

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:

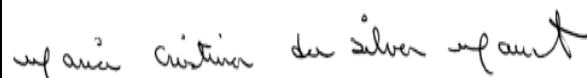
MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

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

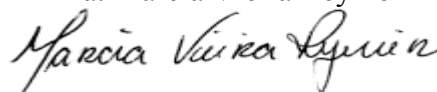
ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat



REVISADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



Rio de Janeiro, 18 de abril de 2005.