

**TESTE DE TOXICIDADE DO FLUIDO DE COMPLETAÇÃO - SOLUÇÃO  
SALINA DE NaCl 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@biorio.org.br](mailto:labtox@biorio.org.br)  
CEP: 21941-590

Teste 1050LVC

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 dos embriões (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Responsável pelo preparo da amostra: PETROBRAS

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de completação solução salina de NaCl

Código 3.4.27

Data: 19/05/2003

Código de entrada no Labtox: L105003

<b>RESULTADO DEFINITIVO</b>	
<b>TESTE EMBRIOLÓGICO</b>	
CENO 488 ppm	CEO 976 ppm
VC = 690 ppm	
Controle: 81,5 % de pluteus	
DSS: CE50 1,31 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 1,24 – 1,37 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC = Intervalo de confiança



## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 18 de junho de 2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do fluido de completação solução salina NaCl, sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

## 2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), modificada.

Ovos de *L. variegatus* foram expostos a diferentes concentrações do fluido, avaliando-se a concentração 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 homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de “Chi-square” e “Bartlett”, respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de “Williams”.

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO e indica a concentração máxima aceitável da amostra.

## RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....estático sem renovação  
Temperatura de incubação..... $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$   
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.....  $\pm 300$  ovos  
Nº de réplicas / diluição.....04  
Nº de diluições.....12 + 1 controle\*  
Alimentação.....sem alimentação  
Água de diluição.....água do mar natural filtrada (0,45  $\mu\text{m}$ )  
Salinidade da água..... $34 \pm 1 \text{‰}$   
Duração do teste.....25 horas  
Resposta.....embriões mal formados ou com o desenvolvimento retardado  
Expressão do resultado.....CENO, CEO e VC  
Método de cálculo.....Toxstat (Gulley *et al.*, 1991)

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



## PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C, até a hora da realização dos testes 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. Preparou-se, então, 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. Após 1 hora a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e a partir desta solução foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 488; 976; 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (fichas em anexo).

## VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- Os parâmetros de qualidade da água estiverem dentro dos limites estabelecidos para a espécie;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox (0,83 – 3,20 mg.L<sup>-1</sup>).

## 3 - RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus 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 de completação foi de 488 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 976 ppm e o VC (valor crônico) de 690 ppm. O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 81,5 % e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,31mg.L<sup>-1</sup> (IC = 1,24 – 1,37mg.L<sup>-1</sup>).

L1050LVC

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste encontram-se listados nas fichas em anexo e estiveram dentro dos limites aceitáveis para a espécie.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* obtidos nas diferentes diluições do fluido de completação solução salina de NaCl no teste conduzido em 18/06/2003.

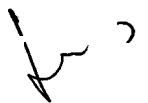
Concentração (ppm)	Número de pluteus		Concentração (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
<b>Controle</b>	80	20	<b>31.250*</b>	0	100
	83	17		0	100
	80	20		0	100
	83	17		0	100
<b>488</b>	80	20	<b>62.500*</b>	0	100
	81	19		0	100
	81	19		0	100
	82	18		0	100
<b>976*</b>	77	23	<b>125.000*</b>	0	100
	77	23		0	100
	54	46		0	100
	70	30		0	100
<b>1.953*</b>	25	75	<b>250.000*</b>	0	100
	29	71		0	100
	32	68		0	100
	14	86		0	100
<b>3.906*</b>	34	66	<b>500.000*</b>	0	100
	30	70		0	100
	25	75		0	100
	46	54		0	100
<b>7.813*</b>	10	90	<b>1.000.000*</b>	0	100
	09	91		0	100
	11	89		0	100
	08	92		0	100
<b>15.625*</b>	0	100			
	0	100			
	0	100			
	0	100			

\* Estatisticamente diferente do controle.



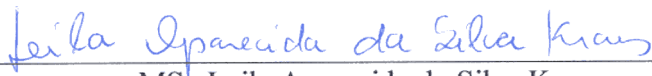
#### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- 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.

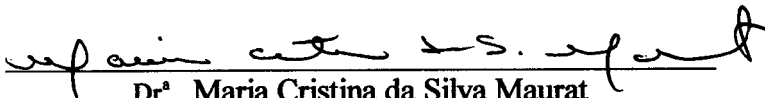


**EQUIPE TÉCNICA**

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2003.

