

TÍTULO DO ESTUDO:

**TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO
COM OURIÇO DO MAR PARA O PRODUTO: FLUIDO DE
PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS.**

LABORATÓRIO CONTRATADO: TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

EMPRESA: BAKER HUGHES INTEQ

FABRICANTE: BAKER HUGHES INTEQ.

PRODUTO ANALISADO: FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE
SWEEPS.

TESTE: TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO COM OURIÇO DO MAR
(*LYTECHINUS VARIEGATUS*).

CÓDIGO TECAM: T06240-00.

RELATÓRIO Nº: RLT06240LY-2.

INÍCIO DO ESTUDO: 17/02/00.

TÉRMINO DO ESTUDO: 10/03/00.

EMISSÃO DO RELATÓRIO: 31/03/00.

DIRETOR DE ESTUDO: Regina Sawaia Sáfyadi (MSc).

EQUIPE: Alice Fumie Aita, Bióloga.

Maria Aparecida Gomes, Apoio Técnico.

pg. 1/12

ÍNDICE

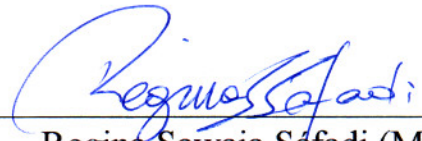
DECLARAÇÃO	3
RESUMO/ABSTRACT	4
SUMÁRIO	5
SUMMARY	7
PROCEDIMENTOS	9
1. Sistema teste.....	9
2. Preparo das soluções.....	9
3. Condições de teste	9
4. Substância de referência	10
5. Análises estatísticas	10
RESULTADOS/CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
TABELA	12

DECLARAÇÃO

O presente estudo com o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS** foi requerido pela empresa **BAKER HUGHES INTEQ** e contém informações estritamente confidenciais.

O estudo descrito nesse relatório final foi conduzido de acordo com o protocolo previsto sob a orientação e supervisão do Diretor de Estudo. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos. Não foram observados desvios ou não-conformidades que afetem a qualidade do estudo. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM - TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à R. Tavares Bastos, 937. S. Paulo - SP.

São Paulo, 31 de março de 2000.



Regina Sawaia Safadi (MSc)
Diretor de Estudo
CRB 06126-01

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS (T06240-00)** sobre embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), verificando a ocorrência de retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou anomalias em ovos e larvas pluteus. Para tanto, três réplicas com cerca de 300 ovos recém-fecundados cada foram expostas por 24 horas às seguintes concentrações do produto: 250 ppm (0,025 %); 1.200 ppm (0,12 %); 6.000 ppm (0,6 %); 30.000 ppm (3,0 %) e 150.000 ppm (15 %). Após 24 horas de exposição, foi observado que as concentrações superiores a 30.000 ppm exerceram efeitos tóxicos crônicos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 6.000 ppm, a concentração de efeito observado (CEO) em 30.000 ppm e o valor crônico (VC) em 13.416 ppm.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the chronic toxicity to sea urchin (*Lytechinus variegatus*) of the product **SEA WATER / BENTONITE SWEEPS DRILLING FLUID (T06240-00)**. Three groups of 300 eggs newly fertilized were exposed during 24 hours to the following concentrations: 250 ppm (0.025 %); 1,200 ppm (0.12 %); 6,000 ppm (0.6 %); 30,000 ppm (3 %) and 150,000 ppm (15 %). After 24 hours exposition, concentrations higher than 30,000 ppm were chronically toxic to sea urchin, comparing to control. Therefore, under the test conditions, the no observed effect concentration (NOEC) was estimated in 6,000 ppm, the lowest observed effect concentration (LOEC) was 30,000 ppm, and the chronic value (CV) was 13,416 ppm.

SUMÁRIO

DADOS GERAIS

Empresa Solicitante: BAKER HUGHES INTEQ

Nome do Produto: FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS.

Fabricante: BAKER HUGHES INTEQ.

