

L1991LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO CATIÔNICO -  
CÓDIGO 2.12 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 1991 LVC

Rio de Janeiro

## 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 embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

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

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de perfuração Catiônico - Código 2.12

Data de preparo: 08/06/2005

Código de entrada no Labtox: L199105

Data de entrada no Labtox: 10/06/2005

Data de início do ensaio: 30/06/2005

Data de término do ensaio: 01/07/2005

| RESULTADOS  |                       |
|---|-----------------------|
| <b>CENO</b> 7.812 ppm   | <b>CEO</b> 15.625 ppm |
| <b>VC</b> 11.048 ppm  |                       |
| Controle: 92,5 % de pluteus   |                       |
| DSS: CE(I)50: 1,74 mg.L <sup>-1</sup> (IC: 1,69 – 1,79 mg.L <sup>-1</sup> ) |                       |

IC: Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 30 de junho de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de perfuração Catiônico - Código 2.12, 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). 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 0,88 a 2,66 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 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 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 (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.....  | 35 a 40‰   |
| 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 Catiônico - Código 2.12 foi de 7.812 ppm, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 15.625 ppm e o VC (valor crônico) foi de 11.048 ppm. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 92,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,74 mg.L<sup>-1</sup>(IC:1,69 – 1,79 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 |
|----------------|-----------------|----------------|-----------|----------------|--------------------|
| Controle       | 0.075           |                |           |                |                    |
| 488            | 0.080           | 0.260          |           | 1.72           | k= 1, v=21         |
| 976            | 0.082           | 0.357          |           | 1.80           | k= 2, v=21         |
| 1953           | 0.082           | 0.357          |           | 1.83           | k= 3, v=21         |
| 3906           | 0.082           | 0.357          |           | 1.84           | k= 4, v=21         |
| 7812           | 0.082           | 0.357          |           | 1.85           | k= 5, v=21         |
| 15625          | 0.223           | 7.668          | *         | 1.85           | k= 6, v=21         |

s = 0.027

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 Catiônico - Código 2.12.

| Diluição da FPS (ppm) | Número de pluteus |              | Diluição da FPS (ppm) | Número de pluteus |              |
|-----------------------|-------------------|--------------|-----------------------|-------------------|--------------|
|                       | Normais           | Mal formados |                       | Normais           | Mal formados |
| Controle              | 93                | 07           | 31.250*               | 0                 | 100          |
|                       | 94                | 06           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 94                | 06           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 89                | 11           |                       | 0                 | 100          |
| 488                   | 94                | 06           | 62.500*               | 0                 | 100          |
|                       | 95                | 05           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 90                | 10           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 89                | 11           |                       | 0                 | 100          |
| 976                   | 88                | 12           | 125.000*              | 0                 | 100          |
|                       | 94                | 06           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 91                | 09           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 90                | 10           |                       | 0                 | 100          |
| 1.953                 | 89                | 11           | 250.000*              | 0                 | 100          |
|                       | 93                | 07           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 92                | 08           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 92                | 08           |                       | 0                 | 100          |
| 3.906                 | 88                | 12           | 500.000*              | 0                 | 100          |
|                       | 93                | 07           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 92                | 08           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 90                | 10           |                       | 0                 | 100          |
| 7.812                 | 97                | 03           | 1.000.000*            | 0                 | 100          |
|                       | 94                | 06           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 92                | 08           |                       | 0                 | 100          |
|                       | 94                | 06           |                       | 0                 | 100          |
| 15.625*               | 76                | 24           |                       |                   |              |
|                       | 84                | 16           |                       |                   |              |
|                       | 74                | 26           |                       |                   |              |
|                       | 77                | 23           |                       |                   |              |

\* 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:

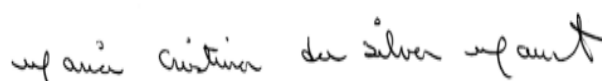
Carina C. Gomes Machado - CRBio-2 – 32963/02  
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 – 38219/02 P  
Gabriele A. Correa da Rocha – CRBio-2 – 42.496/02 P  
Viviane Euzébio Luiz - CRBio-2 – 42.535/02 P

##### ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier  


##### REVISADO POR:

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat



Rio de Janeiro, 25 de julho de 2005.