

L2359LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR MUL  
(CÓDIGO 1.19) 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

Ensaio 2359 LVC

Rio de Janeiro

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Laboratório 4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão – Rio de Janeiro, RJ  
CEP: 21941-590 – Tel:(21) 3867-5651/ 3867-5501 R: 220 – e-mail: [labtox@labtox.com.br](mailto:labtox@labtox.com.br)  
Visite nosso site: [www.labtox.com.br](http://www.labtox.com.br)

## LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico solicitante: Hélio Gama

Endereço: Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163 - Imboassica - Macaé - RJ

Tel.: (22) 2761-2644/2761-9086

Avaliação solicitada: Ensaio embrionarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

Tempo de exposição: 25h

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

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos: 1,21 – 1,81 mg.L<sup>-1</sup> (31/10/2005)

Resultado do ensaio realizado com DSS em 21/11/2005: 1,54 mg.L<sup>-1</sup> (1,48 – 1,59 mg.L<sup>-1</sup>)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de Perfuração BR MUL

Código: 1.19

Data de preparo: 09/11/2005

Código de entrada no Labtox: L235905      Data de entrada no Labtox: 11/11/2005

Data de início do ensaio: 21/11/2005      Data de término do ensaio: 22/11/2005

Obs<sub>1</sub>: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs<sub>2</sub>: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

| <b>RESULTADOS</b>              |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>CENO</b> 500.000 ppm da FPS | <b>CEO</b> 1.000.000 ppm da FPS |
| <b>VC</b> 707.106 ppm da FPS   |                                 |
| Controle: 87,75 % de pluteus   |                                 |

FPS: Fração particulada suspensa

## 1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 21 de novembro de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de Perfuração BR MUL (Código 1.19) sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

## 2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação à *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), com adaptações. O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes soluções-teste do fluido, avaliando-se a solução-teste que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

A cada série de amostra testada é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos organismos utilizados encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

### 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 larvas pluteus com desenvolvimento normal 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.

## VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox, que é de 1,21 a 1,81 mg.L<sup>-1</sup>.

## PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C até a hora da realização do ensaio e seu preparo foi realizado 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 600 mL da amostra homogeneizada e 5.400 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 seguintes soluções-teste: 488; 976; 1.953; 3.906; 7.812; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm da FPS (Fichas em anexo).

## RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

---

|                                     |                                                          |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Tipo de ensaio.....                 | 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 / solução-teste..... | 04                                                       |
| Nº de soluções-teste.....           | 12 + 1 controle*                                         |
| Água de diluição.....               | água do mar natural filtrada                             |
| Salinidade das soluções-teste.....  | 33 ‰                                                     |
| Duração do ensaio.....              | 25 horas                                                 |
| Resposta.....                       | retardamento no desenvolvimento embrionário ou anomalias |
| 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.

### 3 – RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus normais e mal formados e/ou com atraso no desenvolvimento são apresentados na tabela I.

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido no ensaio realizado com o Fluido de Perfuração BR MUL (Código 1.19) foi de 500.000 ppm da FPS, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 1.000.000 ppm da FPS e o VC (valor crônico) foi de 707.106 ppm da FPS.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 87,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,54mg.L<sup>-1</sup>(IC:1,48–1,59 mg.L<sup>-1</sup>).

Os valores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade medidos no início e final do ensaio nas diferentes soluções-teste 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            | 0.100           |                |           |                |                    |
| 3906           | 0.100           | 1.654          |           | 1.70           | k= 1, v=30         |
| 7812           | 0.100           | 1.654          |           | 1.78           | k= 2, v=30         |
| 15625          | 0.100           | 1.654          |           | 1.80           | k= 3, v=30         |
| 31250          | 0.100           | 1.654          |           | 1.81           | k= 4, v=30         |
| 62500          | 0.100           | 1.654          |           | 1.82           | k= 5, v=30         |
| 125000         | 0.100           | 1.654          |           | 1.83           | k= 6, v=30         |
| 250000         | 0.115           | 0.551          |           | 1.83           | k= 7, v=30         |
| 500000         | 0.120           | 0.184          |           | 1.83           | k= 8, v=30         |
| 1000000        | 1.000           | 64.515         | *         | 1.83           | k= 9, v=30         |

s = 0.019 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* expostos a diferentes soluções-teste do Fluido de Perfuração BR MUL (Código 1.19).

| Solução-teste<br>(ppm da FPS) | Número de pluteus |              | Solução-teste<br>(ppm da FPS) | Número de pluteus |              |
|-------------------------------|-------------------|--------------|-------------------------------|-------------------|--------------|
|                               | Normais           | Mal formados |                               | Normais           | Mal formados |
| Controle                      | 86                | 14           | 31.250                        | 86                | 14           |
|                               | 85                | 15           |                               | 89                | 11           |
|                               | 88                | 12           |                               | 91                | 09           |
|                               | 92                | 08           |                               | 90                | 10           |
| 488                           | 91                | 09           | 62.500                        | 90                | 10           |
|                               | 90                | 10           |                               | 93                | 07           |
|                               | 89                | 11           |                               | 89                | 11           |
|                               | 93                | 07           |                               | 90                | 10           |
| 976                           | 88                | 12           | 125.000                       | 92                | 08           |
|                               | 90                | 10           |                               | 90                | 10           |
|                               | 89                | 11           |                               | 89                | 11           |
|                               | 93                | 07           |                               | 91                | 09           |
| 1.953                         | 89                | 11           | 250.000                       | 87                | 13           |
|                               | 92                | 08           |                               | 90                | 10           |
|                               | 90                | 10           |                               | 89                | 11           |
|                               | 90                | 10           |                               | 88                | 12           |
| 3.906                         | 88                | 12           | 500.000                       | 86                | 14           |
|                               | 93                | 07           |                               | 91                | 09           |
|                               | 90                | 10           |                               | 88                | 12           |
|                               | 91                | 09           |                               | 87                | 13           |
| 7.812                         | 94                | 06           | 1.000.000*                    | 0                 | 100          |
|                               | 90                | 10           |                               | 0                 | 100          |
|                               | 89                | 11           |                               | 0                 | 100          |
|                               | 91                | 09           |                               | 0                 | 100          |
| 15.625                        | 93                | 07           |                               |                   |              |
|                               | 90                | 10           |                               |                   |              |
|                               | 91                | 09           |                               |                   |              |
|                               | 89                | 11           |                               |                   |              |

\*Diferença significativa em relação ao 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:


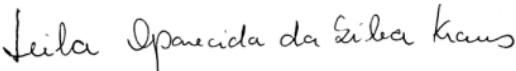
MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRBio-2 - 12156/02  
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02  
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-2 - 12671/02

##### BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 - 32963/02  
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 - 38219/02 P  
Gabriele A. Correa da Rocha - CRBio-2 - 42.496/02 P  
Viviane Euzébio Luiz - CRBio-2 - 42.535/02 P

ELABORADO POR:

REVISADO POR:

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

Rio de Janeiro, 02 de dezembro de 2005.