

L1441LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS  
(CÓD. 3.4.28.1 – SOLUÇÃO DE KCl) 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](mailto:labtox@labtox.com.br)  
CEP: 21941-590

Teste 1441 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 embriológico

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)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Aquoso Isento de Sólidos

Código: 3.4.28.1 – Solução de KCl

Data: 17/06/2004

Código de entrada no Labtox: L144104

Data de entrada no Labtox: 21/06/2004

RESULTADOS	
CENO 488 ppm	CEO 977 ppm
VC = 690,49 ppm	
Controle: 93,5 % de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 0,95 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 0,92 – 0,99 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC: Intervalo de confiança



## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 08 de julho de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Aquoso Isento de Sólidos (código 3.4.28.1 – Solução de KCl) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

## 2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999), com adaptações. Este 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 embriões desenvolvidos 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 e indica a concentração máxima aceitável da amostra.

## 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 coleta dos 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 da água.....	34 ± 1 ‰
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 <i>et al.</i> , 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 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 a partir dela (solução-estoque de 1.000.000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 488; 977; 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).

b

## VALIDADE DO TESTE

O teste EMBRIOLÓGICO é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 0,83 a 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 com o Fluido Aquoso Isento de Sólidos (código 3.4.28.1 – Solução de KCl) foi de 488 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 977 ppm e o VC (valor crônico) de 690,49 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 93,5 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 0,95 mg.L<sup>-1</sup> (IC = 0,92 – 0,99 mg.L<sup>-1</sup>).

Os valores de oxigênio, 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
Controle	0.065				
488	0.097	0.835		1.78	k= 1, v=12
977	0.363	7.643	*	1.87	k= 2, v=12
1953	0.588	13.424	*	1.90	k= 3, v=12

s = 0.055

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

b

LI44ILVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido aquoso isento de sólidos (cód. 3.4.28.1 – Solução de KCl) no teste conduzido em 08/07/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	96	04	31.250*	0	100
	97	03		0	100
	91	09		0	100
	90	10		0	100
488	92	08	62.500*	0	100
	91	09		0	100
	88	12		0	100
	90	10		0	100
977*	70	30	125.000*	0	100
	51	49		0	100
	63	37		0	100
	71	29		0	100
1.953*	38	62	250.000*	0	100
	48	52		0	100
	40	60		0	100
	39	61		0	100
3.906*	0	100	500.000*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
7.813*	0	100	1.000.000*	0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
	0	100		0	100
15.625*	0	100			
	0	100			
	0	100			
	0	100			

\* Significativamente diferente do controle.

b

#### 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

0

AUXILIAR DE ANÁLISE: Viviane Euzébio Luiz

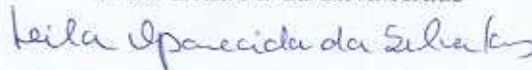
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 19 de julho de 2004.

Data Início: 08 / 07 / 04 Hora: 12:30 Término: 09 / 07 / 04

Organismo-teste: L. variegatus Operador(es): Juiane Custiane

Tipo de teste: ( ) fecundação (  ) embriológico

Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L144104 Salinidade: 35 ‰ pH 7.95

Solução-estoque: 100 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 4.00 mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 4000.000 ppm (mg/L, ‰)

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL

Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —

Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Ajuste do pH: — µL de HCl — µL de NaOH pH final: —

Água de diluição: Lote: 020 Salinidade: 34 ‰ pH: 8.13 OD: 554 mg.L<sup>-1</sup>

Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 40 µL

N° de réplicas por diluição: 5

Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 24 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL			
Diluição	Vol. sol. estoque mL	Tubos n°	
		Leitura	F / Q
<u>0,0</u>	<u>—</u>	<u>1.9</u>	<u>10</u>
<u>488</u>	<u>0,049</u>	<u>96 - 99</u>	<u>100</u>
<u>977</u>	<u>0,098</u>	<u>101 - 104</u>	<u>105</u>
<u>1953</u>	<u>0,195</u>	<u>106 - 109</u>	<u>110</u>
<u>3906</u>	<u>0,391</u>	<u>111 - 114</u>	<u>115</u>
<u>7813</u>	<u>0,78</u>	<u>116 - 119</u>	<u>120</u>
<u>15625</u>	<u>1,56</u>	<u>121 - 124</u>	<u>125</u>
<u>31.250</u>	<u>3,13</u>	<u>126 - 129</u>	<u>130</u>
<u>62.500</u>	<u>6,25</u>	<u>131 - 134</u>	<u>135</u>
<u>125.000</u>	<u>12,5</u>	<u>136 - 139</u>	<u>140</u>
<u>250.000</u>	<u>25</u>	<u>141 - 144</u>	<u>145</u>
<u>500.000</u>	<u>50</u>	<u>146 - 149</u>	<u>150</u>
<u>1000.000</u>	<u>100</u>	<u>151 - 154</u>	<u>155</u>



PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (ppm)	Início			Término		
	S (%)	OD	pH	S (%)	OD	pH
00	34	5,54	8,13	34	5,00	8,14
488	35	5,37	8,13	35	4,99	8,09
977	35	5,23	8,03	35	4,27	8,12
1953	35	5,28	8,08	35	4,83	8,14
3906	35	5,24	8,10	35	4,83	8,04
7813	35	5,18	8,13	35	4,82	8,14
15625	35	5,23	8,09	35	4,72	8,10
31250	35	5,29	8,08	35	4,73	8,04
62500	35	5,23	8,13	35	4,14	8,01
125.000	35	5,48	8,03	35	4,03	8,03
250.000	35	5,27	8,18	35	4,08	7,79
500.000	35	5,66	8,13	35	4,48	8,15
1000.000	35	5,41	<del>8,13</del> 7,95	35	5,15	8,12

OBS: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_