



**TESTE DE TOXICIDADE COM O ÓLEO FPSO BRASIL CÓDIGO LET 2604  
(MÉTODO TARZWELL) UTILIZANDO O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus  
variegatus* (Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

SEAMB/CENPES/PETROBRAS  
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello  
Ilha do Fundão – Cidade Universitária – Q 7  
Tel: (21) 3865-6100

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](mailto:labtox@biorio.org.br)  
CEP: 21941-590

Teste nº 1004

Rio de Janeiro

Av. 24, s/nº - Cidade Universitária – Ilha do Fundão – Pólo BIO-RIO – Incubadeira 3-4  
CEP: 21941-590 – tel: (0XX21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220

## LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Eduardo Platte

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello – Ilha do Fundão – Cidade Universitária – Q 7

Telefone: (21) 3865-7128

Avaliação solicitada: Teste embriolarval

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: Óleo FPSO Brasil  
Código Let 2604 - Método Tarzwell  
Data: 27/03/2003

Código de entrada no Labtox: 050403 Labtox

<b>RESULTADO DEFINITIVO</b>
<b>TESTE EMBRIOLÓGICO</b> CENO 31,25 ppm da FDA    CEO 62,5 ppm da FDA VC = 44,19 ppm da FDA
Controle: 84,25% de pluteus
DSS: CE50 = 1,21 mg.L <sup>-1</sup> (IC = 1,15 – 1,27 mg.L <sup>-1</sup> )

IC – Intervalo de confiança

## 1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 08/05/2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica da amostra de Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) – Método Tarzwell 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 concentrações da substância, avaliando-se a concentração 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.....	8 + 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 de óleo foi enviada ao Labtox pela Petrobras. Foi preparada uma solução-estoque de 1000 ppm (v/v) da Fração Dispersa do óleo em Água (FDA), colocando-se 3 mL de óleo e avolumando-se para 3 litros com água do mar, seguindo a metodologia descrita em Tarzwell. (1969). Esta mistura foi agitada em um homogeneizador elétrico por 5 segundos a uma velocidade de 13.000 rpm. A solução foi decantada e, após esse período, a fração dispersa foi retirada e a partir dessa solução-estoque (1000 ppm da FDA) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 1,95; 3,9; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125 e 250 ppm (Fichas 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;
- Os parâmetros de qualidade da água estiverem dentro dos limites estabelecidos para a espécie;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox (0,83 – 3,20 mg.L<sup>-1</sup>).

## 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 a amostra do Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) - Método Tarzwell foi de 31,25 ppm da FDA, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 62,5 ppm da FDA e o VC (valor crônico) de 44,19 ppm da FDA.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 84,25% e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,21 mg.L<sup>-1</sup> (IC = 1,15 – 1,27 mg.L<sup>-1</sup>).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e no final do teste, nas diferentes diluições, são apresentados nas fichas em anexo e encontram-se dentro dos limites aceitáveis para a espécie.

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes concentrações da amostra do Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) - Método Tarzwell no teste conduzido em 08/05/2003.

Concentração da FDA (ppm)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados
Controle	77	23
	86	14
	90	10
	84	16
1,95	87	13
	87	13
	89	11
	91	09
3,9	89	11
	86	14
	91	09
	91	09
7,81	85	15
	87	13
	88	12
	91	09
15,63	89	11
	86	14
	91	09
	90	10
31,25	87	13
	85	15
	82	18
	87	13
62,5*	61	39
	71	29
	79	21
	79	21
125*	73	27
	59	41
	78	22
	67	33
250*	60	40
	36	64
	32	68
	43	57

- Estatisticamente diferente do controle

#### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, Cetesb, 22 p.

Gulley,D.D.; Boelter,A.M.; Bergman,H.L. 1991. “*TOXSTAT Realease 3.3*”, Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.

Tarzwel, C.M. 1969. Standart methods for determination of oil dispersants and mixtures of dispersants and various oils to aquatic organisms.

## 5 - EQUIPE TÉCNICA

Rio de Janeiro, 14 de maio de 2003.

