



LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA MARINHA

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

Relatório No. 01/2013

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

Equipe:

Denis Abessa

Allyson Queiroz

Lucas Buruaem

FORTALEZA - CEARÁ

Fevereiro - 2013

ÍNDICE

1.

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**

3.7 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 59929), no dia 03 de setembro de 2012. A salinidade da amostra original foi 80 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 59929 apresentou CL(I)₅₀ menor que 3,12%, menor concentração testada no ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*, enquanto que no ensaio de toxicidade crônica de curta duração com embriões de *Lytechinus variegatus*, apresentou valor de CENO(I) de 1,56% e valor de CEO(I) de 3,12%,

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 59929), no dia 03 de setembro de 2012, empregando o ensaio de toxicidade crônica de curta duração com embriões do ouriços do mar *Lytechinus variegatus* (CETESB 1992a; ABNT, 2006) e o ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* (CETESB, 1992b, ABNT, 2005).

O ensaio de toxicidade crônica de curta duração com o ouriço do mar *Lytechinus variegatus* avalia os efeitos sub-letais de contaminantes presente na água marinha ou intersticial de sedimentos sobre embriões de ouriços do mar, como retardamento no crescimento ou aparecimento de deformidades na larva *pluteus* (CETESB 1992a; Zamboni, 1993; Mastroti, 1997; ABNT, 2006). Por outro lado, 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) Essas espécies 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.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Amostra 01: ID 59929

Local de coleta: PCR-01 Montante do Sump

Data da Coleta: 03/09/2012

Data do recebimento: 04/09/2012

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 80. Sendo assim, para a realização dos ensaios, a salinidade foi ajustada pela adição de água destilada para 35. O ensaio de toxicidade aguda com *M. juniae* foi realizado em concentrações que variaram de 3,12 a 50%, enquanto que para o teste de toxicidade crônica com *L. variegatus* as concentrações variaram de 1,56 a 50%. O preparo das amostras seguiu a norma ABNT NBR-15469 de março de 2007.

3.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Como sugerido pelas Normas CETESB L5.250 e L5.251, e mais recentemente pelas normas técnicas da ABNT NBR 15.308 e 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, enquanto que o ensaio de toxicidade crônica de curta duração com embriões de *L. variegatus* foi realizado com concentrações que variaram de 0,014 a 0,227 mg de Zinco/L. Os valores médios obtidos no laboratório de $CL(I)_{50}$ e $CE(I)_{50}$, $0,29 \pm 0,01$ ($n = 3$, coeficiente de variação = 8,58%) e $0,059 \pm 0,008$ mg/L ($n = 15$, coeficiente de variação de 55,11%) respectivamente, ressaltam a sensibilidade dos organismos e estão compatíveis 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 da amostra. As concentrações testadas foram 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50%. 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 II – 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 libitum</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(I) ₅₀

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

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 III – 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)

3.7 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 desvio-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 59929** coletada no navio tanque da plataforma de Curimã no início e ao término dos ensaios.

Inicial			
Concentração (%)	Salinidade	OD (mg/L)	pH
3,125	35	7,96	7,25
6,25	35	8,00	7,29
12,5	35	8,10	7,49
25	35	8,24	7,51
50	35	8,45	7,49
Água do mar controle	35	7,76	7,47
Final			
Concentração (%)	Salinidade	OD (mg/L)	pH
3,125	35	4,34	7,50
6,25	35	4,17	7,47
12,5	35	4,25	7,48
25	35	4,10	7,45
50	35	3,18	7,49
Água do mar controle	35	4,99	7,49

*a salinidade da amostra a 100% de 80 foi ajustada para 35 pela adição de água destilada.

TABELA IV – Resultados do ensaio de toxicidade crônica de curta duração com ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus*.

Amostra testada ID 59929

Resposta do ensaio Anormalidades na larva

Início do teste 09/01/2013

Final do teste 10/01/2013

Diluições	replica 1	replica 2	replica 3	replica 4	média	DP
50%	0	0	0	0	0*	0
25%	0	0	0	0	0*	0
12,50%	0	0	0	0	0*	0
6,25%	80	72	69	78	74,8*	5,1
3,12%	86	83	80	89	84,5*	3,9
1,56%	91	93	89	80	88,2	5,7
controle	96	93	97	90	94	3,2
CENO(l) = 1,56%; CEO(l) = 3,12%						

C – controle obtido com a água de diluição; *(asterisco) diferença significativa $p < 0,05$, ANOVA seguida do Testes de Dunnett. n.d. = não determinado.

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

C – controle obtido com a água de diluição.

Amostra testada ID 59929

Resposta do ensaio letalidade

Início do teste: 23/10/12 **Fim do teste:** 27/10/12

DILUIÇÃO (%)	No. de misidáceos vivos					Mortalidade após 96 h
	0 h	24 h	48h	72 h	24 h	
C	10	10	09	09	09	7,50
	10	10	10	10	10	
	10	09	09	09	09	
	10	10	09	09	09	
3,125	10	09	07	05	00	77,5
	10	09	08	04	04	
	10	10	10	08	02	
	10	09	08	07	03	
6,25	10	08	06	05	01	97,5
	10	09	09	02	00	
	10	09	08	05	00	
	10	10	08	06	00	
12,5	10	09	01	00	00	100,00
	10	09	00	00	00	
	10	08	01	00	00	
	10	09	01	00	00	
25	10	04	00	00	00	100,00
	10	03	00	00	00	
	10	03	00	00	00	
	10	01	00	00	00	
50	10	00	00	00	00	100,00
	10	00	00	00	00	
	10	00	00	00	00	
	10	00	00	00	00	
CL₅₀ < 3,12%						

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 59929), utilizando dois ensaios de toxicidade, um agudo e um crônico, com invertebrados marinhos.

A amostra ID 59929 apresentou $CL(I)_{50}$ menor que 3,12% menor concentração testada no ensaio de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*, enquanto que no ensaio de toxicidade crônica de curta duração com embriões de *Lytechinus variegatus*, apresentou valor de CENO(I) de 1,56% e valor de CEO(I) 3,12%.

Com relação aos parâmetros físico-químicos determinados, a salinidade da amostra original foi 80 sendo ajustada para 35 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.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT, 2006. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). NBR 15350. 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 crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. (Echinodermata, Echinoidea). Norma Técnica L5.250. São Paulo, CETESB, 1992.

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, 01 de fevereiro de 2013.



Letícia Veras Costa Lotufo