

L2419ALVC

**ENSAIO DE TOXICIDADE COM EXTRATO DO ÓLEO 3-SPS-41D-TFR-01
CÓDIGO LET 3215 (MÉTODO ANDERSON) UTILIZANDO *Lytechinus variegatus*
(ECHINODERMATA-ECHINOIDEA)**

SOLICITANTE:

CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6191

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

Ensaio 2419ALVC

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Empresa solicitante: CENPES/PDEDS/AMA/PETROBRAS

Técnico solicitante: Sônia Badaró

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello Ilha do Fundão Cidade
Universitária Q7
Telefone: (21) 3865 6191

Avaliação solicitada: Ensaio embrionarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração Tempo de exposição: 24 horas

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embrionarval (retardamento e/ou ocorrência de anomalias)

Substância de referência: DSS (Dodecil sulfato de sódio)

Faixa de sensibilidade dos organismos: $CI_{50}(I): 1,61 - 1,89 \text{ mg.L}^{-1}$ (17/01/2006)

Resultado do ensaio realizado com DSS em 16/01/2006: $1,63 \text{ mg.L}^{-1}$ (1,58 – 1,67 mg.L^{-1})

Identificação da amostra pelo solicitante: Óleo 3-SPS-41D-TFR-01: Condensado original de
Mexilhão
Código LET 3215 - Método Anderson (1:9)
Data de coleta: 20/06/2005

Código de entrada no Labtox: L241906 Data de entrada no Labtox: 12/01/2006

Data de início do ensaio: 16/01/2006 Data de término do ensaio: 17/01/2006

Obs₁: Os resultados apresentados neste laudo referem-se apenas ao ensaio realizado com a amostra acima citada.

Obs₂: Este laudo só pode ser reproduzido por completo. A reprodução de partes deste, só pode ser realizada com autorização escrita do Labtox

RESULTADOS	
CENO 3,12 % da FSA	CEO 6,25 % da FSA
VC 4,42 % da FSA	
Controle: 93,25 % de pluteus	

FSA: Fração Solúvel do óleo em água

1 - OBJETIVO

O objetivo deste ensaio, realizado em 16 de janeiro de 2006, foi avaliar a toxicidade crônica do extrato do óleo 3-SPS-41D-TFR-01, código LET 3215 (Método Anderson), sobre os embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade crônica em relação a *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 ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de ensaio.

A cada lote de organismos utilizado é realizado um ensaio de toxicidade com a substância de referência, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se a sensibilidade dos mesmos encontra-se dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultado obtido no ensaio de toxicidade com a substância de referência foi analisado para a determinação da $CI_{50}(I)$ (concentração inicial que inibe 50% do desenvolvimento embriolarval). O método utilizado foi o de Interpolação Linear (Nörberg King, 1993).

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 larvas pluteus com desenvolvimento normal foi verificada através dos testes de “Shapiro-Wilks” 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.

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; 50 e 100% da FSA (Fichas em anexo).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO

Tipo de ensaio.....	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 / solução-teste.....	04
Nº de soluções-teste.....	8 + 1 controle*
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada
Salinidade das soluções-teste.....	32 a 35‰
Duração do ensaio.....	24 horas
Resposta.....	retardamento no desenvolvimento embrionário 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 ENSAIO

O ensaio é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de pluteus;
- O resultado do ensaio com a substância de referência, estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo Labtox que é de 1,61 a 1,89 mg.L⁻¹.

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.

O valor de CENO (concentração de efeito não observado) obtido com o extrato do óleo 3-SPS-41D-TFR-01, código LET 3215 (Método Anderson) foi de 3,12 %, 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 normais obtido no controle foi de 93,25 % e a CI_{50} (I) obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,63mg.L⁻¹ (IC: 1,58–1,67mg.L⁻¹).

Os valores de oxigênio, pH e salinidade, medidos no início e final do ensaio, encontram-se listados nas fichas em anexo.

Tabela I: Número de pluteus normais e mal formados de *L. variegatus* obtidos no ensaio realizado com o extrato do óleo 3-SPS-41D-TFR-01, código LET 3215 (Método Anderson).

Solução-teste (% da FSA)	Nº de pluteus		Solução-teste (% da FSA)	Nº de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	95	05	12,5*	84	16
	93	07		79	21
	96	04		75	25
	89	11		73	27
0,78	94	06	25*	49	51
	90	10		50	50
	92	08		62	38
	90	10		55	45
1,56	93	07	50*	0	100
	87	13		0	100
	89	11		0	100
	92	08		0	100
3,12	87	13	100*	0	100
	93	07		0	100
	85	15		0	100
	91	09		0	100
6,25*	81	19			
	85	15			
	82	18			
	85	15			

* Diferença significativa em relação ao controle

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
0.0	0.067				
0.78	0.085	0.664		1.72	k= 1, v=21
1.56	0.098	1.138		1.80	k= 2, v=21
3.12	0.110	1.612		1.83	k= 3, v=21
6.25	0.168	3.793	*	1.84	k= 4, v=21
12.5	0.223	5.879	*	1.85	k= 5, v=21
25	0.460	14.888	*	1.85	k= 6, v=21

s = 0.037 Note: df used for table values are approximate when v > 20.

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 Release 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.
- Nörberg-King, T. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (IC_p) approach (version 2.0). U.S.EPA, Duluth, 1v.

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

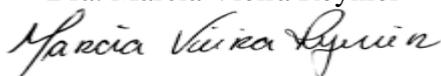
Desideria Lima Calleja - CRBio-2 - 38219/02 P

Gabrielle A. Correa da Rocha - CRBio-2 - 42496/02 P

Viviane Euzébio Luiz - CRBio-2 - 42535/02 P

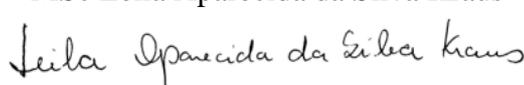
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 27 de janeiro de 2006.