

L1982LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DISPERSO I - CÓDIGO 3.7**  
**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 1982 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 Disperso I - Código 3.7

Data de preparo: 18/05/2005

Código de entrada no Labtox: L198205

Data de entrada no Labtox: 24/05/2005

Data de início do ensaio: 01/06/2005

Data de término do ensaio: 02/06/2005

RESULTADOS	
<b>CENO</b> 15.625 ppm	<b>CEO</b> 31.250 ppm
<b>VC</b> 22.097 ppm	
Controle: 89,5 % de pluteus	
DSS: CE(I)50: 1,65mg.L <sup>-1</sup> (IC: 1,58 – 1,71 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC: Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 01 de junho de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Disperso I - Código 3.7, 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 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 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.....	32 a 36 ‰
Duração do ensaio.....	25 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 Disperso I - Código 3.7 foi de 15.625 ppm, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 31.250 ppm e o VC (valor crônico) foi de 22.097 ppm. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 89,5% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,65mg.L<sup>-1</sup>(IC:1,58– 1,71mg.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	0.105				
488	0.108	0.160		1.71	k= 1, v=27
976	0.108	0.160		1.79	k= 2, v=27
1953	0.108	0.160		1.81	k= 3, v=27
3906	0.108	0.160		1.82	k= 4, v=27
7812	0.108	0.160		1.83	k= 5, v=27
15625	0.108	0.160		1.84	k= 6, v=27
31250	0.213	5.154	*	1.84	k= 7, v=27
62500	0.753	31.045	*	1.84	k= 8, v=27

s = 0.029

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 Disperso I - Código 3.7.

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*	75	25
	94	06		82	18
	88	12		83	17
	86	14		75	25
488	89	11	62.500*	28	72
	88	12		28	72
	90	10		24	76
	89	11		19	81
976	87	13	125.000*	0	100
	88	12		0	100
	90	10		0	100
	86	14		0	100
1.953	88	12	250.000*	0	100
	89	11		0	100
	90	10		0	100
	89	11		0	100
3.906	86	14	500.000*	0	100
	89	11		0	100
	90	10		0	100
	87	13		0	100
7.812	92	08	1.000.000*	0	100
	89	11		0	100
	87	13		0	100
	90	10		0	100
15.625	93	07			
	94	06			
	90	10			
	87	13			

\* 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:

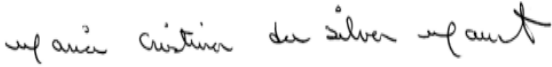

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02  
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02  
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

##### BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - 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, 26 de junho de 2005.