



LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA MARINHA

**RELATÓRIO DA ANÁLISE DE TOXICIDADE DE AMOSTRA DO
EFLUENTE DA PLATAFORMA DE CURIMÃ NO ESTADO DE CEARÁ.**

Relatório No. 04/2012

Pesquisador responsável: Dra Letícia Veras Costa Lotufo (CRB – 27.682/5-D)

Equipe:

Denis Abessa

Évila Damasceno

Marcionília Pimentel

Lucas Moreira

Lígia Santana

Janaína Bernardes

Lívia Pitombeira

FORTALEZA - CEARÁ

JULHO - 2012

ÍNDICE

1. RESUMO.....	3
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3.1 IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA.....	4
3.2. PREPARO DA AMOSTRA.....	4
3.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA.....	5
3.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA AMOSTRA.....	5
3.5. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM MYSIDOPSIS JUNIAE.....	5
3.6. ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO COM EMBRIÕES DE LYTECHINUS VARIEGATUS.....	6
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	8
4. RESULTADOS.....	9
5. CONCLUSÃO.....	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

1. RESUMO

O uso de bioensaios para a avaliação da ecotoxicidade de corpos emissores é uma prática que permite estimar o impacto desses efluentes na biota. No presente trabalho foi utilizado o ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* para avaliar a toxicidade de uma amostra de efluente coletada na plataforma de Curimã (PCR-01) no estado Ceará (ID 43659), no dia 07 de maio de 2012. A salinidade da amostra original foi 62 sendo ajustada para por adição de água destilada para realização dos ensaios. A partir dessa correção, todas as diluições ensaiadas tiveram salinidade, pH e oxigênio dissolvido adequados para os ensaios. A amostra ID 43659 apresentou CL(I)₅₀ menor que 0,19%, menor concentração testada no ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*. A análise de toxicidade crônica realizada com base na Norma ABNT NBR 15.350 utilizando o teste de toxicidade crônica de curta duração em embriões do ouriço *Lytechinus variegatus* infelizmente não pode ser realizada por problemas técnicos de contaminação durante o transporte das amostras para o laboratório do Professor Dênis Abessa em São Vicente, São Paulo onde são realizados esses ensaios. Desta maneira, por solicitação da Petrobrás incluímos uma série de dados históricos de dados obtidos com amostras do efluente da Plataforma de Curimã (coletadas entre 2006 e 2012) no ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* e no ensaio de toxicidade crônica de curta duração com o ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

Palavras-Chave:

Ecotoxicidade, *Mysidopsis juniae*, toxicidade aguda

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo, foi avaliada a toxicidade de uma amostra de efluente coletada no navio tanque da plataforma de Curimã (PCR-01) no estado Ceará (ID **43659**), no dia 07 de maio de 2012, empregando o ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* (CETESB, 1992b, ABNT, 2005).

O ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* avalia a letalidade destes microcrustáceos após 96 horas de exposição ao agente em estudo (CETESB, 1992b; Badaró-Pedroso, 1993; ABNT, 2005) Essa espécie têm sido largamente utilizadas em experimentos ecotoxicológicos no Brasil para estudo e subsequente regulamentação de despejos de fontes pontuais de poluentes em corpos d'água marinhos e estuarinos.

Além disso, por solicitação da Petrobrás incluímos uma série de dados históricos de dados obtidos com amostras do efluente da Plataforma de Curimã (coletadas entre 2006 e 2012) no ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* e no ensaio de toxicidade crônica de curta duração com o ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Amostra 01: ID 43659

Local de coleta: PCR-01 Montante do Sump

Data da Coleta: 07/05/2012

Data do recebimento: 08/05/2012

Responsável pela coleta: Edmir

3.2. PREPARO DA AMOSTRA

A coleta das amostras foi realizada sob responsabilidade da Petrobrás. A amostra foi recebida no laboratório congelada e mantida em freezer até o momento de realização dos ensaios. A amostra constava de efluente com salinidade de 62. Sendo assim, para a realização dos ensaios, a salinidade foi ajustada pela adição de água destilada para 36. O ensaio de toxicidade aguda com *M. juniae* foi realizado

em concentrações que variaram de 0,19 a 3,12%. O preparo das amostras seguiu a norma ABNT NBR-15469 de março de 2007.

