

L1856LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO
(CÓDIGO 3.4.29.5) 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 1856 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 embriolarval (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Solução de Cloreto de Cálcio

(Código 3.4.29.5)

Data de preparo: 28/03/2005

Código de entrada no Labtox: L185605

Data de entrada no Labtox: 29/03/2005

Data de início do teste: 11/04/2005

Data de término do teste: 12/04/2005

RESULTADOS	
CENO 11.088 ppm	CEO 22.177ppm
VC 15.681 ppm	
Controle: 95 % de pluteus	
DSS: CE(I)50: 2,45 mg.L ⁻¹ (IC: 2,35 – 2,56 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 11 de abril de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Solução de Cloreto de Cálcio (Cód. 3.4.29.5) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação à *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999). O 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 larvas pluteus com desenvolvimento normal 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.

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do teste com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox, que é de 0,88 a 2,66 mg.L⁻¹.

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 a salinidade ajustada de 93‰ para 39‰, resultando em uma solução-estoque de 354.833 ppm. A partir dela foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 173; 346; 693; 1.386; 2.772; 5.544; 11.088; 22.177; 44.354; 88.708; 177.416 e 354.833 ppm (Fichas em anexo).

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.....	33 a 39 ‰
Duração do teste.....	24 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embriolarval ou anomalias
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.

3 – RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus normais e mal formados e/ou com atraso no desenvolvimento são apresentados na tabela I.

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido no teste realizado com o Fluido Solução de Cloreto de Cálcio (Cód. 3.4.29.5) foi de 11.088 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 22.177 ppm e o VC (valor crônico) de 15.681 ppm. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 95% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 2,45mg.L⁻¹ (IC: 2,35–2,56mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, 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	0.050				
173	0.064	0.482		1.71	k= 1, v=27
346	0.064	0.482		1.79	k= 2, v=27
693	0.067	0.584		1.81	k= 3, v=27
1386	0.067	0.584		1.82	k= 4, v=27
2772	0.067	0.584		1.83	k= 5, v=27
5544	0.075	0.876		1.84	k= 6, v=27
11088	0.090	1.401		1.84	k= 7, v=27
22177	0.602	19.353	*	1.84	k= 8, v=27

s = 0.040 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido Solução de Cloreto de Cálcio (Cód. 3.4.29.5).

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	95	05	11.088	96	04
	97	03		95	05
	97	03		93	07
	91	09		80	20
173	92	08	22.177*	47	53
	91	09		37	63
	93	07		34	66
	96	04		41	59
346	91	09	44.354*	0	100
	93	07		0	100
	98	02		0	100
	95	05		0	100
693	91	09	88.708*	0	100
	97	03		0	100
	90	10		0	100
	95	05		0	100
1.386	95	05	177.416*	0	100
	97	03		0	100
	90	10		0	100
	91	09		0	100
2.772	91	09	354.833*	0	100
	90	10		0	100
	97	03		0	100
	96	04		0	100
5.544	92	08			
	90	10			
	93	07			
	95	05			

* Diferença significativa em relação ao 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 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:

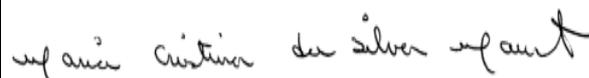
MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRB-2 – 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRB-2 – 38219/02 P
Viviane Euzébio Luiz - CRB-2 – 42.535/02 P

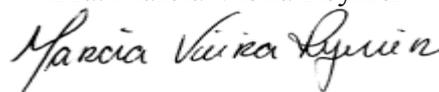
ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat



REVISADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



Rio de Janeiro, 18 de abril de 2005.