Código Tecam: T06240-00.

Teste: Toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*).

Metodologia: CETESB, 1999.

Diretor de estudo: Regina Sawaia Sáfadi (MSc).

DADOS DAS AMOSTRAS

Data de entrada: 17/02/00.

Tipo: fluido de perfuração.

Estado Físico: Líquido.

Composição (dados fornecidos pelo fabricante):

Fresh water	-----
Bentonite	72 kg/m ³
Bentonite extender (BENEX)	0.14 kg/m ³
Caustic soda	0.85 kg/m ³
Soda ash	1 kg/m ³

CONDIÇÕES DE TESTE

Data de início: 19/02/00.

Data de término: 20/02/00.

Espécie: *Lytechinus variegatus*.

Duração: 24 horas.

Temperatura média da água: 24,5 ± 0,5 °C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

Água de diluição e controle: água marinha natural filtrada com salinidade 34 ± 2 ‰.

Concentrações: 250 ppm (0,025 %); 1.200 ppm (0,12 %); 6.000 ppm (0,6 %); 30.000 ppm (3,0 %); 150.000 ppm (15 %).

CONCLUSÃO

A concentração de efeito não observado (CENO), a concentração de efeito observado (CEO) e o valor crônico (VC) do produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS**, estimados para os efeitos sobre o desenvolvimento embriolarval de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), nas condições de teste, foram estimados em:

CENO = 6.000 ppm

CEO = 30.000 ppm

VC = 13.416 ppm

SUMMARY**GENERAL DATA****Sponsor:** BAKER HUGHES INTEQ**Product:** SEA WATER / BENTONITE SWEEPS DRILLING FLUID.**Manufacturer:** BAKER HUGHES INTEQ.**Tecam Code:** T06240-00.**Test:** Short-term chronic toxicity test to sea urchin (*Lytechinus variegatus*).**Methodology:** CETESB, 1999.**Study Director:** Regina Sawaia Sáfadi (MSc).**PRODUCT DATA****Received:** 02/17/00.**Type:** Drilling fluid.**Physical state:** Liquid.**Composition** (data from manufacturer):

Fresh water	-----
Bentonite	72 kg/m ³
Bentonite extender (BENEX)	0.14 kg/m ³
Caustic soda	0.85 kg/m ³
Soda ash	1 kg/m ³

TEST CONDITIONS**Initial date:** 02/19/00.**Ending date:** 02/20/00.**Specie:** *Lytechinus variegatus*.**Duration:** 24 hours.**Average water temperature:** 24.5 ± 0.5 °C.**Photoperiod:** 16 hours light and 8 hours darkness.

Solution renewal: static test.

Dilution water and control: filtered natural seawater (salinity 34 ± 2 ‰).

Concentrations: 250 ppm (0.025 %); 1,200 ppm (0.12 %); 6,000 ppm (0.6 %); 30,000 ppm (3 %); 150,000 ppm (15 %).

CONCLUSION

The no observed effect concentration (NOEC), the lowest observed effect concentration (LOEC), and the chronic value (CV) of the product **SEA WATER / BENTONITE SWEEPS DRILLING FLUID**, estimated for the effects on embryolarval development of sea urchin (*Lytechinus variegatus*), under the test conditions, were:

NOEC = 6,000 ppm

LOEC = 30,000 ppm

CV = 13,416 ppm

PROCEDIMENTOS

1. Sistema teste

A espécie utilizada foi *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea). Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas plásticas, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas contendo água marinha e aeração intensa, sendo devolvidos ao ambiente após o teste.

2. Preparo das soluções

O produto foi dissolvido com água marinha natural filtrada. Foram preparadas as seguintes soluções teste:

- A. 150.000 ppm (15 %):** 75 mL do produto + água de diluição até 500 mL.
- B. 30.000 ppm (3 %):** 20 mL da concentração A + água de diluição até 100 mL.
- C. 6.000 ppm (0,6 %):** 4 mL da concentração A + água de diluição até 100 mL.
- D. 1.200 ppm (0,12 %):** 0,8 mL da concentração A + água de diluição até 100 mL.
- E. 250 ppm (0,025 %):** 20,8 mL da concentração D + água de diluição até 100 mL.

