

Relatório Final
RL5373-05LYC
14 de Outubro de 2005

Título do Estudo

Teste de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus*
para o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05**

Patrocinador

PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.
Av. Hum /Quadra 7 - Ilha do Fundão – PDP/TEP
Rio de Janeiro – RJ.

Laboratório executor

TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.
R. Fábria, 59 - 05051-030.
São Paulo, S.P.
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO	3
RESUMO/ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
1. Dados da substância-teste	5
2. Dados dos organismos-teste	5
3. Condições de teste	5
4. Aclimação e controle de sensibilidade	6
5. Procedimentos	6
6. Análises estatísticas	7
RESULTADOS.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
TABELA	
1. Resultados de toxicidade e análises físicas e químicas	10

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05**, requerido pela empresa **PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.**, foi conduzido dentro dos preceitos estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à Rua Fábria, 59-São Paulo – SP.

MARIA FERNANDA ROMANELLI
Bióloga (MSc)
CRB 35816/01-D

____/____/____

PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.
Patrocinador

____/____/____

RL5373-05LYC

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05** para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), verificando a ocorrência de retardamento no desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas pluteus. Foi preparada uma mistura 1:9 do fluido com água marinha e a fase de sólidos suspensos (FSS) foi utilizada para preparar as seguintes concentrações da amostra: 320 ppm; 1600 ppm; 8000 ppm; 40000 ppm; 200000 ppm. Três réplicas com cerca de 300 ovos recém-fecundados cada foram expostas por 24 horas a um controle com água marinha e a cada concentração de FSS. Após o período de exposição, foi observado que as concentrações superiores a 320,0 ppm FSS exerceram efeitos tóxicos significativos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em CENO 320,0 ppm FSS, a concentração de efeito observado (CEO) em 1600 ppm FSS e o valor crônico (VC) em 715,5 ppm FSS. Adicionalmente, a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) foi estimada em 71688 ppm FSS, com intervalo de 95% de confiança de 63784 a 80745 ppm FSS.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the chronic toxicity of the product **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05** to embryo-larval development of sea urchin (*Lytechinus variegatus*). A 1:9 fluid to seawater mixture was prepared and the suspended particulate phase (SPP) solution was diluted to the following concentrations: 320.0 ppm; 1600 ppm; 8000 ppm; 40000 ppm; 200000 ppm. Three groups of 300 eggs newly fertilized were exposed during 24 hours to control (synthetic seawater) and each SPP concentration. After the exposure period, concentrations higher than 320.0 ppm SPP showed chronic toxicity to sea urchin, when compared to the control. Therefore, under the test conditions, the no observed effect concentration (NOEC) was estimated in 320.0 ppm SPP, the lowest observed effect concentration (LOEC) was 1600 ppm SPP, and the chronic value (CV) was 715.5 ppm SPP. Furthermore, the median inhibition concentration (24-h IC50) was estimated in 71688 ppm SPP, with 95% confidence limits of 63784 to 80745 ppm SPP.

RL5373-05LYC

INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05** para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), com base no grau de desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas. Após o período de 24 a 28 horas, os ovos recém-fecundados devem se desenvolver até o estágio de larva pluteus, a menos que o produto exerça efeitos tóxicos durante este período de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada segue a Norma Técnica CETESB L5.250 (CETESB, 1999).

1. Dados da substância-teste

Nome comercial: FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05

Protocolo nº: 5373/2005.

Data de entrada: 26/08/2005.

Acondicionamento: frasco plástico, sob refrigeração.

Estado Físico: líquido.

2. Dados dos organismos-teste

Espécie: *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Idade: ovos fecundados em laboratório, utilizados até 30 minutos após a fecundação.

3. Condições de teste

Data de início: 13/09/2005.

Data de término: 14/09/2005.

Temperatura média da água: $24,5 \pm 0,0$ °C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

RL5373-05LYC

4. Aclimação e controle de sensibilidade

Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas de isopor, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas plásticas contendo água marinha sintética e aeração intensa. A água marinha foi preparada a partir de sal comercial marca Coral Reef Red Sea Salt ®, com salinidade entre 32 e 35 ‰.

Os gametas masculinos e femininos foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5M na região perioral dos animais adultos, conforme metodologia descrita em CETESB (1999). A fecundação foi feita “in vitro” e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação.

Simultaneamente ao teste com a amostra, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam, utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CI50; 24h média de 0,100 mg Zn/L, com limites de controle (média \pm 2.desvios padrão) de 0,049 a 0,151 mg Zn/L.

5. Procedimentos

Os procedimentos utilizados para o preparo das diluições de teste seguiram a metodologia padronizada pela EPA para testes com fluido de perfuração, do qual se prepara uma diluição 1:9 com água marinha e se expõem os organismos a diluições da fase de sólidos suspensos (FSS) da mistura (USEPA, 1993).

