (código: 3.3) 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 "Chi-square" e "Bartlett", respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico 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 coletados 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, teve o pH ajustado de 9,52 para 8,45 com 50 µL de HCl e a salinidade de 41 para 33‰, resultando em uma solução-estoque de 804.000 ppm. A partir dela foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 98; 196; 393; 785; 1.570; 3.141; 6.281; 12.563; 25.125; 50.250; 100.500; 201.000; 402.000 e 804.000 ppm (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 (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 Salgado tratado com Amido STA (código 3.3) foi de 50.250 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 100.500 ppm e o VC (valor crônico) de 71.064,23 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89,5 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,12 mg.L⁻¹ (IC = 1,08 – 1,17 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.

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
Controle	0.093				
6281	0.093	0.683		1.73	k= 1, v=18
12563	0.093	0.683		1.82	k= 2, v=18
25125	0.093	0.683		1.85	k= 3, v=18
50250	0.105	0.000		1.86	k= 4, v=18
100500	0.875	42.070	*	1.87	k= 5, v=18

s = 0.026 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

L1315LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido Salgado tratado com amido (código 3.3) no teste conduzido em 04/03/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	92	08	12.563	89	11
	87	13		90	10
	86	14		95	05
	93	07		89	11
98	92	08	25.125	93	07
	95	05		90	10
	97	03		91	09
	95	05		92	08
196	92	08	50.250	87	13
	90	10		89	11
	89	11		91	09
	91	09		91	09
393	88	12	100.500*	16	84
	90	10		12	88
	95	05		08	92
	93	07		14	86
785	92	08	201.000*	0	100
	89	11		0	100
	91	09		0	100
	93	07		0	100
1.570	93	07	402.000*	0	100
	90	10		0	100
	89	11		0	100
	95	05		0	100
3.141	95	05	804.000*	0	100
	88	12		0	100
	90	10		0	100
	89	11		0	100
6.281	92	08			
	91	09			
	93	07			
	89	11			

* Significativamente diferente do controle.


5

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 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

Rio de Janeiro, 08 de março de 2004


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

TESTE 1315 LVC Data: 04/03/04 Organismo-teste: L. sinuatus

Tipo de teste: () fecundação () embriológico Operador: DESIDERIA

Amostra: Fluido

Cód. de entrada no laboratório: L131504

Data de entrada: 04/03/2004

DADOS DA AMOSTRA: Salinidade: 41 ‰ pH: 9,52

Preparo da Solução-estoque: 200 mL (mg) da substância (amostra bruta)

1800 mL de água de diluição.

Concentração final da solução-estoque: 1.000.000 ppm (mg/L, ‰)

AJUSTE DA SALINIDADE () SIM () NÃO

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Vólume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
<u>49</u> mL	<u>—</u> mL	<u>201</u> mL	<u>33</u> ‰	<u>804.000</u> ppm

SALMOURA

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

AJUSTE DO pH () SIM () NÃO

Adição: 50 µL de HCl pH final: 8,45

— µL de NaOH pH final: —

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Angra dos Reis Data: 11/02/04

Salinidade: 33 ‰ pH: 8,34 OD: 4,28 mg/L

TESTE 1315 LVC

Solução-estoque: 804.000 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	—		1-9	10
98	0,012	99,98	36-39	40
196	0,024	99,97	41-44	45
393	0,049	99,95	46-49	50
785	0,098	99,90	51-54	55
1570	0,195	99,80	56-59	60
3141	0,39	99,61	61-64	65
6.281	0,78	99,22	66-69	70
12563	1,56	98,44	71-74	75
25125	3,13	96,87	76-79	80
50250	6,25	93,75	81-84	85
100500	12,5	87,5	86-89	90
201000	25	75	91-94	95
402000	50	50	96-99	100
804000	100	—	101-104	105

OBS:

TESTE 1315 LVC

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

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

Concentração (ppm)	Início			Término		
	S‰	OD	pH	S‰	OD	pH
0,0	33	4,28	8,14	33	4,16	8,25
98	33	4,04	8,12	33	4,01	8,19
196	—	—	—	—	—	—
393	33	4,34	8,14	33	4,00	8,21
785	—	—	—	—	—	—
1570	33	4,29	8,14	33	3,88	8,19
3141	—	—	—	—	—	—
6281	33	3,98	8,15	33	3,86	8,21
12563	—	—	—	—	—	—
25125	33	4,17	8,16	33	4,08	8,17
50250	—	—	—	—	—	—
100500	33	4,21	8,20	33	4,05	8,04
201000	—	—	—	—	—	—
402000	33	4,23	8,37	33	3,79	7,94
804000	34	4,27	8,56	34	3,94	8,30