

**ANEXO II.2-3 - TESTE DE TOXICIDADE DE ÓLEO  
PRODUZIDO**



**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus***



CONFIDENCIAL

**Relatório Final RL1206/2008 – 2.0 LYC**  
16 de Abril de 2008

**Título do Estudo**  
Teste de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus*  
para a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS

**Patrocinador**  
CTQ ANÁLISES QUÍMICAS E AMBIENTAIS S/S LTDA.  
Estrada de Ferro Santos-Jundiaí, KM 38 – 09154-100  
Santo André, SP.

**Laboratório executor**  
TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábria, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

Página 1 de 10

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*



CONFIDENCIAL 2

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO.....	3
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
1. Dados da substância-teste.....	5
2. Dados dos organismos-teste .....	5
3. Condições de teste.....	5
4. Aclimação e controle de sensibilidade .....	6
5. Procedimentos .....	6
6. Análises estatísticas.....	7
RESULTADOS .....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	8
TABELA .....	9
ANEXO I.....	10

RL1206/2008 – 2.0 LYC

Rua Fabia, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 3

## DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, requerido pela empresa CTQ ANÁLISES QUÍMICAS E AMBIENTAIS S/S LTDA., foi conduzido dentro dos preceitos estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA, à Rua Fábria, 59-São Paulo – SP.

Maria fernanda romanelli  
MARIA FERNANDA ROMANELLI  
Bióloga (MSc)  
CRBio 35816/01-D

16/04/08

[Assinatura]  
CTQ Análises Químicas e Ambientais S/S LTDA.  
Patrocinador

24/04/08

RL1206/2008 – 2.0 LYC

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 4

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica da **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), verificando a ocorrência de retardamento no desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas pluteus. Foi preparada a fração dispersa em água (FDA) da amostra. O teste foi realizado utilizando-se as seguintes concentrações: 1,56% FDA; 3,13% FDA; 6,25% FDA; 12,50% FDA; 25,00% FDA; 50,00% FDA e 100,0% FDA. Quatro réplicas com cerca de 300 ovos recém-fecundados cada foram expostas por 24 horas a um controle com água marinha e a cada concentração de FDA. Após o período de exposição, foi observado que nenhuma das concentrações preparadas exerceu efeitos tóxicos significativos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) não pode ser estimada, sendo considerada superior a 100,0% FDA. Adicionalmente, a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) não pode ser estimada, sendo considerada maior que 100,0% FDA.

## ABSTRACT

This study was carried out to determine the chronic toxicity of the **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** to embryo-larval development of sea urchin (*Lytechinus variegatus*). The water dispersed fraction (WDF) of the sample was prepared. The following concentrations were used in the test: 1.56% WDF; 3.13% WDF; 6.25% WDF; 12.50% WDF; 25.00%; WDF; 50.00% WDF and 100.0% WDF. Four groups of 300 eggs newly fertilized were exposed during 24 hours to control (synthetic seawater) and each WDF concentration. After the exposure period, no concentration showed chronic toxicity to sea urchin, when compared to the control. Therefore, under the test conditions, the no observed effect concentration (NOEC) was considered higher than 100.0% WDF. Furthermore, the median inhibition concentration (24-h IC50) was considered higher than 100. 0% WDF.

RL1206/2008 – 2.0 LYC

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 5

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica da AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), com base no grau de desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas. Após o período de 24 a 28 horas, os ovos recém-fecundados devem se desenvolver até o estágio de larva pluteus, a menos que a amostra exerça efeitos tóxicos durante este período de exposição.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada segue a Norma ABNT NBR 15350:2006 (ABNT, 2006).

**1. Dados da substância-teste**

Nome comercial: AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS.

Protocolo nº: 1206/2008-2.0.

Data de entrada: 11/01/2008.

Acondicionamento: frasco plástico.

Estado Físico: Líquido.

**2. Dados dos organismos-teste**

Espécie: *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Idade: ovos fecundados em laboratório, utilizados até 30 minutos após a fecundação.

**3. Condições de teste**

Data de início: 09/04/2008.

Data de término: 10/04/2008.

Temperatura média da água:  $26,0 \pm 0,5$  °C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

RL1206/2008 – 2.0 LYC

Rua Fábria, 69  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-9954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus***

CONFIDENCIAL 6

**4. Aclimação e controle de sensibilidade**

Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas de isopor, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas plásticas contendo água marinha sintética e aeração intensa. A água marinha foi preparada a partir de sal comercial marca Coral Reef Red Sea Salt<sup>®</sup>, com salinidade entre 32 e 35‰.

Simultaneamente ao teste com a amostra, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração de inibição (CI50; 24h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,122mg Zn/L (I.C.: 0,119 a 0,125mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários testes (Anexo 1), indica uma CI50; 24h média de 0,105mg Zn/L, com limites de controle (média  $\pm$  2.desvios-padrão) de 0,056 a 0,154mg Zn/L. Portanto, o resultado do teste simultâneo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste.

