

II.3.H – Ensaio toxicológico com fluido de perfuração



**ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO COM O FLUIDO
DE PEPRFURAÇÃO BR-MUL (CÓDIGO 1.1.7)
UTILIZANDO *Lytechinus variegatus*
(ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**



Av. Carlos Chagas Filho, 791
Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
Cidade Universitária // Ilha do Fundão
CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
55 (21) 3867 5851 // 55 (21) 3525 2466
Email: labtox@labtox.com.br
<http://www.labtox.com.br>

SOLICITANTE:

PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS
Avenida Elias Agostinho, 665
Imbetiba - Macaé - RJ
CEP: 27913-350

Técnico solicitante: Hélio Gama
e-mail: heligama@petrobras.com.br

EXECUTADO POR:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. Carlos Chagas Filho, 791 - Pólo Bio-Rio - Laboratório 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão CEP: 21.941-904
Tel: (21) 3867-5651 / 3525-2466 / 3525-2442
e-mail: labtox@labtox.com.br

Laudo 7547 LVC – Rev 00

Rio de Janeiro
Julho/2011

LAUDO DE TOXICIDADE

DADOS DO ENSAIO

Avaliação solicitada: Ensaio embrionarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: Crônico de curta duração Tempo de exposição: 24 a 28 horas

Resposta do ensaio: Efeito no desenvolvimento embrionarval (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

VALIDADE DO ENSAIO

Desenvolvimento embrionarval no controle: $\geq 80\%$

Sensibilidade do lote de organismos utilizados, à substância de referência, dentro da faixa estabelecida pelo Labtox

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade: $CI_{50}(I)$: 0,85 - 2,22 mg.L⁻¹(01/07/2011)

DADOS DA AMOSTRA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de perfuração BR-MUL
 Código: 1.1.7
 Data: 31/05/2011

Código de entrada no Labtox: L754711 Data de entrada: 06/06/2011

Data de início do ensaio: 19/07/2011 Data de término: 20/07/2011

RESULTADOS	
CENO(I) 3.906 ppm da FPS	CEO(I) 7.812 ppm da FPS
VC(I) 5.523 ppm da FPS	
Controle: 82,8 % de pluteus	
Ensaio com DSS (19/07/2011): 1,63 mg.L ⁻¹ (IC: 1,48 – 1,74 mg.L ⁻¹)	

FPS: Fração Particulada Suspensa IC: Intervalo de confiança



Av. Carlos Chagas Filho, 791
 Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
 Cidade Universitária // Ilha do Fundão
 CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
 55 (21) 3867 5851 // 55 (21) 3525 2466
 Email: labtox@labtox.com.br
 http://www.labtox.com.br

1 – OBJETIVO

Este ensaio teve como objetivo determinar a toxicidade crônica de curta duração da amostra, sobre os embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.



Av. Carlos Chagas Filho, 791
Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
Cidade Universitária // Ilha do Fundão
CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
55 (21) 3867 5851 // 55 (21) 3525 2466
Email: labtox@labtox.com.br
<http://www.labtox.com.br>

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação à *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em NBR 15.350 (ABNT, 2006), com adaptações. O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições da FPS, avaliando-se a solução-teste que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O valor de CENO(I) (maior concentração nominal da amostra no início do ensaio que não causa efeito significativamente diferente do controle) e CEO(I) (menor concentração nominal da amostra no início do ensaio que causa efeito significativamente diferente do controle) foi obtido através do teste de Williams utilizando-se o programa estatístico TOXSTAT versão 3.3 (Gulley *et al.*, 1991).

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC(I) (valor crônico inicial), que representa a média geométrica de CENO(I) e CEO(I).