3.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Como sugerido pela Norma CETESB L5.251, e mais recentemente pela norma técnica da ABNT NBR 15.350, a sensibilidade dos organismos-teste deve ser avaliada através do uso de uma substância de referência em paralelo aos ensaios com as amostras. Desta maneira, utilizou-se o sulfato de zinco como substância de referência. O ensaio de toxicidade aguda com *M. juniae* foi realizado com concentrações que variaram de 0,100 a 0,560 mg de zinco/L. O valor médio obtido no laboratório de $CL(I)_{50}$ foi de $0,23 \pm 0,07$ mg/L (n = 8), ressalta a sensibilidade do organismo e está compatível com valores descritos na literatura para as mesmas espécies.

3.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA AMOSTRA

Foram determinados os seguintes parâmetros da amostra: oxigênio, pH e salinidade. Para determinação do oxigênio dissolvido, utilizou-se um oxímetro Digimed, para determinação da salinidade, utilizou-se um refratômetro modelo 211, Biobrix e para determinação do pH, utilizou-se um potenciômetro Quimis.

3.5. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM *MYSIDOPSIS JUNIAE*

O método utilizado foi de acordo com a Norma ABNT NBR 15.308, com modificações. Esse teste possui uma duração de 96 horas e consiste na exposição de jovens, com 3-5 dias de idade, às soluções-teste.

Os animais utilizados foram provenientes do cultivo do laboratório. Após três dias do nascimento, os jovens foram transferidos um a um, com pipeta de boca larga, para placas plásticas onde foram randomizados, totalizando 10 organismos por réplica. Depois foram novamente transferidos um a um, para os frascos-teste.

O teste foi realizado em béqueres de 400 mL com 300 mL da solução teste, num total de 4 réplicas para cada concentração de efluente. As concentrações testadas foram 0,19, 0,39; 0,78; 1,56 e 3,12%. Após o acréscimo dos organismos a cada réplica, o experimento foi mantido numa incubadora a cerca de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas claro – 12 horas escuro.

Os organismos foram alimentados diariamente e os mortos foram contados e retirados de cada réplica. O encerramento do teste, após 96 horas, consistiu na contagem final do número de indivíduos vivos e mortos por réplica. A tabela I mostra o resumo das condições de ensaio.

TABELA I – Resumo das condições do ensaio com *Mysidopsis juniae*.

Tipo de teste	Estático sem renovação de água 96h
Vidraria teste	Béquer de 400 mL
Volume da solução – estoque	1000 mL
Volume da solução teste	300 mL
Água de diluição	Água do mar filtrada (0,45 µm)
Idade dos organismos	um a oito dias de idade
N° de animais/béquer	10
N° de réplicas/concentração	04
Alimentação	Náuplios de <i>Artemia</i> sp. <i>ad libidum</i>
Temperatura de incubação	24 ± 1°C
Fotoperíodo	12 h luz : 12 h escuro
Salinidade	35‰
Duração do teste	96 horas
Resposta	Letalidade
Valor medido	Concentração letal inicial mediana CL(1) ₅₀

3.6. ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO COM EMBRIÕES DE *LYTECHINUS VARIEGATUS*

Essa metodologia refere-se aos dados da série histórica, pois como já mencionado, este ensaio não foi realizado com a amostra ID 43659 por problemas técnicos no laboratório.

O método utilizado foi modificado da Norma ABNT NBR 15.350. Foram utilizados exemplares da espécie *L. variegatus*, coletados em Santos, São Paulo, mantidos no Laboratório do Prof. Denis Abessa. Os organismos foram mantidos em aquário com salinidade de 35 ‰, temperatura em torno de 25 °C e aeração constante.

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de 3 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica (perivisceral) dos organismos. Após o término da eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, para remoção da camada gelatinosa que envolve o óvulo. A água do mar utilizada foi coletada no mesmo local dos animais e filtrada duas vezes em papel de filtro antes da sua utilização. Os espermatozoides concentrados foram coletados e mantidos em geladeira até o momento do uso.

Após a última lavagem, os óvulos foram ressuspensos em 100 mL de água do mar filtrada. A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozoides (0,1 mL de suspensão concentrada de espermatozoides em 4,9 mL de água do mar filtrada) à suspensão de óvulos (100 mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação, através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. A concentração de ovos nessa solução foi determinada por contagem de 3 amostras no microscópio óptico. Foram adicionados 500 ovos (volume máximo de 50 μ L) em cada tubo teste contendo a amostra.

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaios descontaminados. Os ovos foram incubados num volume de 10 mL com diluições, utilizando a água de diluição como controle negativo. Nesse caso, as concentrações utilizadas foram 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 %. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Após 24 horas do início do teste, uma alíquota de 10 μ L foi retirada do controle para verificação do estágio de desenvolvimento dos embriões. Quando o controle atingiu o estágio de *Pluteus* bem desenvolvido, foi adicionado 125 μ L de Formaldeído em cada tubo teste para preservação dos organismos. Cem embriões foram contados em cada amostra para obtenção da porcentagem de embriões normais. A tabela II mostra o resumo das condições de ensaio.

