

**TESTE DE TOXICIDADE COM O ÓLEO FPSO BRASIL CÓDIGO LET 2604
(MÉTODO ANDERSON) 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
CEP: 21941-590

Teste nº 1002

Rio de Janeiro

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 Anderson

Data: 27/03/2003

Código de entrada no Labtox: 050403 Labtox

RESULTADO DEFINITIVO
TESTE EMBRIOLÓGICO
CENO 3,13 % da FSA CEO 6,25 % da FSA
VC = 4,42 % da FSA
Controle: 84% de pluteus
DSS: CE50 = 2,06 mg.L ⁻¹ (IC = 1,95 – 2,18 mg.L ⁻¹)

Lucas

1 - OBJETIVO

Este teste, realizado em 14/04/2003, teve como objetivo determinar a toxicidade crônica do Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) – Método Anderson 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 “Dunnetts”.

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.

Lucas

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.

Lucas

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra de óleo foi enviada ao Labtox pela Petrobras. 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, a partir dessa solução-estoque (100% da FSA) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100% da FSA (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⁻¹).

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 de Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) - Método Anderson foi de 3,13 %, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 6,25 % e o VC (valor crônico) de 4,42 % da FSA.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 84 % e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 2,06 mg.L⁻¹ (IC = 1,95 – 2,18 mg.L⁻¹).

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

Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos a diferentes concentrações do Óleo FPSO Brasil - código Let 2604 (Método Anderson) no teste conduzido em 14/04/2003.

Concentração da FSA (%)	Número de pluteus	
	Saudáveis	Afetados
Controle	80	20
	87	13
	85	15
	84	16
0,78	80	20
	82	18
	79	21
	82	18
1,56	78	22
	82	18
	81	19
	77	23
3,13	86	14
	78	22
	69	31
	82	18
6,25*	70	30
	68	32
	69	31
	70	30
12,5*	69	31
	67	33
	75	25
	58	42
25*	51	49
	52	48
	61	39
	58	42
50*	52	48
	43	57
	44	56
	43	57
100*	55	45
	51	49
	51	49
	63	37

* Estatisticamente diferente do controle

Lucas

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. 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.

Lucas

6 - EQUIPE TÉCNICA

Rio de Janeiro, 12 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

LET 2604 - Anderson

File: t1002

Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	8	0.599	0.075	34.762
Within (Error)	27	0.058	0.002	
Total	35	0.658		

Critical F value = 2.31 (0.05,8,27)

Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

LET 2604 - Anderson

File: t1002

Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2

Ho:Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	0.0	0.160	0.160		
2	0.78	0.193	0.193	0.990	
3	1.56	0.205	0.205	1.371	
4	3.13	0.213	0.213	1.599	
5	6.25	0.308	0.308	4.493	*
6	12.5	0.328	0.328	5.102	*
7	25	0.445	0.445	8.681	*
8	50	0.545	0.545	11.727	*
9	100	0.450	0.450	8.834	*

Dunnett table value = 2.53 (1 Tailed Value, P=0.05, df=24,8)

LET 2604 - Anderson

File: t1002

Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2

Ho:Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	0.0	4			
2	0.78	4	0.083	51.9	-0.033
3	1.56	4	0.083	51.9	-0.045
4	3.13	4	0.083	51.9	-0.053
5	6.25	4	0.083	51.9	-0.148
6	12.5	4	0.083	51.9	-0.168
7	25	4	0.083	51.9	-0.285
8	50	4	0.083	51.9	-0.385
9	100	4	0.083	51.9	-0.290

TESTE N° 1002 Data: 14 / 04 / 03 Organismo-teste: L. variegatus

Tipo de teste: () fecundação (x) embriológico

Amostra: óleo FPSO Brasil - ET 2634 (27/03/03) Estação Anderson

Cód. de entrada no laboratório: 050403

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

DADOS DO SOBRENADANTE 5,54 μ g/L

Salinidade: 33 ‰ pH: 8,29 OD: ~~5,44~~ 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:
_____ mL	_____ mL	_____ mL	_____ ‰	_____ ppm

SALMOURA

Método de obtenção: _____ Salinidade: _____ ‰ pH: _____

AJUSTE DO pH () SIM (x) NÃO

Volume da amostra:	Adição:	pH final:
_____ mL	_____ μ L de HCl	_____
	_____ μ L de NaOH	_____

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Local de coleta: Amostras de Data: 27 / 03 / 03

Data de filtração: 11 / 04 / 03 Aeração: Data 14 / 04 / 03

Salinidade: 33 ‰ pH: 3,24 OD: 5,44 mg/L

TESTE N° 1002

Amostra: óleo frito usado NET 2021 - Instituto Condicioner

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

Concentração (%)	Vol. Amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
0,0	—	100	1-9	10
0,78	0,78	99,22	11-14	15
1,56	1,56	98,44	16-19	20
3,13	3,13	96,87	21-24	25
6,25	6,25	93,75	26-29	30
12,5	12,5	87,5	31-34	35
25	25	75	36-39	40
50	50	50	41-44	45
100	100	—	46-49	50

OBS:

TESTE N° 1002

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Temperatura: Sala: 25 ± 1 °C Incubadora: 25 ± 0,5 °C

Concentração (%)	Início			Término		
	OD mg/L	pH	S ‰	OD mg/L	pH	S ‰
0,0	5,44	8,24	33	4,21	7,96	33
0,78	5,50	8,28	33	4,77	8,00	33
1,56	5,80	8,33	33	5,08	7,98	33
3,13	5,64	8,31	33	4,71	8,00	33
6,25	5,84	8,34	33	4,59	7,99	33
12,5	5,85	8,35	33	4,33	7,96	33
25	5,72	8,34	33	4,83	7,95	33
50	5,93	8,35	33	4,93	7,83	33
100	5,54	8,29	33	5,28	7,89	33