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi mantida em temperatura inferior a 10° C até a realização do ensaio. O preparo da fração particulada suspensa (FPS), na proporção de 1:9, com água do mar, foi realizado com base na metodologia descrita em NBR 15.469 (ABNT, 2007). A partir da FPS (solução-estoque de 1.000.000 ppm), foram preparadas as seguintes soluções-teste: 3.906; 7.812; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm da FPS.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	crônico
Temperatura de incubação.....	25 ± 1° C
Fotoperíodo.....	12h luz/12h 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.....	09 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Água de diluição:.....	Salinidade: 36 ‰.....OD: 6,90 mg.L ⁻¹pH: 8,11
Solução-estoque:.....	Salinidade: 36 ‰.....OD: 7,62 mg.L ⁻¹pH: 7,18
Salinidade das soluções-teste.....	36 ‰
pH das soluções-teste:.....	7,18 a 8,11
Oxigênio dissolvido das soluções-teste.....	6,90 a 7,98 mg.L ⁻¹
Duração do ensaio.....	25 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embriolarval ou anomalias
Expressão do resultado.....	CENO(I), CEO(I) e VC(I)
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 de contagem e o percentual de pluteus normais, obtidos no controle e nas diferentes soluções-teste, são apresentados na tabela I.

Os valores de oxigênio dissolvido (OD), pH e salinidade da água de diluição e da solução-estoque (FPS), medidos no início do ensaio, bem como os valores máximos e mínimos destes parâmetros medidos nas soluções-teste, no início e final do ensaio, encontram-se na lista de resumo das condições de ensaio.



Laboratório de Análise Ambiental

Av. Carlos Chagas Filho, 791

Pólo Bio-Rio // Laboratório 4

Cidade Universitária // Ilha do Fundão

CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ

55 (21) 3867 5851 // 55 (21) 3525 2466

Email: labtox@labtox.com.br

http://www.labtox.com.br

Tabela I: Número de pluteus normais de *L. variegatus* por réplica e percentual de pluteus normais obtido no controle e nas diferentes soluções-teste.

Solução-teste (ppm FPS)	Pluteus Normais		Solução-teste (ppm FPS)	Pluteus Normais	
	Número por réplica	% por solução-teste		Número por réplica	% por solução-teste
Controle	85	82,8	62.500*	50	58,2
	88			57	
	86			68	
	72			58	
3.906	85	84,8	125.000*	0	0,0
	80			0	
	88			0	
	86			0	
7.812*	75	76,0	250.000*	0	0,0
	76			0	
	76			0	
	77			0	
15.625*	78	77,2	500.000*	0	0,0
	72			0	
	78			0	
	81			0	
31.250*	67	66,5	1.000.000*	0	0,0
	63			0	
	66			0	
	70			0	

* Diferença significativa em relação ao controle.

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	0.148				
3.906	0.153	0.177		1.73	k= 1, v=18
7.812	0.234	3.049	*	1.82	k= 2, v=18
15.625	0.234	3.049	*	1.85	k= 3, v=18
31.250	0.335	6.629	*	1.86	k= 4, v=18
62.500	0.418	9.546	*	1.87	k= 5, v=18

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



Laboratório de Análise Ambiental

Av. Carlos Chagas Filho, 791

Pólo Bio-Rio // Laboratório 4

Cidade Universitária // Ilha do Fundão

CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ

55 (21) 3867 5851 // 55 (21) 3525 2466

Email: labtox@labtox.com.br

http://www.labtox.com.br

GARANTIA DOS RESULTADOS

Os dados apresentados neste laudo são confidenciais e referem-se unicamente aos resultados obtidos no ensaio com a amostra acima citada. Os dados brutos encontram-se à disposição da Empresa solicitante no Labtox.

Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.



Av. Carlos Chagas Filho, 791
Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
Cidade Universitária // Ilha do Fundão
CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
55 (21) 3867 5851 // 55 (21) 3525 2466
Email: labtox@labtox.com.br
<http://www.labtox.com.br>

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2006. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata, Echinoidea*). NBR 15.350, 17 p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2007. Ecotoxicologia Aquática – Preservação e preparo de amostras. NBR 15.469, 7p.

Gulley,D.D.; Boelter,A.M.; Bergman,H.L. 1991. “*TOXSTAT Realease 3.3*”, Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

Responsável Técnico:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat
CRBio-2 - 12.671/02
Diretora

Rio de Janeiro, 20 de julho de 2011.

**ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO COM O FLUIDO
DE PEPRFURAÇÃO BR-MUL (CÓDIGO 1.1.7)
UTILIZANDO *Mysidopsis juniae*
(CRUSTACEA-MYSIDACEA)**



Laboratório de Análise Ambiental

Av. Carlos Chagas Filho, 791
Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
Cidade Universitária // Ilha do Fundão
CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
55 (21) 3867 5651 // 55 (21) 3525 2466
Email: labtox@labtox.com.br
<http://www.labtox.com.br>

SOLICITANTE:

PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS
Avenida Elias Agostinho, 665
Imbetiba - Macaé - RJ
CEP: 27913-350

Técnico solicitante: Hélio Gama
e-mail: heligama@petrobras.com.br

EXECUTADO POR:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. Carlos Chagas Filho, 791 - Pólo Bio-Rio - Laboratório 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão CEP: 21.941-904
Tel: (21) 3867-5651 / 3525-2466 / 3525-2442
e-mail: labtox@labtox.com.br

Laudo 7547 MJA - Rev 00

Rio de Janeiro
Julho/2011

LAUDO DE TOXICIDADE

DADOS DO ENSAIO

Avaliação solicitada: Ensaio ecotoxicológico com microcrustáceo misidáceo

Organismo-teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de ensaio: Agudo

Tempo de exposição: 96 horas

Resposta do ensaio: Efeitos sobre a sobrevivência

VALIDADE DO ENSAIO

Sobrevivência dos organismos no controle: $\geq 90\%$

Sensibilidade dos organismos do cultivo, à substância de referência, dentro da faixa estabelecida pelo Labtox

Substância de referência: Zinco (Sulfato de zinco heptahidratado)

Periodicidade dos ensaios com a substância de referência: mensal

Faixa de sensibilidade: CL(I)50;96h: 0,20 – 0,32 mg.L⁻¹ (01/07/2011)

DADOS DA AMOSTRA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de perfuração BR-MUL

Código: 1.1.7

Data: 31/05/2011

Código de entrada no Labtox: L754711 Data de entrada: 06/06/2011

Data de início do ensaio: 08/07/2011 Data de término: 12/07/2011

RESULTADOS
CL(I)50;96h: 36.254,04 ppm da FPS
Intervalo de Confiança (IC): 29.314,44 – 44.836,46 ppm da FPS
Sobrevivência no controle: 100 %
Ensaio com zinco (04/07/2011): 0,25 mg.L ⁻¹ (IC: 0,22– 0,28 mg.L ⁻¹)

FPS: Fração particulada suspensa.



Av. Carlos Chagas Filho, 791

Pólo Bio-Rio // Laboratório 4

Cidade Universitária // Ilha do Fundão

CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ

55 (21) 3867 5651 // 55 (21) 3525 2466

Email: labtox@labtox.com.br

http://www.labtox.com.br

1 – OBJETIVO

Este ensaio teve como objetivo determinar a toxicidade aguda da amostra, sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.



Av. Carlos Chagas Filho, 791
Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
Cidade Universitária // Ilha do Fundão
CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
55 (21) 3867 5651 // 55 (21) 3525 2466
Email: labtox@labtox.com.br
<http://www.labtox.com.br>

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em NBR 15.308 (ABNT, 2005).

Jovens de *M. juniae* foram expostos a diferentes diluições da FPS da amostra, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do ensaio a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi mantida em temperatura inferior a 10°C até a realização do ensaio. O preparo da fração particulada suspensa (FPS), na proporção de 1:9, com água do mar, foi realizado segundo a metodologia descrita em NBR 15.469 (ABNT, 2007). A partir da FPS (solução-estoque de 1.000.000 ppm), foram preparadas as seguintes soluções-teste: 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm da FPS

