

L2187LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE PERFURAÇÃO BR-CARB II
(CÓDIGO 2.7.6) 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
CEP: 21941-590

Ensaio 2187 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
Visite nosso site: 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

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

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de perfuração BR-CARB II (Código 2.7.6)
Data do preparo: 03/08/2005

Código de entrada no Labtox: L218705

Data de entrada no Labtox: 05/08/2005

Data de início do ensaio: 22/08/2005

Data de término do ensaio: 23/08/2005

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

| RESULTADOS |
|--|
| CENO 62.500 ppm da FPS CEO 125.000 ppm da FPS VC 88.388 ppm da FPS |
| Controle: 86,3% de pluteus |
| DSS: CE(I)50: 1,70 mg.L ⁻¹ (IC: 1,67 – 1,73 mg.L ⁻¹) |

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 22 de agosto de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do fluido de perfuração BR-CARB II - Código 2.7.6, 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 diluições do fluido, avaliando-se a diluição 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⁻¹.

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 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 (1.000.000 ppm da FPS) 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±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 BR-CARB II – Código 2.7.6 foi de 62.500 ppm, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 125.000 ppm e o VC (valor crônico) foi de 88.388 ppm. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 86,3 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,70 mg.L⁻¹ (IC: 1,67 – 1,73 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 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 | 0.134 | | | | |
| 488 | 0.134 | 0.251 | | 1.70 | k= 1, v=30 |
| 976 | 0.134 | 0.251 | | 1.78 | k= 2, v=30 |
| 1953 | 0.134 | 0.251 | | 1.80 | k= 3, v=30 |
| 3906 | 0.137 | 0.067 | | 1.81 | k= 4, v=30 |
| 7812 | 0.137 | 0.067 | | 1.82 | k= 5, v=30 |
| 15625 | 0.137 | 0.067 | | 1.83 | k= 6, v=30 |
| 31250 | 0.140 | 0.201 | | 1.83 | k= 7, v=30 |
| 62500 | 0.160 | 1.807 | | 1.83 | k= 8, v=30 |
| 125000 | 1.000 | 69.278 | * | 1.83 | k= 9, v=30 |

s = 0.018

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-CARB II - Código 2.7.6.

| Diluição da FPS (ppm) | Número de pluteus | | Diluição da FPS (ppm) | Número de pluteus | |
|-----------------------|-------------------|--------------|-----------------------|-------------------|--------------|
| | Normais | Mal formados | | Normais | Mal formados |
| Controle | 90 | 10 | 31.250 | 86 | 14 |
| | 85 | 15 | | 87 | 13 |
| | 85 | 15 | | 85 | 15 |
| | 85 | 15 | | 86 | 14 |
| 488 | 88 | 12 | 62.500 | 85 | 15 |
| | 85 | 15 | | 84 | 16 |
| | 86 | 14 | | 83 | 17 |
| | 85 | 15 | | 84 | 16 |
| 976 | 85 | 15 | 125.000* | 0 | 100 |
| | 89 | 11 | | 0 | 100 |
| | 85 | 15 | | 0 | 100 |
| | 86 | 14 | | 0 | 100 |
| 1.953 | 88 | 12 | 250.000* | 0 | 100 |
| | 86 | 14 | | 0 | 100 |
| | 89 | 11 | | 0 | 100 |
| | 88 | 12 | | 0 | 100 |
| 3.906 | 83 | 17 | 500.000* | 0 | 100 |
| | 88 | 12 | | 0 | 100 |
| | 87 | 13 | | 0 | 100 |
| | 85 | 15 | | 0 | 100 |
| 7.812 | 90 | 10 | 1.000.000* | 0 | 100 |
| | 88 | 12 | | 0 | 100 |
| | 85 | 15 | | 0 | 100 |
| | 84 | 16 | | 0 | 100 |
| 15.625 | 85 | 15 | | | |
| | 89 | 11 | | | |
| | 87 | 13 | | | |
| | 85 | 15 | | | |

*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 | MSc Leila Aparecida da Silva Kraus |
|  |  |

Rio de Janeiro, 02 de setembro de 2005.