*Leila Aparecida da Silva Kraus*

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus  
Diretora Administrativa e Financeira  
CRB-2 - 12156/02

*Marcia Vieira Reynier*

MSc Marcia Vieira Reynier  
Diretora Científica  
CRB-2 - 07135/02

*Maria Cristina da Silva Maurat*

MSc Maria Cristina da Silva Maurat  
Diretora Comercial  
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGA:

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

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz



## ANEXOS

o FPSO Brasil - Cod LET 2604 - Met. Tarzwell  
 File: C:\ESTAT\T1\TOXSTAT\T1004. Transform: 1/Y (INVERSE)

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 1 OF 2

GROUP	IDENTIFICATION	N	ORIGINAL MEAN	TRANSFORMED MEAN	ISOTONIZED MEAN
1	0.0	4	0.158	6.935	7.916
2	1.95	4	0.115	8.897	7.916
3	3.9	4	0.512	4.614	7.467
4	7.81	4	0.123	8.451	7.467
5	15.63	4	0.110	9.336	7.467
6	31.25	4	0.148	6.902	6.902
7	62.5	4	0.275	3.884	3.884
8	125	4	0.308	3.430	3.430
9	250	4	0.573	1.822	1.822

o FPSO Brasil - Cod LET 2604 - Met. Tarzwell  
 File: C:\ESTAT\T1\TOXSTAT\T1004. Transform: 1/Y (INVERSE)

WILLIAMS TEST (Isotonic regression model) TABLE 2 OF 2

IDENTIFICATION	ISOTONIZED MEAN	CALC. WILLIAMS	SIG P=.05	TABLE WILLIAMS	DEGREES OF FREEDOM
0.0	7.916				
1.95	7.916	0.705		1.71	k= 1, v=27
3.9	7.467	0.382		1.79	k= 2, v=27
7.81	7.467	0.382		1.81	k= 3, v=27
15.63	7.467	0.382		1.82	k= 4, v=27
31.25	6.902	0.024		1.83	k= 5, v=27
62.5	3.884	2.194	*	1.84	k= 6, v=27
125	3.430	2.521	*	1.84	k= 7, v=27
250	1.822	3.677	*	1.84	k= 8, v=27

1.967  
 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

*Handwritten signature*

TESTE N° 1004 Data: 08 / 05 / 03 Organismo-teste: L. variegatus  
 Tipo de teste: ( ) fecundação (x) embriológico

Amostra: óleo FPSO Brasil - LETA 2604 - Estação Sargassell

Cód. de entrada no laboratório: 050403

Data de entrada: 07 / 04 / 03 Data do preparo da amostra: 27 / 03 / 2003

DADOS DO SOBRENADANTE

Salinidade: 34 ‰ pH: 7,48 OD: 5,38 mg/L

AJUSTE DA SALINIDADE ( ) SIM (x) NÃO

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
<u>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> mL	<u>—</u> ‰	<u>—</u> ppm

SALMOURA

Método de obtenção: — Salinidade: — ‰ pH: —

AJUSTE DO pH ( ) SIM (x) NÃO

Volume da amostra:	Adição:	pH final:
<u>—</u> mL	<u>—</u> µL de HCl	<u>—</u>
	<u>—</u> µL de NaOH	<u>—</u>

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: ANGRA DOS REIS Data: 30 / 04 / 05

Data de filtração: 07 / 05 / 03 Aeração: Data 08 / 05 / 03

Salinidade: 34 ‰ pH: 8,07 OD: 5,64 mg/L

TESTE N° 1.004

Amostra: Óleo FPSO Brasil - NET 2604 - Túnelo Sarquell

Solução-estoque: 1.000 ppm Vol. final a ser preparado: 100 mL

Concentração (ppm)	Vol. Amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
0,0	—	100	1-9	10
1,95	0,78	99,22	161-164	165
3,9	1,56	98,44	166-169	170
7,81	3,125	96,875	171-174	175
15,63	6,25	93,75	176-179	180
31,25	12,5	87,5	181-184	185
62,5	25	75	186-189	190
125	50	50	191-194	195
250	100	—	196-199	200

OBS:

---



---



---

