

TESTE DE TOXICIDADE DO FLUIDO ALPHADRIL - AMOSTRA Nº 161
UTILIZANDO *Lytechinus variegatus* (Echinodermata-Echinoidea)

SOLICITANTE:

M-I Drilling Fluids do Brasil Ltda
Rua 19 de Fevereiro, nº 30 - 4º Andar
Botafogo, Rio de Janeiro - RJ
CEP 22280-030

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

Teste 1752LVC

Rio de Janeiro

b

ENGLISH SUMMARY

Objective

The purpose of this study was to determine the chronic toxicity of the drilling fluid **Alphadril (Sample 161)** to sea-urchin (*Lytechinus variegatus*), submitted by M-I Drilling Fluids do Brasil Ltda. in a test conducted on January 18th, 2005.

Methods

The drilling fluid sample was delivered to Labtox on January 12th, 2004. The sample was stored at 1-4°C.

At the time of the test, the drilling fluid was homogenized using an industrial mixer for 30 minutes at 1,500 rpm. Then, a 1:9 ratio of drilling fluid seawater slurry was prepared by adding 100 mL of homogenized sample to 900 mL of natural filtered seawater. The solution prepared was mixed for five minutes at 150 rpm and allowed to settle for one hour.

The suspended particulate phase (SPP) was decanted, leaving settled particles on the bottom of the flask. The SPP used as the 1,000,000 ppm test concentration. An aliquot of the SPP was then added to each 100 mL volumetric flasks with the proper volume of natural seawater. The SPP was added to each replicate in increasing order of concentration, beginning with the 488-ppm concentration and ending with the 1,000,000-ppm concentration. A control group was included containing only 10 mL of the dilution water per test chamber.

SUMMARY OF TEST CONDITIONS

1. Test type:	Chronic
2. Temperature:	25±0,5°C
3. Photoperiod:	12 h light, 12 h darkness
4. Test chamber size:	Test tube
5. Test solution volume:	10 mL
6. Organisms origin:	Gametes obtained from adult
7. No. organisms per test tube:	300 eggs
8. No. replicate chambers per concentration:	4
9. No. of concentrations:	12 + 1 control
10. Test duration:	24 hours
11. Dilution water	Natural filtered seawater (0,45 µm)
12. Salinity:	36 ± 1 ‰
13. Endpoint:	Abnormal embryos
14. Analytical Method:	LOEC/NOEC Toxstat (Gulley <i>et al.</i> , 1991)
15. Test acceptability criterion:	80% of normal embryos in controls
16. Reference substance:	SDS
17. Range of sensitivity:	0,74 – 1,86 mgSDS.L ⁻¹

Test results

NOEC 31,250 ppm LOEC 62,500 ppm
CV 44,194 ppm

Reference substance: EC(I)50: 1,62 mg.L⁻¹ (IC: 1,58 – 1,65 mg.L⁻¹)

Control: 82,75 % embryos

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: M-I Drilling Fluids do Brasil Ltda

Técnico requisitante: José França

Endereço: Rua 19 de Fevereiro, nº 30 - 4º Andar

Tel.: (21) 2537-2288

Avaliações solicitadas: Teste Embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipos de teste: Crônico de curta duração.

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

Responsável pelo preparo da amostra: M-I Drilling Fluids do Brasil Ltda

Local de preparo da amostra: Rua Jesus Soares Pereira, 507 - Costa do Sol - Macaé - RJ

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Alphadril - Amostra nº 161

Data de preparo: 10/01/2005

Código de entrada no Labtox: L175205

Data de entrada no Labtox: 12/01/2005

Data de início do teste: 18/01/2005

Data de término do teste: 19/01/2005

Composição da amostra:	PRODUTO	CONCENTRAÇÃO	UNIDADE
	Água industrial	0,87	bbi
	KCl	15	lb/bbi
	NaCl	50	lb/bbi
	Polysafe 600	1	lb/bbi
	Polypac UL	2	lb/bbi
	Duovis	2	lb/bbi
	Carbonato de cálcio 2-44	30	lb/bbi
	MI-BR Alpha free	10,00	lb/bbi
	Ultracap	1,5	lb/bbi
	Ultrahib	10,00	lb/bbi
	Ácido Cítrico	2	lb/bbi
	Bicarbonato sódio	2	lb/bbi
	M-I Lube LpH	6	lb/bbi
	Barita	20	lb/bbi
	M-I Cide	0,07	lb/bbi
	EMI-176	4,00	lb/bbi

L1752LVC

RESULTADOS
CENO 31.250 ppm da FPS CEO 62.500 ppm da FPS VC 44.194 ppm da FPS
Controle: 82,75 % de pluteus
DSS: CE(I)50: 1,62 mg.L ⁻¹ (IC: 1,58 – 1,66 mg.L ⁻¹)

1 – OBJETIVO

Este teste, realizado em 18 de janeiro de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica de curta duração do fluido Alphadril (Amostra nº 161), 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 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 homocedasticidade da proporção de larvas pluteus com desenvolvimento normal foi verificada através dos testes de “Shapiro-Wilks” e “Bartlett”,

b

L1752LVC

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 TESTE

O teste é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 0,74 a 1,86 mg.L⁻¹.

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 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 soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 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).

