

L2408LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO CATIÔNICO  
(CÓDIGO 2.16) 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 2408 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 embriolarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

Tempo de exposição: 26h

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

Substância de referência: DSS ( Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos:  $CI_{50}(I): 1,61 - 1,89 \text{ mg.L}^{-1}$  ( 17/01/2006 )

Resultado do ensaio realizado com DSS em 09/01/2006:  $1,61 \text{ mg.L}^{-1}$  (1,58 – 1,65  $\text{mg.L}^{-1}$ )

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de Perfuração CATIÔNICO - Código: 2.16  
Data: 03/01/2006

Código de entrada no Labtox: L240806      Data de entrada no Labtox: 04/01/2006

Data de início do ensaio: 09/01/2005      Data de término do ensaio: 10/01/2006

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.

RESULTADOS	
<b>CENO</b> 31.250 ppm da FPS	<b>CEO</b> 62.500 ppm da FPS
<b>VC</b> 44.194 ppm da FPS	
Controle: 91,7 % de pluteus	

FPS: Fração particulada suspensa

## 1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 09 de janeiro de 2006, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de Perfuração CATIÔNICO (Código 2.16) sobre os embriões do ouriço-do-mar *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 lote de organismos utilizados 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 mesmos encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultado obtido no ensaio de toxicidade com a substância de referência foi analisado para a determinação da  $CI_{50}(I)$  (concentração inicial que inibe 50% do desenvolvimento embriolarval). O método utilizado foi o de Interpolação Linear (Nörberg King, 1993).

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 1,61 – 1,89 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 ±1‰
Duração do ensaio.....	26 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embriolarval 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 2.16) foi de 31.250 ppm da FPS, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 62.500 ppm da FPS e o VC (valor crônico) foi de 44.194 ppm da FPS.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 91,7 % e a  $CI_{50}(I)$  obtida com a substância de referência (DSS) foi de  $1,61 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $1,58 - 1,65 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

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 TRANSFORM

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
Controle	0.082				
488	0.091	0.612		1.71	k= 1, v=27
976	0.091	0.612		1.79	k= 2, v=27
1953	0.091	0.612		1.81	k= 3, v=27
3906	0.091	0.612		1.82	k= 4, v=27
7812	0.091	0.612		1.83	k= 5, v=27
15625	0.091	0.612		1.84	k= 6, v=27
31250	0.091	0.612		1.84	k= 7, v=27
62500	0.335	18.820	*	1.84	k= 8, v=27

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 CATIÔNICO (Código 2.16).

Solução-teste (ppm da FPS)	Número de pluteus		Solução-teste (ppm da FPS)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	93	07	31.250	91	09
	92	08		90	10
	90	10		93	07
	92	08		91	09
488	89	11	62.500*	68	32
	90	10		70	30
	90	10		65	35
	92	08		73	37
976	92	08	125.000*	02	98
	91	09		10	90
	88	12		05	95
	90	10		0	100
1.953	89	11	250.000*	0	100
	87	13		0	100
	92	08		0	100
	93	07		0	100
3.906	90	10	500.000*	0	100
	88	12		0	100
	93	07		0	100
	91	09		0	100
7.812	91	09	1.000.000*	0	100
	90	10		0	100
	92	08		0	100
	89	11		0	100
15.625	95	05			
	92	08			
	93	07			
	94	06			

\*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.
- Nörberg-King, T. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach (version 2.0). U.S.EPA, Duluth, 1v.
- 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:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 26 de janeiro de 2006.