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio:	agudo
Temperatura de incubação:	25 ± 1,0 °C
Fotoperíodo:	12 h luz/12 h escuro
Frasco teste:	béquer de 1000 mL
Volume de solução-teste:	900 mL
Origem dos organismos:	cultivo Labtox
Idade dos organismos:	5 a 8 dias
Nº de organismos / frasco-teste:	10
Nº de réplicas / solução-teste:.....	3
Nº de soluções-teste:	6 + 1 controle *
Alimentação:	20 náuplios de <i>Artemia</i> sp. recém eclodidos/misidáceo/dia
Água de diluição:	água do mar natural filtrada
Água de diluição:	Salinidade: 36 ‰.....OD: 7,46 mg.L ⁻¹pH: 8,12
Solução-estoque:.....	Salinidade: 37 ‰.....OD: 8,13 mg.L ⁻¹pH: 8,48
Salinidade das soluções-teste:	36 a 37 ‰
pH das soluções-teste:.....	8,00 a 8,48
Oxigênio dissolvido das soluções-teste:.....	7,39 a 8,13mg.L ⁻¹
Duração do ensaio:	96 horas
Resposta:	mortalidade
Valor medido:	CL(I)50; 96h (diluição inicial letal a 50% dos organismos)
Método de cálculo:	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

* Controle: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

3 – RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas, nas diferentes soluções-teste.

Os valores de oxigênio dissolvido (OD), pH e salinidade da água de diluição e da solução-estoque (FPS), medidos no início do ensaio, bem como os valores máximos e mínimos destes parâmetros medidos nas soluções-teste, no início e final do ensaio, encontram-se na lista de resumo das condições de ensaio.



Av. Carlos Chagas Filho, 791
 Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
 Cidade Universitária // Ilha do Fundão
 CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
 55 (21) 3867 5651 // 55 (21) 3525 2466
 Email: labtox@labtox.com.br
 http://www.labtox.com.br

Tabela I - Resultados de sobrevivência, durante a leitura realizada a cada 24 horas, e do percentual de mortalidade de misidáceos, obtido no controle e nas diferentes soluções-teste.

Solução-teste (ppm FPS)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	10	0,0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
31.250	10	10	9	7	7	40,0
	10	10	8	7	7	
	10	7	5	4	4	
62.500	10	6	4	2	0	86,7
	10	7	4	1	1	
	10	9	5	3	3	
125.000	10	7	4	2	1	90,0
	10	6	3	2	2	
	10	7	4	1	0	
250.000	10	7	4	1	1	96,7
	10	7	4	1	0	
	10	6	2	0	0	
500.000	10	6	2	0	0	100
	10	7	3	0	0	
	10	8	3	0	0	
1.000.000	10	5	2	0	0	100
	10	6	2	0	0	
	10	8	5	0	0	



Laboratório de Análise Ambiental

Av. Carlos Chagas Filho, 791

Pólo Bio-Rio // Laboratório 4

Cidade Universitária // Ilha do Fundão

CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ

55 (21) 3867 5651 // 55 (21) 3525 2466

Email: labtox@labtox.com.br

http://www.labtox.com.br

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Test Type: Agudo Duration: 96 h Concentration Unit: ppm

Raw Data:

Concentration:	31.250	62.500	125.000	250.000	500.000	1.000.000
Number Exposed:	30	30	30	30	30	30
Mortalities:	12	26	27	29	30	30
SPEARMAN-KARBER TRIM:	40.00%					

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 36.254,04

95% Lower Confidence: 29.314,44

95% Upper Confidence: 44.836,46

GARANTIA DOS RESULTADOS

Os dados apresentados nesse laudo são confidenciais e referem-se unicamente aos resultados obtidos no(s) ensaio(s) com a(s) amostra(s) acima citada(s). Os dados brutos encontram-se à disposição da Empresa solicitante no Labtox.

Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.



Av. Carlos Chagas Filho, 791
Pólo Bio-Rio // Laboratório 4
Cidade Universitária // Ilha do Fundão
CEP 21941-904 // Rio de Janeiro // RJ
55 (21) 3867 5651 // 55 (21) 3525 2466
Email: labtox@labtox.com.br
<http://www.labtox.com.br>

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2005. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de Ensaio com misidáceos (Crustacea). NBR 15.308, 17p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2007. Ecotoxicologia Aquática – Preservação e preparo de amostras. NBR 15.469, 7p.

Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.

Responsável Técnico:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat
CRBio-2 - 12.671/02
Diretora

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2011.