TABELA II – Resumo das condições do ensaio com *Lytechinus variegatus*.

Tipo de teste	Crônico sem renovação
Vidraria teste	Tubo de ensaio
Volume da solução – estoque	50 mL
Volume da solução teste	10 mL
Água de diluição	Água do mar filtrada (0,45 μm)
Origem dos organismos	Gametas obtidos de organismos coletados em Santos, SP
N° de organismos/frascos	500 ovos
N° de réplicas/concentração	04
Temperatura de incubação	$24 \pm 1^\circ\text{C}$
Fotoperíodo	12 h luz : 12 h escuro
Salinidade	35‰
Duração do teste	24-30 horas
Resposta	Retardo no desenvolvimento embriolarval ou anomalias da larva <i>Pluteus</i>
Valor medido	CENO(I) (maior concentração nominal da amostra no início do ensaios que não causa efeito significativamente diferente do controle) CEO(I) (menor concentração nominal da amostra no início do ensaio que causa efeito significativamente diferente do controle)

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No ensaio de toxicidade aguda com *M. juniae*, os dados foram analisados a partir do percentual de indivíduos mortos após 96 horas de incubação considerando as três réplicas. Os valores de $CL(I)_{50}$ para a amostra e para o Zinco foram determinados pelo método de *Trimmed Spearman-Kärber*. O ensaio foi considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle foi maior ou igual a 90%.

No ensaio de toxicidade crônica de curta duração com *L. variegatus*, os dados foram analisados a partir da média e do erro-padrão da média das réplicas. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos utilizou-se a análise de variância seguida do teste de Dunnett (comparações múltiplas com o controle) com nível de significância de 5%. Para obtenção dos valores de $CENO(I)$ e $CEO(I)$, os resultados obtidos nas menores concentrações ensaiadas para o efluente e para o sulfato de zinco foram comparados com o controle de cada teste através de análise de variância com nível de significância de 5%. A $CE(I)_{50}$ foi obtida para a substância de referência através da análise por regressão não linear da curva de inibição do desenvolvimento embrionário utilizando o programa GraphPad Prism versão 3.00 (GraphPad Software, Inc.), juntamente com o intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

TABELA III - Parâmetros físico-químicos da amostra **ID 43659** coletada no navio tanque da plataforma de Curimã no início e ao término dos ensaios.

Inicial			
Concentração (%)	Salinidade	OD (mg/L)	pH
0,39	36	6,31	7,98
0,78	36	6,32	7,99
1,56	36	6,75	8,11
3,12	37	6,73	8,10
6,25	37	6,76	8,15
Água do mar controle	36	6,03	7,94
Final			
Concentração (%)	Salinidade	OD (mg/L)	pH
0,39	36	4,25	7,60
0,78	35	4,05	7,71
1,56	36	3,01	7,76
3,12	36	3,56	7,60
6,25	36	3,06	7,74
Água do mar controle	36	5,84	7,43

*a salinidade da amostra a 100% de 62 foi ajustada para 36 pela adição de água destilada.

Tabela IV - Dados do teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*

C – controle obtido com a água de diluição.

Amostra testada ID 43659

Resposta do ensaio letalidade

Início do teste: 05/06/12 **Fim do teste:** 09/06/12

DILUIÇÃO (%)	No. de misidáceos vivos					Mortalidade após 96 h (%)
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
C	10	10	10	10	09	7,5
	10	10	10	09	09	
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	09	
0,19	10	00	00	00	00	90,0
	10	01	00	00	00	
	10	02	01	01	01	
	10	07	03	03	03	
0,39	10	10	10	09	09	67,5
	10	10	07	05	05	
	10	09	07	07	05	
	10	10	08	08	08	
0,78	10	09	06	05	02	87,5
	10	08	06	05	05	
	10	08	07	05	02	
	10	08	07	05	04	
1,56	10	05	04	02	08	87,5
	10	09	07	06	05	
	10	05	02	01	00	
	10	08	06	05	01	
3,12	10	07	02	01	00	100,0
	10	07	04	01	00	
	10	06	03	03	00	
	10	05	05	02	00	
CL₅₀ < 0,19%						

Tabela V – Série histórica (2006-2012) dos dados de toxicidade do efluente da Plataforma Curimã na Bacia do Ceará. Os dados de CL(I)₅₀ foram obtidos no ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* e os dados de CENO(I) e CEO(I) foram obtidos no ensaio de toxicidade crônica de curta duração com o ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

