

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM O EXTRATO DO ÓLEO FRADE CRUDE
(MÉTODO ANDERSON) UTILIZANDO *Lytechinus variegatus*
(ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**

SOLICITANTE:

Chevron Brasileira de Petróleo Ltda.
Texaco Brasil BM-C-5 Ltda
Av. República do Chile, 230/18º
Rio de Janeiro, RJ CEP 20031-170
Tel: (21) 2510 5979 Fax: (21) 2510-5909

Técnico solicitante: Sônia Lima
E-mail: soml@chevron.com

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

Laudo 2644 ALVC

Rio de Janeiro



LAUDO DE TOXICIDADE

DADOS DO ENSAIO

Avaliação solicitada: Ensaio embriolarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: Crônico de curta duração

Tempo de exposição: 24 a 28 horas

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

VALIDADE DO ENSAIO

Desenvolvimento embriolarval no controle: $\geq 80\%$

Sensibilidade do lote de organismos utilizados, à substância de referência, dentro da faixa estabelecida pelo Labtox

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos: $CI_{50}(I): 1,46 - 1,94 \text{ mg.L}^{-1}$ (21/02/2006)

DADOS DA AMOSTRA

Identificação da amostra pelo solicitante: Óleo Frade Crude CRC 58369-2
Método Anderson

Código de entrada no Labtox: L264406

Data de entrada no Labtox: 10/07/2006

Data de início do ensaio: 12/07/2006

Data de término do ensaio: 13/07/2006

RESULTADOS
CENO 12,5 % da FSA CEO 25 % da FSA VC 17,68 % da FSA
Controle: 90,7 % de pluteus
Ensaio com DSS: $1,77 \text{ mg.L}^{-1}$ (IC: $1,75 - 1,78 \text{ mg.L}^{-1}$)

FSA: Fração solúvel do óleo em água.



1 – OBJETIVO

Este ensaio, realizado em 12 de julho de 2006, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica de curta duração do extrato do óleo Frade Crude CRC 58369-2, pelo método Anderson, sobre os embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação à *L. variegatus* seguiu a metodologia descrita em CETESB (1999), com adaptações. O ensaio consiste na exposição dos ovos a diferentes diluições do extrato, avaliando-se a solução-teste que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 Williams utilizando-se o programa estatístico TOXSTAT versão 3.3 (Gulley *et al.*, 1991).

Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO.

PREPARO DA AMOSTRA

A Fração Solúvel do óleo em Água (FSA) foi preparada na proporção 1:9 (v/v) seguindo a metodologia descrita em Anderson *et al.* (1974). Esta mistura foi agitada em agitador magnético por 20 horas em frasco Mariotte, com vórtex medindo 1/3 do volume total, e decantada por uma hora. Após esse período, a fração aquosa foi retirada e utilizada como solução-estoque (100% da FSA) para o preparo das seguintes soluções-teste: 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100% da FSA.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	crônico
Temperatura de incubação.....	25 ± 1° C
Fotoperíodo.....	12h luz/12h 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.....	8 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	36 ‰
pH das soluções-teste:.....	8,03 a 8,17
Oxigênio dissolvido das soluções-teste:.....	5,10 a 5,89 mg.L ⁻¹
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.

Os valores máximos e mínimos de oxigênio dissolvido, pH e salinidade medidos no início e final do ensaio, encontram-se na lista de resumo das condições de ensaio.



Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtidos nas diferentes diluições, no ensaio conduzido com o extrato do óleo Frade Crude (Método Anderson).

Solução-teste (% da FSA)	Número de pluteus		Solução-teste (% da FSA)	Número de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	92	08	12,5	88	12
	92	08		90	10
	92	08		90	10
	87	13		86	14
0,78	91	09	25*	49	51
	90	10		83	17
	91	09		75	25
	88	12		83	17
1,56	92	08	50*	72	28
	90	10		76	24
	93	07		65	35
	90	10		71	29
3,12	95	05	100*	13	87
	90	10		21	79
	89	11		33	67
	91	09		31	69
6,25	91	09			
	94	06			
	82	18			
	90	10			

* Significativamente diferente do controle

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
Controle	0.301				
1.56	0.301	0.097		1.71	k= 1, v=24
3.12	0.301	0.097		1.79	k= 2, v=24
6.25	0.328	0.345		1.82	k= 3, v=24
12.5	0.345	0.630		1.83	k= 4, v=24
25	0.542	3.905	*	1.84	k= 5, v=24
50	0.568	4.330	*	1.84	k= 6, v=24
100	1.059	12.493	*	1.85	k= 7, v=24

s = 0.085

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



GARANTIA DOS RESULTADOS

Os dados apresentados nesse laudo são confidenciais e referem-se unicamente aos resultados obtidos no ensaio com a amostra acima citada. Os dados brutos encontram-se à disposição da Empresa solicitante no Labtox.

Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J.W. *et al.* 1974. Characteristics of dispersal and water soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to marine crustaceans and fish. *Marine Biol.*, 27: 75-78.
- 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.
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

5 - EQUIPE TÉCNICA

DIRETORAS:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRBio-2 - 12156/02
Dra. Marcia Vieira Reynier - CRBio-2 - 07135/02
Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRBio-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 - 42496/02 P
Viviane Euzébio Luiz - CRBio-2 - 42.535/02

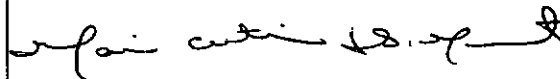
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat



Rio de Janeiro, 26 de julho de 2006.