

L1451LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO  
CATIÔNICO (NaCl e KCl) (CÓD. 2.5.5 – FLUIDO BASE ÁGUA) 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 1451 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 de Perfuração Catiônico (NaCl e KCl)

Código: 2.5.5 – Fluido Base Água

Data: Não informada

Código de entrada no Labtox: L145104

Data de entrada no Labtox: 06/07/2004

| RESULTADOS  |                        |
|---|------------------------|
| <b>CENO</b> 125.000 ppm   | <b>CEO</b> 250.000 ppm |
| VC = 176.776 ppm  |                        |
| Controle: 90,3 % de pluteus   |                        |
| DSS: CE(I)50 = 0,99 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 0,96 – 1,01 mg.L <sup>-1</sup> ) |                        |

IC: Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 14 de julho de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de perfuração Catiônico (NaCl e KCl) (Código 2.5.5 – Fluido Base Água) 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 coletados 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.....        | 35 ± 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).

## 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 de Perfuração Catiônico (NaCl e KCl) (código 2.5.5 – Fluido Base Água) foi de 125.000 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 250.000 ppm e o VC (valor crônico) de 176.776 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 90,3% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 0,99 mg.L<sup>-1</sup> (IC = 0,96 – 1,01 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 |
|----------------|-----------------|----------------|-----------|----------------|--------------------|
| 0.0            | 0.085           |                |           |                |                    |
| 977            | 0.085           | 0.641          |           | 1.70           | k= 1, v=30         |
| 1953           | 0.085           | 0.641          |           | 1.78           | k= 2, v=30         |
| 3906           | 0.095           | 0.128          |           | 1.80           | k= 3, v=30         |
| 7813           | 0.095           | 0.128          |           | 1.81           | k= 4, v=30         |
| 15625          | 0.095           | 0.128          |           | 1.82           | k= 5, v=30         |
| 31250          | 0.095           | 0.128          |           | 1.83           | k= 6, v=30         |
| 62500          | 0.095           | 0.128          |           | 1.83           | k= 7, v=30         |
| 125000         | 0.110           | 0.641          |           | 1.83           | k= 8, v=30         |
| 250000         | 0.318           | 11.286         | *         | 1.83           | k= 9, v=30         |

s = 0.028 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido de Perfuração Catiônico (NaCl e KCl) (Cód. 2.5.5 – Fluido Base Água) no teste conduzido em 14/07/2004.

| Diluição (ppm) | Número de pluteus |          | Diluição (ppm) | Número de pluteus |          |
|----------------|-------------------|----------|----------------|-------------------|----------|
|                | Saudáveis         | Afetados |                | Saudáveis         | Afetados |
| Controle       | 90                | 10       | 31.250         | 90                | 10       |
|                | 92                | 08       |                | 92                | 08       |
|                | 89                | 11       |                | 85                | 15       |
|                | 90                | 10       |                | 95                | 05       |
| 488            | 92                | 08       | 62.500         | 90                | 10       |
|                | 89                | 11       |                | 89                | 11       |
|                | 94                | 06       |                | 95                | 05       |
|                | 97                | 03       |                | 92                | 08       |
| 977            | 89                | 11       | 125.000        | 89                | 11       |
|                | 95                | 05       |                | 88                | 12       |
|                | 90                | 10       |                | 90                | 10       |
|                | 96                | 04       |                | 89                | 11       |
| 1.953          | 93                | 07       | 250.000*       | 70                | 30       |
|                | 90                | 10       |                | 69                | 31       |
|                | 94                | 06       |                | 68                | 32       |
|                | 90                | 10       |                | 66                | 34       |
| 3.906          | 85                | 15       | 500.000*       | 0                 | 100      |
|                | 92                | 08       |                | 0                 | 100      |
|                | 88                | 12       |                | 0                 | 100      |
|                | 92                | 08       |                | 0                 | 100      |
| 7.813          | 94                | 06       | 1.000.000*     | 0                 | 100      |
|                | 90                | 10       |                | 0                 | 100      |
|                | 94                | 06       |                | 0                 | 100      |
|                | 86                | 14       |                | 0                 | 100      |
| 15.625         | 89                | 11       |                |                   |          |
|                | 93                | 07       |                |                   |          |
|                | 90                | 10       |                |                   |          |
|                | 89                | 11       |                |                   |          |

\* Significativamente 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.

#### 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

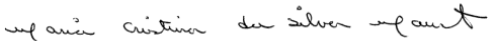

##### BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRB-2 – 32963/02  
Desideria Lima Calleja - CRB-2 – 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE: Viviane Euzébio Luiz

ELABORADO POR:

REVISADO POR:

|   |  |
|---|--|
| Dra. Maria Cristina da S. Maurat<br> | MSc. Leila A. da Silva Kraus<br> |
|---|--|

Rio de Janeiro, 05 de agosto de 2004.