  
\_\_\_\_\_  
MSc Leila Aparecida da Silva Kraus  
Diretora Administrativa e Financeira  
CRB-2 - 12156/02

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Marcia Vieira/Reynier  
Diretora Científica  
CRB-2 - 07135/02

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina da Silva Maurat  
Diretora Comercial  
CRB-2 - 12671/02

**BIÓLOGAS:**

Carina C. Gomes Machado  
CRB-2 – 32963/02

Desideria Lima Calleja  
CRB-2 - 38219/02 P

**AUXILIAR DE ANÁLISE:**

Viviane Euzébio Luiz



## **A N E X O S**

10501vc

file: T10501vc

Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 1 OF 2

GROUP	IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1	Controle	4	0.185	0.444	0.444
2	488	4	0.190	0.451	0.451
3	976	4	0.305	0.581	0.581
4	1953	4	0.750	1.052	1.002
5	3906	4	0.663	0.953	1.002
6	7813	4	0.905	1.258	1.258

10501vc

file: T10501vc

Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
Controle	0.444				
488	0.451	0.128		1.73	k= 1, v=18
976	0.581	2.632	*	1.82	k= 2, v=18
1953	1.002	10.718	*	1.85	k= 3, v=18
3906	1.002	10.718	*	1.86	k= 4, v=18
7813	1.258	15.630	*	1.87	k= 5, v=18

= 0.074

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



TESTE N° 1050 Data: 18/06/03 Organismo-teste: L. varians  
 Tipo de teste: ( ) fecundação (  ) embriológico

Amostra: Fluido de completacão salina de NaCl cond. 3.4.27  
 Cód. de entrada no laboratório: L 105003  
 Data de entrada: 21/05/03 Data do preparo da amostra: 19/05/03

DADOS DO SOBRENADANTE

Salinidade: 35 ‰ pH: 8,05 OD: 6,21 mg/L

AJUSTE DA SALINIDADE ( ) SIM (  ) NÃO

Volume <sup>1</sup> de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
<u>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> ‰	<u>—</u> ppm

SALMOURA

Método de obtenção: \_\_\_\_\_ Salinidade: \_\_\_\_\_ ‰ pH: —

AJUSTE DO pH ( ) SIM (  ) NÃO

Volume da amostra: <u>—</u> mL	Adição: _____ $\mu$ L de HCl	pH final: <u>—</u>
	_____ $\mu$ L de NaOH	pH final: <u>—</u>

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Arçua dos Reis Data: 03/06/03  
 Data de filtração: 17/06/03 Aeração: Data 18/06/03  
 Salinidade: 35 ‰ pH: 7,86 OD: 5,79 mg/L

TESTE N° 3050

Amostra: Fluido de combustão solução salina de NaCl cod. 3.4.27

Solução-estoque: 1000.000 ppm Vol. final a ser preparado: 100 mL

Concentração (ppm)	Vol. Amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
0.0	—	100	1 - 9	10
488	0,049	99,951	11 - 14	15
976	0,098	99,902	16 - 19	20
1953	0,195	99,805	21 - 24	25
3906	0,39	99,61	26 - 29	30
7813	0,78	99,22	31 - 34	35
15625	1,56	98,44	36 - 39	40
31250	3,12	96,88	41 - 44	45
62500	6,25	93,75	46 - 49	50
125000	12,5	87,5	51 - 54	55
250000	25	75	56 - 59	60
500000	50	50	61 - 64	65
1000.000	100	—	66 - 69	70

OBS:

TESTE Nº 1050

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Temperatura: Sala: 25±1 °C Incubadora: 25±0,5 °C

Concentração (ppm)	Início			Término		
	OD mg/L	pH	S ‰	OD mg/L	pH	S ‰
00	5,79	7,86	35	5,25	8,04	35
488	6,05	7,61	35	5,47	7,77	35
976	5,76	7,65	35	5,34	7,81	35
1953	5,98	7,68	35	5,55	7,82	35
3906	6,25	7,72	35	5,48	7,87	35
7813	6,10	7,74	35	5,38	7,83	35
15625	6,03	7,75	35	5,21	7,95	35
31250	6,13	8,16	35	5,15	7,95	35
62500	5,94	8,01	35	5,05	7,87	35
125000	6,15	8,02	35	5,43	7,98	35
250.000	6,22	8,10	35	5,90	8,00	35
500.000	6,39	8,12	35	5,01	8,03	35
1.000.000	6,21	8,05	35	5,81	8,07	35