



L1284LVC

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO CONVENCIONAL COM SODA
CÁUSTICA UTILIZANDO O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus variegatus*
(Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS
Av. Melício Machado s/n
Atalaia - Aracaju - SE
CEP: 49037-440

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@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste 1284 LVC

Rio de Janeiro

Avenida 24, s/nº - Laboratório 4 - Pólo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep: 21941-590 – Tel:(21) 3867-5501 R: 220 – e-mail: labtox@biorio.org.br
Visite nosso site: www.labtox.com.br

L1284LVC

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Carlos Roberto de Freitas

Endereço: Av. Melicio Machado s/n

Tel.: (79) 212-2658 / 212-2246

Avaliação solicitada: Teste embriológico

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de teste: crônico de curta duração

Resposta do teste: Efeitos no desenvolvimento dos embriões (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Convencional com Soda Caústica
Data: 15/12/2003

Código de entrada no Labtox: L128403

Data de entrada no Labtox: 29/12/2003

RESULTADOS
O Fluido Convencional com Soda Caústica não apresentou efeito crônico no desenvolvimento dos embriões de <i>L. variegatus</i> na maior diluição testada (936.000 ppm da FPS).
Controle: 89,75 % de pluteus
DSS: CE(I)50 = 1,43 mg.L ⁻¹ (IC = 1,38 – 1,49 mg.L ⁻¹)

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 05 de janeiro de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido Convencional com Soda Caústica sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999). Este teste 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 teste.

A cada série de amostra testada é realizado um teste de toxicidade com o padrão dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida.

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 embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de “Chi-square” e “Bartlett”, respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de “Williams”.

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO e indica a concentração máxima aceitável da amostra.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	estático sem renovação
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 / diluição.....	04
Nº de diluições.....	12 + 1 controle*
Alimentação.....	sem alimentação
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0.45 µm)
Salinidade da água.....	34 ± 1 ‰
Duração do teste.....	25 horas
Resposta.....	embriões mal formados ou com o desenvolvimento retardado
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.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C, até a hora da realização do teste 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 200 mL da amostra homogeneizada e 1800 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), tendo a salinidade ajustada de 31‰ para 35‰, resultando em uma solução estoque de 936.000 ppm da FPS. A partir dela foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 457; 914; 1.828; 3.656; 7.313; 14.625; 29.250; 58.500; 117.000; 234.000; 468.000 e 936.000 ppm (Ficha em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste EMBRIOLÓGICO é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox (0,83 – 3,20 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus mal formados e/ou com atraso no desenvolvimento são apresentados na tabela I.

O valor de CEO (concentração de efeito não observado) obtido com o Fluido Convencional com Soda Caústica foi superior a 936.000 ppm, sendo observado nesta diluição 93,75% de pluteus saudáveis.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,43 mg.L⁻¹ (IC = 1,38 – 1,49 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, nas diferentes diluições, são apresentados nas fichas em anexo.

L1284LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variogatus* expostos a diferentes diluições do Fluido Convencional com Soda Caústica no teste conduzido em 05/12/2004.

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	85	15	29.250	97	03
	97	03		92	08
	87	13		90	10
	90	10		91	09
457	96	04	58.500	90	10
	94	06		91	09
	92	08		95	05
	93	07		93	07
914	93	07	117.000	93	07
	89	11		90	10
	90	10		92	08
	95	05		89	11
1.828	91	09	234.000	91	09
	93	07		95	05
	95	05		96	04
	90	10		98	02
3.656	93	07	468.000	92	08
	92	08		91	09
	91	09		90	10
	90	10		89	11
7.313	98	02	936.000	96	04
	93	07		94	06
	91	09		92	08
	91	09		93	07
14.625	89	11			
	91	09			
	93	07			
	95	05			

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

API - American Petroleum Institute 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).

CEITESB - 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 3.5", 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

Rio de Janeiro, 08 de janeiro de 2004.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12156/02

Marcia Vieira Reynier

Dra. Marcia Vieira Reynier
CRB-2 - 07135/02

Dr. Maria Cristina da Silva Maurat

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado
CRB-2 - 32963/02

Desideria Lima Calleja
CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

Avenida 24, s/nº - Laboratório 4 - Polo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
CEP- 21941-590 - tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
Visite o nosso site: www.labtox.com.br

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO CONVENCIONAL COM SODA
CÁUSTICA UTILIZANDO *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

Solicitante:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS
Av. Melício Machado s/n
Atalaia - Aracaju - SE
CEP: 49037-440

