

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO BR MUL HT (CÓDIGO 1.1.8)**  
**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 1297 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 BR MUL HT

Código: 1.1.8 Data: 13/01/2004

Código de entrada no Labtox: L129704

Data de entrada no Labtox: 21/01/2004

RESULTADOS	
CENO 250.000 ppm	CEO 500.000 ppm
VC = 353.553 ppm	
Controle: 92,75 % de pluteus	
DSS: CE(I)50 = 1,60 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 1,56 – 1,64 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC: Intervalo de confiança



## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 05 de fevereiro de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido BR MUL HT (código: 1.1.8) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

## 2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999). 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 "Chi-square" e "Bartlett", respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de "Willians".

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
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*
Alimentação.....	sem alimentação
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).

#### 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 ( $0,83 - 3,20 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

### 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 BR MUL HT (código: 1.1..8) foi de 250.000 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 500.000 ppm e o VC (valor crônico) de 353.553 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 92,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de  $1,60 \text{ mg.L}^{-1}$  (IC =  $1,56 - 1,64 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, nas diferentes diluições, são apresentados nas fichas em anexo.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

T 1297 LVC

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	0.073				
15625	0.079	0.367		1.72	k= 1, v=21
31250	0.079	0.367		1.80	k= 2, v=21
62500	0.080	0.440		1.83	k= 3, v=21
125000	0.084	0.661		1.84	k= 4, v=21
250000	0.084	0.661		1.85	k= 5, v=21
500000	0.145	4.257	*	1.85	k= 6, v=21

s = 0.024

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

L1297LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido BR MUL HT (código: 1.1.8) no teste conduzido em 05/02/2004.

Diluição (ppm)	Número de pluteus		Diluição (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	94	06	31.250	92	08
	90	10		95	05
	90	10		91	09
	97	03		91	09
488	96	04	62.500	91	09
	98	02		92	08
	95	05		95	05
	98	02		90	10
977	90	10	125.000	90	10
	98	02		89	11
	97	03		91	09
	98	02		93	07
1.953	97	03	250.000	92	08
	95	05		92	08
	91	09		92	08
	92	08		94	06
3.906	97	03	500.000*	89	11
	97	03		83	17
	95	05		82	18
	98	02		88	12
7.813	89	11	1.000.000*	0	100
	92	08		0	100
	97	03		0	100
	99	01		0	100
15.625	95	05			
	92	08			
	90	10			
	91	09			

\* 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.

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Laboratório 4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão  
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: [labtox@biorio.org.br](mailto:labtox@biorio.org.br)  
Visite nosso site: [www.labtox.com.br](http://www.labtox.com.br)

10

L1297LVC

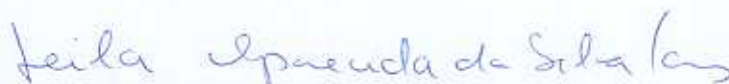
Duke, T.W.; Parrish, P.R.; Montgomery, R.M. Macauley, S.D.; Macauley, J.M.; Cripe, G.M. 1984. Acute toxicity of eight laboratory-prepared generic drilling fluids to mysids (*Mysidopsis bahia*). Gulf Breeze: Environmental Protection Agency. 4p.

Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 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

Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2004.



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

TESTE A297 LVC Data: 05/02/04 Organismo-teste: h. variegatus

Tipo de teste: ( ) fecundação (  ) embriológico Operador: Viviane

Amostra: Fórmula ~~de preparo~~ BR MUL HT  
 Cód. de entrada no laboratório: L 1297 Data de entrada: 23/03/04  
 DADOS DA AMOSTRA: Salinidade: 33 ‰ pH: -  
 Preparo da Solução-estoque: 100 mL (mg) da substância (amostra bruta)  
1000 mL de água de diluição.  
 Concentração final da solução-estoque: 1.000.000 ppm (mg/L, %)

AJUSTE DA SALINIDADE ( ) SIM (  ) NÃO

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
← mL	_____ mL	_____ mL	_____ ‰	_____ ppm
SALMOURA				
Método de obtenção: _____ Salinidade: _____ ‰ pH: _____				

AJUSTE DO pH ( ) SIM (  ) NÃO

Adição: \_\_\_\_\_ µL de HCl pH final: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ µL de NaOH pH final: \_\_\_\_\_

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Angra dos Reis Data: 25/01/04  
 Salinidade: 33 ‰ pH: 8,53 OD: 3,98 mg/L



TESTE 1297 LVC

Solução-estoque: 1.000.000 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	99,95	96-99	100
977	0,098	99,90	101-104	105
1953	0,195	99,80	106-109	110
3906	0,39	99,61	111-114	115
7813	0,78	99,22	116-119	120
15.625	1,56	98,44	121-124	125
31.250	3,13	96,87	126-129	130
62.500	6,25	93,75	131-134	135
125.000	12,5	87,5	136-139	140
250.000	25	75	141-144	145
500.000	50	50	146-149	150
1.000.000	100	—	151-154	155

OBS:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

TESTE 1297 LVC

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

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

Concentração (ppm)	Início			Término		
	S‰	OD	pH	S‰	OD	pH
0,0	33	3,98	8,53	33	5,20	8,68
458	32	4,72	8,42	33	5,79	8,47
977						
1953	33	4,77	8,47	33	5,82	8,50
3906						
7813	33	4,87	8,48	33	5,61	8,54
15625						
31250	33	4,91	8,53	33	5,70	8,48
62500						
125.000	33	5,27	8,57	33	5,29	8,50
250.000						
500.000	33	5,23	8,59	33	5,34	8,49
1000.000	33	5,29	8,63	33	5,60	8,43