3. Condições de teste

Os gametas foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5M na região perioral dos animais adultos, conforme metodologia descrita em Cetesb (1999). A fecundação foi feita “in vitro” e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação.

As amostras foram transferidas para tubos de ensaio, em alíquotas de 10 mL, sendo preparadas 3 réplicas para cada concentração e 6 para o controle com água de diluição. Uma réplica extra da maior concentração, com 20 mL de água, foi preparada para realização das análises físico-químicas no final do teste. Com um micro-pipetador, um volume equivalente a 30 ovos/mL foi transferido para cada tubo de ensaio.

O teste foi incubado a $24,5 \pm 0,5$ °C, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Após 24 horas de incubação, um dos tubos do controle foi retirado e o estágio de desenvolvimento de 50 embriões foi avaliado. O teste pode ser encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido.

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5 mL de formol tamponado com bórax. Uma subamostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgwick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus anormais em cada amostra.

No início e no final do teste foram realizadas análises de pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água de diluição (controle) e da maior concentração preparada.

4. Substância de referência

Simultaneamente ao teste com o produto, foi realizado teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração de inibição (CI50; 24h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,072 mg Zn/L (I.C.: 0,070 a 0,073 mg Zn/L).

5. Análises estatísticas

Foram aplicadas as seguintes análises estatísticas:

- . Teste de Normalidade do Chi-Quadrado (USEPA, 1992).
- . Teste de Bartlett para homogeneidade de variância (USEPA, 1992).
- . Teste de Williams (Gelber et alii, 1985; Williams, 1971, 1972): para comparação do desenvolvimento embriolarval médio do controle com o das demais soluções teste.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

O resultado do teste com o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS** está apresentado nas Tabelas 1 e 2, com dados de efeito tóxico e análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste.

Após 24 horas de exposição, foi observado um aumento na toxicidade do fluido com o aumento da concentração, sendo que na maior concentração preparada (150.000 ppm) o desenvolvimento embrionário foi retardado ou inexistente.

A aplicação das análises estatísticas indicou que as concentrações superiores a 30.000 ppm exerceram efeitos tóxicos crônicos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 6.000 ppm, a concentração de efeito observado (CEO) em 30.000 ppm e o valor crônico (VC) em 13.416 ppm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Método de ensaio. **Norma Técnica L5.250**. São Paulo, CETESB, 22p., 1999.
- Gelber, R.D.; Lavin, P.T.; Mehta, C.R.; Schoenfeld, D.A. Statistical analysis. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, Hemisphere Publ. Co., p. 110-23, 1985.
- USEPA **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/4-91/021, 513 p., 1992.
- Williams, D.A. A test for differences between treatment means when several doses levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v. 27, p. 103-17, 1971.
- Williams, D.A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. **Biometrics**, v. 28, p.519-31, 1972.

Tabela 1 – Efeito tóxico e análises físicas e químicas (média ± desvio padrão) efetuadas no início e no final do teste no teste de toxicidade crônica de curta duração com ouriço do mar para o produto **FLUIDO DE PERFURAÇÃO SEA WATER / BENTONITE SWEEPS**, após 24 horas de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH	Salinidade (‰)	Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)
Controle	16	8,1 ± 0,0	34 ± 0	5,5 ± 1,0
250 ppm	33	N.A.	N.A.	N.A.
1.200 ppm	16	N.A.	N.A.	N.A.
6.000 ppm	26	N.A.	N.A.	N.A.
30.000 ppm	39	N.A.	N.A.	N.A.
150.000 ppm	100	8,6 ± 0,1	31 ± 0	5,7 ± 1,1

N.A.: Não analisado.