

**TESTE DE TOXICIDADE DO FLUIDO BR-CARB
UTILIZANDO *Lytechinus variegatus* (Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

Baker Hughes do Brasil Ltda.
Avenida JFM, s/nº - Lote 28, Quadra 04
Balneário Lagomar, Macaé, RJ
CEP 27970-430 – Tel (22) 2765-2505

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 1785LVC

Rio de Janeiro

L1785LVC

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Baker Hughes do Brasil Ltda.

Técnico requisitante: Lidiane da Rocha

Endereço: Avenida JFM, s/nº - Lote 28, Quadra 04, Balneário Lagomar, Macaé, RJ –
CEP 27970-430 Tel.: (22) 2765-2505

Avaliações solicitadas: Teste Embriolarval

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipos de teste: Crônico de curta duração.

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

Responsável pelo preparo da amostra: Baker Hughes do Brasil Ltda.

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido BR-CARB

Data de preparo: 01/02/2005

Código de entrada no Labtox: L178505

Data de entrada no Labtox: 01/02/2005

Data de início do teste: 16/02/2005

Data de término do teste: 17/02/2005

Composição da amostra:	Produto	Concentração	Unidade
	Sea water	0,90	bbl
	Cloreto de Potássio Tipo I	10	ppb
	Antiespumante	0,10	Lts/bbl
	Glutaraldeído (Carbosan GT)	0,06	%
	Goma Xantana	2,0	ppb
	HP Amido	12,0	ppb
	Óxido de Magnésio	1,5	ppb
	Carbonato de Cálcio Micronizado	60,0	ppb
	Preventor de Emulsão	0,30	% by vol.

RESULTADOS	
CENO 7.812 ppm	CEO 15.625 ppm
VC 11.048 ppm	
Controle: 84,5 % de pluteus	
DSS: CE(I)50: 1,77 mg.L ⁻¹ (IC: 1,74 – 1,81 mg.L ⁻¹)	

IC: Intervalo de confiança

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 16 de fevereiro de 2005, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Fluido BR-CARB, sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação a *L. variegatus*, seguiu a metodologia descrita em 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 homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos 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.



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 a uma 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 uma hora. Após esse período, a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e teve o pH ajustado de 9,90 para 8,65 com 2000 µL de HCl. A partir dessa solução-estoque (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 (Ficha em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	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 / diluição.....	04
Nº de diluições.....	12 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Salinidade das soluções-teste.....	32 ± 1 ‰
Duração do teste.....	27 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.

VALIDADE DO TESTE

- 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.

3 – RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus normais e mal formados são apresentados na tabela I.

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido com fluido BR-CARB foi de 7.812 ppm da FPS, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 15.625 ppm da FPS e o VC (valor crônico) de 11.048 ppm da FPS.

O valor médio do percentual de pluteus normais obtido no controle foi de 84,5 % e a CE(I)50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,77 mg.L⁻¹ (IC: 1,74 – 1,81 mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, medidos no início e final do teste, são apresentados 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
Controle	0.138				
488	0.138	0.757		1.72	k= 1, v=21
976	0.138	0.757		1.80	k= 2, v=21
1953	0.144	0.511		1.83	k= 3, v=21
3906	0.144	0.511		1.84	k= 4, v=21
7812	0.148	0.341		1.85	k= 5, v=21
15625	0.845	31.331	*	1.85	k= 6, v=21

s = 0.031

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



L1785LVC

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtido no controle e nas diferentes diluições do fluido BR-CARB.

Diluição da FPS (ppm)	Nº. de pluteus		Diluição da amostra (ppm)	Nº. de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	82	18	31.250*	0	100
	88	12		0	100
	81	19		0	100
	87	13		0	100
488	83	17	62.500*	0	100
	86	14		0	100
	88	12		0	100
	87	13		0	100
976	89	11	125.000*	0	100
	88	12		0	100
	85	15		0	100
	90	10		0	100
1.953	82	18	250.000*	0	100
	86	14		0	100
	80	20		0	100
	90	10		0	100
3.906	87	13	500.000*	0	100
	88	12		0	100
	89	11		0	100
	83	17		0	100
7.812	88	12	1.000.000*	0	100
	82	18		0	100
	85	15		0	100
	86	14		0	100
15.625*	16	84			
	15	85			
	20	80			
	11	89			

* 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. (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, 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

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. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2005.

Data Início: 16 / 02 / 05 Hora: 15:00 Término: 17 / 02 / 05

 Organismo-teste: L. veniegatus Operador(es): Desideria

Tipo de teste: () fecundação (X) embriológico

 Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L178505 Salinidade: 33‰ pH 9,90

 Solução-estoque: 600 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 5400 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: 2000 µL de HCl — µL de NaOH pH final: 8,65

 Água de diluição: Lote: 035 Salinidade: 31‰ pH: 8,07 OD: 5,53 mg.L⁻¹

 Vol. da solução-teste por tubo: 10 mL Vol. solução de ovos: 75 µL

 N° de réplicas por diluição: 5

 Manutenção do teste: Temperatura 25±0,5°C Fotoperíodo: 12:12h Duração do teste: 27 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE:			
Avolumado para <u>100</u> mL			
Diluição	Vol. sol. estoque mL	Tubos nº	
		Leitura	F / Q
<u>90</u>	<u>—</u>	<u>1-9</u>	<u>10</u>
<u>488</u>	<u>0,049</u>	<u>71-74</u>	<u>75</u>
<u>976</u>	<u>0,098</u>	<u>76-79</u>	80
<u>1952</u>	<u>0,195</u>	<u>81-84</u>	<u>85</u>
<u>3906</u>	<u>0,39</u>	<u>86-89</u>	90
<u>7812</u>	<u>0,78</u>	<u>91-94</u>	<u>95</u>
<u>15625</u>	<u>1,56</u>	<u>96-99</u>	100
<u>31.250</u>	<u>3,12</u>	<u>101-104</u>	<u>105</u>
<u>62.500</u>	<u>6,25</u>	<u>106-109</u>	110
<u>125.000</u>	<u>12,5</u>	<u>111-114</u>	<u>115</u>
<u>250.000</u>	<u>25</u>	<u>116-119</u>	120
<u>500.000</u>	<u>50</u>	<u>121-124</u>	<u>125</u>
<u>1.000.000</u>	<u>100</u>	<u>126-129</u>	<u>130</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	31	5,56 5,53	8,07	31	6,07	7,90
488	31	5,91	8,16	31	5,18	7,89
476	31	5,81	8,15		5,03	7,84
1953	31	6,28	8,13	31	5,03	7,84
3906	31	5,77	8,15			7,88
7812	31	5,99	8,16	31	5,29	7,90
15625	31	6,19	8,15			
31250	31	6,15	8,18	31	4,94	7,88
62500	31	6,19	8,20			
125000	31	6,03	8,28	31	3,78	7,80
250000	31	6,13	8,38	31		
500000	32	5,83	8,49	32	3,51	7,88
1000000	33	5,30	8,65	33	3,18	8,20

OBS: _____