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 teste com o Fluido Alphadril (Amostra nº 161) foi de 31.250 ppm da FPS, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 62.500 ppm da FPS e o VC (valor crônico) de 44.194 ppm da FPS.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 82,75 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,62mg.L⁻¹ (IC:1,58 –1,66mg.L⁻¹).



L1752LVC

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

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	crônico
Temperatura de incubação.....	25 ± 1° 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*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Salinidade das soluções-teste.....	36 ± 1 ‰
Duração do teste.....	24 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embrionário 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.

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	0.168				
488	0.168	0.205		1.71	k= 1, v=27
976	0.168	0.205		1.79	k= 2, v=27
1953	0.168	0.205		1.81	k= 3, v=27
3906	0.173	0.000		1.82	k= 4, v=27
7812	0.174	0.078		1.83	k= 5, v=27
15625	0.174	0.078		1.84	k= 6, v=27
31250	0.174	0.078		1.84	k= 7, v=27
62500	0.270	4.571	*	1.84	k= 8, v=27

s = 0.030

Note: df used for table values are approximate when v > 20.

L1752LVC

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtidos nas diferentes diluições do fluido Alphadril (Amostra nº 161).

Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus		Diluição da FPS (ppm)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	80	20	31.250	85	15
	80	20		78	22
	88	12		85	15
	83	17		86	14
488	80	20	62.500*	69	31
	87	13		75	25
	83	17		78	22
	80	20		70	30
976	86	14	125.000*	0	100
	87	13		0	100
	82	18		0	100
	81	19		0	100
1.953	83	17	250.000*	0	100
	85	15		0	100
	80	20		0	100
	86	14		0	100
3.906	82	18	500.000*	0	100
	82	18		0	100
	84	16		0	100
	83	17		0	100
7.812	80	20	1.000.000*	0	100
	85	15		0	100
	81	19		0	100
	80	20		0	100
15.625	81	19			
	85	15			
	82	18			
	83	17			

* Significativamente diferente do controle

b

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. (Echinodermata, Echinoidea)*. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, 22p.
- 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).
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 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, 126p.

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

Coordenadora de Pesquisa e Tecnologia: Viviane Euzébio Luiz

BIÓLOGAS:

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

Desideria Lima Calleja - CRB-2 - 38219/02 P

ELABORADO POR:

Dra. Maria Cristina da S. Maurat



REVISADO POR:

MSc. Leila Aparecida da S. Kraus



Rio de Janeiro, 21 de janeiro de 2005.

Data Início: 18 / 01 / 05 Hora: 15:30 Término: 19 / 01 / 05
 Organismo-teste: L. variegatus Operador(es): Viviane
 Tipo de teste: () fecundação () embriológico
 Tipo de amostra: fluido Cód. entrada: 1175205 Salinidade: 37 ‰ pH 8,68
 Solução-estoque: 100 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 900 mL de água de diluição
 Concentração final da solução-estoque: 1.000.000 ppm (mg/L, %)

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL
 Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —
 Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Ajuste do pH: — µL de HCl — µL de NaOH pH final: —
 Água de diluição: Lote: 033 Salinidade: 35 ‰ pH: 8,28 OD: 6,70 mg.L⁻¹
 Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 95 µL
 Nº de réplicas por diluição: 5

Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 24 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL			
Diluição	Vol. sol. estoque mL	Tubos nº	
		Leitura	F/Q
<u>100</u>	<u>—</u>	<u>1-9</u>	<u>10</u>
<u>498</u>	<u>0,049</u>	<u>291 - 294</u>	<u>295</u>
<u>996</u>	<u>0,098</u>	<u>296 - 299</u>	<u>300</u>
<u>1953</u>	<u>0,195</u>	<u>301 - 304</u>	<u>305</u>
<u>3906</u>	<u>0,391</u>	<u>306 - 309</u>	<u>310</u>
<u>7812</u>	<u>0,78</u>	<u>311 - 314</u>	<u>315</u>
<u>15625</u>	<u>1,56</u>	<u>316 - 319</u>	<u>320</u>
<u>31250</u>	<u>3,12</u>	<u>321 - 324</u>	<u>325</u>
<u>62500</u>	<u>6,25</u>	<u>326 - 329</u>	<u>330</u>
<u>125000</u>	<u>12,5</u>	<u>331 - 334</u>	<u>335</u>
<u>250000</u>	<u>25</u>	<u>336 - 339</u>	<u>340</u>
<u>500000</u>	<u>50</u>	<u>341 - 344</u>	<u>345</u>
<u>1000000</u>	<u>100</u>	<u>346 - 349</u>	<u>350</u>
<u>—</u>	<u>—</u>	<u>—</u>	<u>—</u>

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Diluição (ppm)	Início			Término		
	S (‰)	OD	pH	S (‰)	OD	pH
0,0	35	6,70	8,28	36	6,64	8,24
488	35	7,29	8,14	36	6,85	8,24
1953	35	7,33	8,13	36	6,88	8,25
7812	35	7,45	8,15	36	6,75	8,23
31250	36	7,49	8,17	36	5,10	8,08
125000	36	7,52	8,21	36	6,55	8,21
500000	36	7,40	8,40	36	5,87	8,13
1000000	37	7,52	8,68	37	4,10	7,96

OBS: _____
