

ENSAIO DE TOXICIDADE COM EXTRATO DO ÓLEO 3-SPS-41D-TFR-01
CÓDIGO LET 3215 (MÉTODO TARZWELL) 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
Avenida 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 2419TLVC

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 embriolarval

Organismo-teste: *Lytechinus variegatus*

Tipo de ensaio: crônico de curta duração

Tempo de exposição: 24 horas

Resposta do ensaio: Efeitos no desenvolvimento embriolarval (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 Tarzwell
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 15,62 ppm de óleo*	CEO 31,25 ppm de óleo*
VC 22,09 ppm de óleo*	
Controle: 93,25 % de pluteus	

* Valores correspondentes a 1,56; 3,12 e 2,21% da Fração dispersa do óleo em água (FDA)

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 Tarzwell), 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 “Dunnetts”.

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 Dispersa do óleo em Água (FDA) foi preparada avolumando-se 3 mL de óleo para 3 litros, com água do mar, seguindo a metodologia descrita em Tarzwell (1969). Esta mistura foi agitada em homogeneizador elétrico por 5 segundos a uma velocidade de 13.000 rpm obtendo-se um extrato de óleo em água de 1.000 ppm (v/v), que corresponde a 100% da FDA. O extrato foi utilizado como solução-estoque para o preparo das seguintes soluções-teste: 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1.000 ppm de óleo (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 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.

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 Tarzwell) foi de 15,62 ppm de óleo, o valor de CEO (concentração de efeito observado) foi de 31,25 ppm de óleo e o VC (valor crônico) de 22,09 ppm de óleo.

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 dissolvido, pH e salinidade, medidos no início e no final do ensaio, são apresentados nas fichas em anexo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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	0.067	0.067		
2	7.81	0.083	0.083	0.642	
3	15.62	0.110	0.110	1.818	
4	31.25	0.130	0.130	2.674	*
5	62.5	0.175	0.175	4.599	*
6	125	0.370	0.370	12.942	*
7	250	0.415	0.415	14.867	*
8	500	0.958	0.958	38.076	*

Dunnett table value = 2.48 (1 Tailed Value, P=0.05, df=24,7)

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 Tarzwell).

Solução-teste (ppm de óleo)	Nº de pluteus		Solução-teste (ppm de óleo)	Nº de pluteus	
	Normais	Mal formados		Normais	Mal formados
Controle	95	05	125*	68	32
	93	07		59	41
	96	04		65	35
	89	11		60	40
7,81	90	10	250*	62	38
	93	07		55	45
	93	07		63	37
	91	09		54	46
15,62	91	09	500*	03	97
	91	09		02	98
	88	12		05	95
	86	14		07	93
31,25*	86	14	1000*	0	100
	91	09		0	100
	85	15		0	100
	86	14		0	100
62,5*	87	13			
	78	22			
	85	15			
	80	20			

* Diferença significativa em relação ao 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.
- Nörberg-King, T. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach (version 2.0). U.S.EPA, Duluth, 1v.
- Tarzwel, C.M. 1969. Standart methods for the determination of relative toxicity of oil dispersants and mixtures of dispersants and various oils to aquatic organisms. In: Proceedings Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills. American Petroleum Institute and Federal Water Pollution Control Administration. December 15-17, 1969. New York. P:179-186.

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.