A amostra foi homogeneizada com agitador industrial por 30 minutos. Uma alíquota de 25 mL foi retirada, diluída com 225 mL de água marinha sintética (diluição 1:9) e o pH foi ajustado para \pm 0,2 unidades do pH da água de diluição. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos e, em seguida, mantida em repouso para decantação por uma hora. A fase de sólidos suspensos (FSS) obtida foi cuidadosamente retirada, o pH foi ajustado para $7,8 \pm 0,1$ e as seguintes soluções-teste foram

RL5373-05LYC

preparadas: 320,0 ppm FSS; 1600 ppm FSS; 8000 ppm FSS; 40000 ppm FSS; 200000 ppm FSS.

As soluções-teste foram transferidas para tubos de ensaio, em alíquotas de 10 mL, sendo preparadas três réplicas para cada concentração e seis para o controle com água de diluição. Uma réplica extra de algumas concentrações, com 20 mL de solução, foi preparada para realização das análises físico-químicas no final do teste. Com um micro-pipetador, um volume equivalente a 300 ovos foi transferido para cada tubo de ensaio.

Após 24 horas de incubação, um dos tubos do controle foi retirado e o estágio de desenvolvimento de 50 embriões foi avaliado. O teste foi encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido (CETESB, 1999).

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5 mL de formol tamponado. Uma sub-amostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgwick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus normais e anormais em cada réplica e concentração.

No início e no final do teste foram realizadas análises de pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água de diluição (controle) e de três concentrações da amostra.

6. Análises estatísticas

O grau de desenvolvimento embrio-larval observado no controle e nas soluções-teste foi analisado para obtenção das seguintes estimativas:

- . Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO), respectivamente a maior concentração do produto que não causa efeitos significativos no crescimento dos organismos e a menor concentração que causa efeitos significativos, estimados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk

RL5373-05LYC

(USEPA, 1994), do teste de Bartlett para homogeneidade de variância (USEPA, 1994) e do teste de Williams (Gelber et al, 1985; Williams, 1971, 1972). A partir da média geométrica entre CENO e CEO, foi obtido o valor crônico (VC).

- . Concentração de inibição mediana (CI50; 24h - concentração que causa inibição no desenvolvimento de 50% dos organismos após 24 horas de exposição) e intervalo de 95% de confiança, estimados através do método de interpolação linear (USEPA, 1994).

RESULTADOS

O resultado do teste com o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05** está apresentado na Tabela 1, com dados de efeito tóxico e análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (CETESB, 1999).

Após o período de exposição, foi observado um aumento na toxicidade do fluido com o aumento da concentração, sendo que na maior concentração preparada da fase de sólidos suspensos do fluido (2000000 ppm) o desenvolvimento embrionário foi retardado ou inexistente.

A aplicação das análises estatísticas indicou que as concentrações superiores a 320,0 ppm FSS exerceram efeitos tóxicos crônicos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Assim, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 320,0 ppm FSS, a concentração de efeito observado (CEO) em 1600 ppm FSS e o valor crônico (VC) em 715,5 ppm FSS.

A aplicação de outra metodologia de análise estatística indicou que a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) do fluido pode ser estimada em 71688 ppm FSS, com intervalo de 95% de confiança de 63784 a 80745 ppm FSS.

RL5373-05LYC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Método de ensaio. **Norma Técnica L5.250**. São Paulo, CETESB, 22p., 1999.
- Gelber, R.D.; Lavin, P.T.; Mehta, C.R.; Schoenfeld, D.A. Statistical analysis. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, Hemisphere Publ. Co., p. 110-23, 1985.
- USEPA 40 CFR Part 435 – Oil and gas extraction point source category, Subpart A – Offshore Subcategory, Appendix 2 – Drilling fluids toxicity test. **Federal Register**, 58 FR 12504, 1993.
- USEPA **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. 2. ed., EPA-600/4-91/003. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 483 p., 1994.
- Williams, D.A. A test for differences between treatment means when several doses levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v. 27, p. 103-17, 1971.
- Williams, D.A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. **Biometrics**, v. 28, p.519-31, 1972.

Tabela 1 – Resultados de toxicidade e análises físicas e químicas (média ± desvio padrão) obtidas no teste de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus* para o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR CARB - CÓD. 70-05**, após o período de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH	Salinidade (‰)	Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)
Controle	18	8,1 ± 0,1	34 ± 0	5,4 ± 0,3
320,0 ppm FSS	20	8,2 ± 0,2	36 ± 0	5,5 ± 0,6
1600 ppm FSS	33	8,2 ± 0,2	36 ± 0	5,5 ± 0,6
8000 ppm FSS	45	N.A.	N.A.	N.A.
40000 ppm FSS	49	8,2 ± 0,2	36 ± 0	5,3 ± 0,6
200000 ppm FSS	100	N.A.	N.A.	N.A.

FSS: Fase de sólidos suspensos.

N.A.: Não analisado.

RL5373-05LYC