Executado por:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. 24, s/nº - Pólo Bio-Rio - Incubadeira 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste 1284 MJA

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Carlos Roberto de Freitas

Endereço: Av. Melício Machado s/n

Tel.: (79) 212-2658 / 212-2246

Avaliação solicitada: Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de teste: Agudo

Resposta do teste: Efeitos sobre a SOBREVIVÊNCIA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Convencional com soda cáustica

Data: 15/12/2003

Código de entrada no Labtox: L128403

Data de entrada no Labtox: 29/12/2003

RESULTADOS
CL(I)50; 96 horas: > 916.750 ppm da FPS
Sobrevivência no controle: 96,7 %
Zinco: CL(I)50 = 0,31 mg.L ⁻¹ (IC: 0,28 – 0,35 mg.L ⁻¹)

1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado de 30 de dezembro de 2003 a 03 de janeiro de 2004, foi avaliar a toxicidade aguda do Fluido Convencional com soda cáustica, sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em Cetesb (1992), adaptada.

Jovens de *M. juniae* com 1 a 4 dias de idade, foram expostos a diferentes diluições do fluido, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do teste a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4° C 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 5400 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, tendo sua salinidade ajustada de 30‰ para 36‰, resultando em uma solução estoque de 916.750 ppm. A partir desta solução estoque foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 7.162; 14.324; 28.648; 57.297; 114.594; 229.188; 458.375 e 916.750 ppm (fichas em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90%.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste: -----	estático sem renovação
Temperatura de incubação: -----	25 ± 0,5 °C
Luminosidade: -----	12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste: -----	béquer de 400 mL
Volume de solução teste: -----	300 mL
Origem dos organismos: -----	Cultivo Labtox
Idade dos organismos: -----	2 a 4 dias
Nº de organismos / frasco: -----	10
Nº de réplicas / concentração: -----	3
Nº de diluições: -----	8 + 1 controle *
Alimentação: -----	20 náuplios de <i>Artemia</i> sp. Recém eclodidos/ misidáceo/dia
Água de diluição: -----	água do mar natural filtrada
Salinidade da água: -----	34±1‰
Duração do teste: -----	96 horas
Resposta: -----	mortalidade
Valor medido: -----	CL(I)50: 96h (concentração inicial letal a 50% dos organismos em teste em um período de 96h)
Método de cálculo: -----	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

* Controle: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

CONTROLE DOS TESTES DE *Mysidopsis juntae*

Mensalmente é realizado um teste de toxicidade com o padrão, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se os organismos cultivados no Labtox estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie pelo laboratório, que é de 0,21 – 0,40 mg/L.

O resultado da CL(I)50: 96h obtido no teste realizado, em dezembro de 2003, com o zinco foi 0,31 mg.L⁻¹ (IC: 0,28 – 0,35 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas nas diferentes diluições testadas. A CL(I)50; 96h foi superior a 916.750 ppm da FPS (maior diluição testada), sendo observado nesta diluição 80% de sobrevivência. A sobrevivência no controle foi de 96,7%.

Os valores de salinidade, pH e oxigênio dissolvido, medidos no início e no final do teste encontram-se listados nas fichas em anexo.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- American Petroleum Institute. 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).
- CETESB 1992. *Água do mar – Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae SILVA, 1979 (CRUSTACEA – MYSIDACEA)*. Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB 19 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 (EPA-600/s3-84-067).
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.
- 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.

Tabela I - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no teste conduzido com o Fluido Convencional com soda cáustica.

Diluição da FPS (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	9	9	3,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
7.162	10	10	10	10	10	6,6
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	8	
14.324	10	10	10	10	10	3,3
	10	10	10	10	9	
	10	10	10	10	10	
28.648	10	10	10	10	8	6,6
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
57.297	10	10	10	10	10	6,6
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	8	8	
114.594	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	9	7	
	10	10	10	10	10	
229.188	10	10	10	8	8	6,6
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
458.375	10	10	10	9	7	13,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	9	9	
916.750	10	10	8	8	8	20
	10	10	9	8	8	
	10	10	10	9	8	

Avenida 24, s/n° - Laboratório 4 - Polo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
 Cep: 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel:(21) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@bicio.org.br
 Visite nosso site: www.labtox.com.br

EQUIPE TÉCNICA:

Rio de Janeiro, 08 de janeiro de 2004.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12156/02