Amostra	Data de coleta	CL(I)₅₀ (%)	CENO(I) (%)	CEO(I) (%)
01	27/03/2006	1,56	2,62	5,25
02	08/01/2007	6,25	3,13	6,25
03	02/07/2007	3,39	1,56	3,12
04	23/06/2008	<0,39	n.d.	0,39
05	19/04/2009	9,28	1,10	2,20
06	23/08/2009	2,74	0,78	1,56
07	30/08/2010	9,38	0,39	0,78
08	11/04/2011	<0,78	0,39	0,78
09	31/10/2011	3,32	3,12	6,25
10	31/10/2011	0,19	n.d.	0,78
11	07/05/2012	<0,19	-	-
12	03/09/2012	3,12	1,56	3,12

n.d. = não determinado pois a toxicidade já foi significativa na menor dose.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo propôs a avaliação dos efeitos tóxicos de uma amostra de efluente coletada na plataforma de Curimã (PCR-01) no estado Ceará (**ID 43659**), utilizando o ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*. A amostra **ID 43659** apresentou $CL(I)_{50}$ menor que 0,19%, menor concentração testada. Com relação aos parâmetros físico-químicos determinados, a salinidade da amostra original foi 62 sendo ajustadas para 36 por adição de água destilada para realização dos ensaios. A partir dessa correção, todas as diluições ensaiadas tiveram salinidade, pH e oxigênio dissolvido adequados para os ensaios.

Como mencionado anteriormente, não foi possível realizar o teste crônico com a amostra **ID 43659** devido a problemas técnicos no laboratório (justificativa ao final deste relatório). Deste modo, incluímos uma tabela (tabela V) com uma série histórica dos dados de toxicidade obtidos para esse efluente entre os anos de 2006 e 2012. Como pode ser observado os valores de $CL(I)_{50}$ variam de menor que 0,19% até 9,38%, enquanto que os valores de CEO(I) variam de 0,39 a 6,25%. É importante ressaltar que via de regra há uma boa correlação entre os resultados dos testes agudos e crônicos, onde os menores valores de CENO(I) e CEO(I) correspondem aos menores valores de $CL(I)_{50}$. Entretanto, existem exceções, como por exemplo para a amostra coletada em 30/08/2010 que apresentou o maior valor de $CL(I)_{50}$ (9,38%), mas apresentou valores baixos de CENO(I) e CEO(I) de 0,39% e 0,78%, respectivamente. É difícil inferir sobre a toxicidade crônica da amostra **ID 43659**, mas podemos esperar elevada toxicidade crônica, uma vez que a mesma apresentou o menor valor de $CL(I)_{50}$ da série histórica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, 2005. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – método de ensaio com misidáceo (Crustácea). NBR 15308. 17pp.

ABNT, 2007. Ecotoxicologia aquática - Preservação e Preparo de amostra. NBR 15469. 7pp.

BADARÓ-PEDROSO, C. Toxicidade crônica de amostras do canal de São Sebastião e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (Crustácea – Mysidacea). Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, 165p. 1993.

CETESB. Água do mar – Teste de Toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* Silva 1979 (Crustácea-Mysidacea). Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB, 1992b.

MASTROTI, R. R. Toxicidade e biodegradabilidade de tansoativos aniônicos em água do mar. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo. 112 p. 1997.

ZAMBONI, A. J. Avaliação da qualidade de água e sedimentos do canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 153 p. 1993.

Fortaleza, 17 de julho de 2012.



Letícia Veras Costa Lotufo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
Av. da Abolição 3207, Meireles
CEP.: 60.165-081 Fortaleza – Ceará – Brasil
Tel. (85) 3242-6422 / Telefax (85) 3242-8355

Justificativa

Fortaleza, 18 de julho de 2012.

Venho por meio desta esclarecer o motivo da ausência de dados da análise da toxicidade crônica das amostras (**ID 43659**) coletadas na bacia do Ceará em 23 de abril de 2012. A análise de toxicidade crônica realizada com base na Norma ABNT NBR 15.350 utilizando o teste de toxicidade crônica de curta duração em embriões do ouriço *Lytechinus variegatus* infelizmente não pode ser realizada por problemas técnicos de contaminação durante o transporte das amostras para o laboratório do Professor Dênis Abessa em São Vicente, São Paulo onde são realizados esses ensaios.

Sem mais para o momento, agradeço a atenção e coloco-me à disposição para futuros esclarecimentos.

Cordialmente,

DRA. LETÍCIA VERAS COSTA-LOTUFO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.