

L1983LVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DISPERSO II - CÓDIGO 3.8**  
**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 1983 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 II - Código 3.8

Data de preparo: 18/05/2005

Código de entrada no Labtox: L198305

Data de entrada no Labtox: 24/05/2005

Data de início do ensaio: 03/06/2005

Data de término do ensaio: 04/06/2005

RESULTADOS	
<b>CENO</b> 125.000 ppm	<b>CEO</b> 250.000 ppm
<b>VC</b> 176.776 ppm	
Controle: 89,25 % de pluteus	
DSS: CE(I)50: 1,56mg.L <sup>-1</sup> (IC: 1,51 – 1,61 mg.L <sup>-1</sup> )	

IC: Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 03 de junho de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Disperso II - Código 3.8, 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 35 ‰
Duração do ensaio.....	24 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 II - Código 3.8 foi de 125.000 ppm, o CEO (concentração de efeito observado) foi de 250.000 ppm e o VC (valor crônico) foi de 176.776 ppm. O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 89,25% e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,56mg.L<sup>-1</sup>(IC:1,51– 1,61mg.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	0.108				
976	0.110	0.165		1.70	k= 1, v=30
1953	0.110	0.165		1.78	k= 2, v=30
3906	0.110	0.165		1.80	k= 3, v=30
7812	0.110	0.165		1.81	k= 4, v=30
15625	0.118	0.659		1.82	k= 5, v=30
31250	0.118	0.659		1.83	k= 6, v=30
62500	0.118	0.659		1.83	k= 7, v=30
125000	0.130	1.484		1.83	k= 8, v=30
250000	0.250	9.396	*	1.83	k= 9, v=30

s = 0.021

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 II - Código 3.8.

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	88	12	31.250	89	11
	86	14		90	10
	90	10		88	12
	93	07		88	12
488	91	09	62.500	89	11
	90	10		90	10
	89	11		87	13
	90	10		88	12
976	90	10	125.000	89	11
	86	14		88	12
	88	12		87	13
	89	11		84	16
1.953	88	12	250.000*	80	20
	91	09		76	24
	86	14		71	29
	89	11		73	27
3.906	87	13	500.000*	0	100
	90	10		0	100
	90	10		0	100
	92	08		0	100
7.812	90	10	1.000.000*	0	100
	89	11		0	100
	91	09		0	100
	88	12		0	100
15.625	87	13			
	86	14			
	89	11			
	88	12			

\* 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:

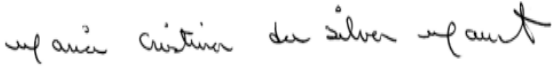

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02  
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02  
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

##### 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.