Marcia Vieira Reynier

Dra. Marcia Vieira Reynier
CRB-2 - 07135/02

Dr. Maria Cristina da Silva Maurat

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. G. Machado

CRB-2 - 32963/02 P

Desideria Lima Calleja

CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE N PARAFINA
HIDROGENADA UTILIZANDO O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus variegatus*
(Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS
Av. Melício Machado s/n
Atalaia - Aracaju - SE
CEP: 49037-440

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@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste 1285 LVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Carlos Roberto de Freitas

Endereço: Av. Melício Machado s/n

Tel: (79) 212-2658 / 212-2246

Avaliação solicitada: Teste embriológico

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de teste: crônico de curta duração

Resposta do teste: Efeitos no desenvolvimento dos embriões (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de N-Parafina Hidrogenada

Pe: 11,5 lb/G

Data: 15/12/2003

Código de entrada no Labtox: L128503

Data de entrada no Labtox: 29/12/2003

RESULTADOS
CENO 500.000 ppm da FPS CEO 1.000.000 ppm da FPS VC = 707.106 ppm da FPS
Controle: 89,75 % de pluteus
DSS: CE(I)50 = 1,43 mg.L ⁻¹ (IC = 1,38 – 1,49 mg.L ⁻¹)

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 05 de janeiro de 2004, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido de N-Parafina Hidrogenada sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1999). Este teste 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 teste.

A cada série de amostra testada é realizado um teste de toxicidade com o padrão dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida.

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 embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de “Chi-square” e “Bartlett”, respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de “Williams”.

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO e indica a concentração máxima aceitável da amostra.

Avenida 24, s/nº - Laboratório 4 - Polo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
CEP: 21941-590 - tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
Visite o nosso site: www.labtox.com.br

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	estático sem renovação
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 / diluição.....	04
Nº de diluições.....	12 + 1 controle*
Alimentação.....	sem alimentação
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Salinidade da água.....	34 ± 1 ‰
Duração do teste.....	25 horas
Resposta.....	embriões mal formados ou com o desenvolvimento retardado
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.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4°C, até a hora da realização do teste 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 200 mL da amostra homogeneizada e 1800 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 soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 488; 977; 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (Ficha em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste EMBRIOLÓGICO é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox (0,83 – 3,20 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus mal formados e/ou com atraso no desenvolvimento são apresentados na tabela I.

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido com o Fluido de N-Parafina Hidrogenada foi de 500.000 ppm, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 1.000.000 ppm e o VC (valor crônico) de 707.106 ppm da FPS.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,43 mg.L⁻¹ (IC = 1,38 – 1,49 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, nas diferentes diluições, são apresentados nas fichas em anexo.

Avenida 24, s/nº - Laboratório 4 - Pólo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
CEP: 21941-590 - tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
Visite o nosso site: www.labtox.com.br

L1285LVC

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes diluições do Fluido de N-Parafina Hidrogenada no teste conduzido em 05/01/2004.

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados		Saudáveis	Afetados
Controle	85	15	31.250	90	10
	97	03		89	11
	87	13		92	08
	90	10		87	13
488	90	10	62.500	87	13
	92	08		90	10
	89	11		89	11
	91	09		93	07
977	91	09	125.000	97	03
	89	11		89	11
	93	07		90	10
	87	13		92	08
1.953	88	12	250.000	88	12
	86	14		94	06
	90	10		89	11
	93	07		86	14
3.906	85	15	500.000	88	12
	91	09		85	15
	95	05		77	23
	89	11		86	14
7.813	87	13	1.000.000*	0	100
	93	07		0	100
	84	16		0	100
	90	10		0	100
15.625	85	05			
	82	08			
	91	09			
	89	11			

* significativamente diferente do 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, Ceresb, 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

Rio de Janeiro, 08 de janeiro de 2004.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12136/02

Marcia Vieira Reynier

Dra. Marcia Vieira Reynier
CRB-2 - 07135/02

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado
CRB-2 - 32963/02

Desideria Lima Calleja
CRB-2 - 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO DE N-PARAFINA
HIDROGENADA UTILIZANDO *Mysidopsis juniae*
(CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

Solicitante:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS
Av. Melício Machado s/n
Atalaia - Aracaju - SE
CEP: 49037-440

Executado por:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. 24, s/nº - Pólo Bio-Rio - Incubadeira 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste 1285 MJA

Rio de Janeiro

Avenida 24, s/nº - Laboratório 4 - Polo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Tel:(21) 3867-5501 R: 220 – e-mail: labtox@biorio.org.br
Visite nosso site: www.labtox.com.br

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Carlos Roberto de Freitas

Endereço: Av. Melicio Machado s/n

Tel.: (79) 212-2658 / 212-2246

Avaliação solicitada: Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de teste: Agudo

