

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO
CÓDIGO 3.4.29.6 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 - 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

Ensaio 2005 LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico solicitante: Hélio Gama

Endereço: Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163 - Imboassica - Macaé - RJ

Tel.: (22) 2761-2644/2761-9086

Avaliação solicitada: Ensaio embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embriolarval (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido solução de cloreto de cálcio -Código 3.4.29.6
Data do preparo: 14/06/2005

Código de entrada no Labtox: L200505

Data de entrada no Labtox: 17/06/2005

Data de início do ensaio: 19/07/2005

Data de término do ensaio: 20/07/2005

RESULTADOS
CENO 1.249 ppm CEO 2.497 ppm da FPS VC 1.766 ppm da FPS
Controle: 89,7 % de pluteus
DSS: CE(I)50: 1,61 mg.L ⁻¹ (IC: 1,55 – 1,68 mg.L ⁻¹)

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 19 de julho de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido solução de cloreto de cálcio - Código 3.4.29.6, 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 ensaio 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 ensaio.

A cada série de amostra testada é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos utilizados encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

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 ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio 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 ensaio 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 600 mL da amostra homogeneizada e 5.400 mL de água do mar. O extrato foi homogeneizado em misturador industrial por 5 minutos a 5.400 rpm e decantado por 1 hora. Após este período, a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e teve a salinidade ajustada de >100‰ para 37‰, resultando em uma solução-estoque de 319.667 ppm. A partir dela foram preparadas as seguintes soluções-teste: 39; 78; 156; 312; 624; 1.249; 2.497; 4.994; 9.990; 19.979; 39.958 e 79.917 ppm (Fichas em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	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 / solução-teste.....	04
Nº de soluções-teste.....	12 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	35‰
Duração do ensaio.....	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 ensaio realizado com o Fluido solução de cloreto de cálcio - Código 3.4.29.6 foi de 1.249 ppm, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 2.497 ppm e o VC (valor crônico) foi de 1.766 ppm. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 89,7% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,61 mg.L⁻¹(IC: 1,55– 1,68 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade medidos no início e final do ensaio nas diferentes soluções-teste encontram-se listados nas fichas em anexo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Transform: NATURAL LOG(Y)

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
Controle	-2.343				
78	-2.343	0.352		1.70	k= 1, v=30
156	-2.343	0.352		1.78	k= 2, v=30
312	-2.343	0.352		1.80	k= 3, v=30
624	-2.322	0.208		1.81	k= 4, v=30
1249	-2.305	0.087		1.82	k= 5, v=30
2497	-1.798	3.485	*	1.83	k= 6, v=30
4994	-1.794	3.520	*	1.83	k= 7, v=30
9990	-1.368	6.516	*	1.83	k= 8, v=30
19979	-0.236	14.498	*	1.83	k= 9, v=30

s = 0.201

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 soluções-teste do Fluido solução de cloreto de cálcio - Código 3.4.29.6.

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	87	13	2.497*	80	20
	90	10		87	13
	92	08		83	17
	90	10		83	17
39	90	10	4.994*	84	16
	92	08		86	14
	90	10		81	19
	88	12		82	18
78	89	11	9.990*	70	30
	92	08		84	16
	90	10		77	23
	92	08		62	38
156	92	08	19.979*	23	77
	91	09		18	82
	89	11		19	81
	88	12		24	76
312	91	09	39.958*	0	100
	93	07		0	100
	88	12		0	100
	90	10		0	100
624	88	12	79.917*	0	100
	89	11		0	100
	93	07		0	100
	90	10		0	100
1.249	89	11			
	91	09			
	90	10			
	90	10			

* 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 - CRBio-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 – 32963/02
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 – 38219/02 P
Gabrielle A. Correa da Rocha – CRBio-2 – 42.496/02 P
Viviane Euzébio Luiz - CRBio-2 – 42.535/02 P

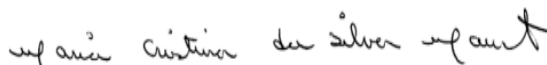
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat



Rio de Janeiro, 26 de julho de 2005.