Resposta do teste: Efeitos sobre a SOBREVIVÊNCIA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido de N-Parafina Hidrogenada

Pe: 11,5 lb/G

Data: 15/12/2003

Código de entrada no Labtox: L128503

Data de entrada no Labtox: 29/12/2003

RESULTADOS
CL(I)50; 96 horas = 1.000.000 ppm da FPS
Sobrevivência no controle: 90 %
Zinco: CL(I)50 = 0,31 mg.L ⁻¹ (IC: 0,28 – 0,35 mg.L ⁻¹)

1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado de 02 a 06 de janeiro de 2004, foi avaliar a toxicidade aguda do Fluido de N-Parafina Hidrogenada, sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juntae*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juntae* seguiu a metodologia descrita em Cetesb (1992), adaptada.

Jovens de *M. juntae* com 1 a 4 dias de idade, foram expostos a diferentes diluições do fluido, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do teste a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4° C 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 5400 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 desta solução estoque (1.000.000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (fichas em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90%.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste:	estático sem renovação
Temperatura de incubação:	25 ± 0,5 °C
Luminosidade:	12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste:	béquer de 400 mL
Volume de solução teste:	300 mL
Origem dos organismos:	Cultivo Labtox
Idade dos organismos:	1 a 4 dias
Nº de organismos / frasco:	10
Nº de réplicas / concentração:	3
Nº de diluições:	8 + 1 controle *
Alimentação:	20 náuplios de <i>Artemia</i> sp. Recém eclodidos/ misidáceo/dia
Água de diluição:	água do mar natural filtrada
Salinidade da água:	34±1‰
Duração do teste:	96 horas
Resposta:	mortalidade
Valor medido:	CL(I)50; 96h (concentração inicial letal a 50% dos organismos em teste em um período de 96h)
Método de cálculo:	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

* Controle: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

CONTROLE DOS TESTES DE *Mysidopsis juniae*

Mensalmente é realizado um teste de toxicidade com o padrão, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se os organismos cultivados no Labtox estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie pelo laboratório, que é de 0,21 – 0,40 mg/L.

O resultado da CL(I)50; 96h obtido no teste realizado, em dezembro de 2003, com o zinco foi 0,31 mg.L⁻¹ (IC: 0,28 – 0,35 mg.L⁻¹).

3 - RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas nas diferentes diluições testadas. A CL(I)50,96h obtida com o Fluido de N-Parafina Hidrogenada foi de 1.000.000 ppm da FPS e a sobrevivência no controle foi de 90 %.

Os valores de salinidade, pH e oxigênio dissolvido, medidos no início e no final do teste encontram-se listados nas fichas em anexo.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- American Petroleum Institute. 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).
- CETESB 1992. *Água do mar – Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae SILVA, 1979 (CRUSTACEA – MYSIDACEA)*. Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB 19 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 (EPA-600/s3-84-067).
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.
- 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.

Tabela I - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no teste conduzido com o Fluido de N-Parafina Hidrogenada.

Diluição da FPS (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	10	10
	10	10	9	9	8	
	10	10	9	9	9	
7.813	10	10	10	9	9	10
	10	10	10	10	10	
	10	10	8	8	8	
15.625	10	10	10	8	8	16,6
	10	10	10	10	8	
	10	10	10	9	9	
31.250	10	10	8	8	6	20
	10	10	10	10	8	
	10	10	10	10	10	
62.500	10	10	10	10	8	20
	10	10	10	8	8	
	10	10	10	10	8	
125.000	10	10	9	9	8	23,3
	10	10	10	10	9	
	10	10	8	7	7	
250.000	10	10	9	9	7	20
	10	10	10	9	9	
	10	10	9	8	8	
500.000	10	10	9	8	6	46,6
	10	10	8	8	5	
	10	10	8	6	5	
1.000.000	10	9	9	6	5	50
	10	10	8	5	4	
	10	10	10	10	6	

EQUIPE TÉCNICA:

Rio de Janeiro, 08 de janeiro de 2004.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12156/02

Marcia Vieira Reymier

Dra. Marcia Vieira Reymier
CRB-2 - 07135/02

Dr. Maria Cristina da Silva Maurat

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. G. Machado

CRB-2 – 32963/02 P

Desideria Lima Calleja

CRB-2 – 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

Avenida 24, s/nº - Laboratório 4 - Polo Bio-Rio - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep: 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel:(21) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br
Visite nosso site: www.labtox.com.br