**5. Procedimentos**

Foi utilizada a metodologia de preparo da fração dispersa em água (FDA) da amostra, segundo ABNT (2007). Uma solução de 1000mg/L da amostra em água marinha sintética foi preparada utilizando-se um agitador industrial para dispersão física. A amostra foi adicionada à água e a mistura foi submetida à agitação durante 5 segundos, a uma velocidade de 12000rpm. Após a dispersão, a mistura permaneceu sob agitação magnética lenta durante o preparo das seguintes soluções-teste: 1,56% FDA; 3,13% FDA; 6,25% FDA; 12,50% FDA; 25,00% FDA; 50,00% FDA e 100,0% FDA.

Os gametas masculinos e femininos foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5M na região perioral dos animais adultos, conforme metodologia descrita em ABNT (2006). A fecundação foi feita "in vitro" e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação.

As soluções-teste foram transferidas para tubos de ensaio, em alíquotas de 10mL, sendo preparadas quatro réplicas para cada concentração e nove para o controle

RL1206/2008 - 2.0 LYC

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954



Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 7

com água de diluição. Uma réplica extra de algumas concentrações, com 20mL de solução, foi preparada para realização das análises físico-químicas no final do teste. Com um micro-pipetador, um volume equivalente a 300 ovos foi transferido para cada tubo de ensaio.

Após 24 horas de incubação, um dos tubos do controle foi retirado e o estágio de desenvolvimento de 100 embriões foi avaliado. O teste foi encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido (ABNT, 2006).

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5mL de formol tamponado. Uma sub-amostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgewick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus normais e anormais em cada réplica e concentração.

No início e no final do teste foram realizadas análises de pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água de diluição (controle) e de quatro concentrações da amostra.

#### 6. Análises estatísticas

O grau de desenvolvimento embrio-larval observado no controle e nas soluções-teste foi analisado para obtenção das seguintes estimativas:

Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO), respectivamente a maior concentração da amostra que não causa efeitos significativos no crescimento dos organismos e a menor concentração que causa efeitos significativos, estimados através do teste de normalidade de Chi-Quadrado (USEPA, 2002), do teste de Bartlett para homogeneidade de variância (USEPA, 2002) e do teste de Williams (Gelber et al, 1985; Williams, 1971, 1972). A partir da média geométrica entre CENO e CEO, foi obtido o valor crônico (VC).

RL1206/2008 – 2.0 LYC

Rua Fábila, 59  
06061-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3673-2553 • Fax: (11) 3882-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 8

. Concentração de inibição mediana (CI50; 24h - concentração que causa inibição no desenvolvimento de 50% dos organismos após 24 horas de exposição) e intervalo de 95% de confiança, estimados através do método de interpolação linear (USEPA, 2002).

### RESULTADOS

O resultado do teste com a **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** está apresentado na Tabela 1, com dados de efeito tóxico e análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2006).

A aplicação das análises estatísticas indicou que nenhuma das concentrações preparadas exerceu efeitos tóxicos crônicos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) não pode ser estimada, sendo considerada superior à maior concentração preparada da fração dispersa em água (100,0% FDA). A concentração de efeito observado (CEO) e o valor crônico (VC) também não puderam ser estimados.

Devido aos resultados obtidos, a aplicação de outra metodologia de análise estatística não pode ser realizada e a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) da fração acomodada em água foi considerada maior que 100,0 % FDA.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma NBR 15350. Rio de Janeiro, ABNT, 17 p., 2006.
- ABNT Ecotoxicologia aquática – Preservação e preparo de amostras. Norma NBR 15469. Rio de Janeiro, ABNT, 7 p., 2007.

RL1206/2008 – 2.0 LYC

Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 9

Gelber, R.D.; Lavin, P.T.; Mehta, C.R.; Schoenfeld, D.A. Statistical analysis. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, Hemisphere Publ. Co., p. 110-23, 1985.

USEPA **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. 4.ed. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EPA-821-R-02-013. 2002.

Williams, D.A. A test for differences between treatment means when several doses levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v. 27, p. 103-17, 1971.

Williams, D.A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. **Biometrics**, v. 28, p.519-31, 1972.

## TABELA

**Tabela 1** – Resultados de toxicidade e análises físicas e químicas (iniciais e finais) obtidas no teste de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus* para a fração dispersa em água (FDA) da AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, após o período de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	13	8,00	7,67	32	32	6,31	4,88
1,56% FDA	11	7,99	7,63	32	32	6,31	4,79
3,13% FDA	15	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
6,25% FDA	9	8,02	7,69	32	32	6,26	4,74
12,50% FDA	8	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
25,00% FDA	10	8,01	7,61	32	32	6,19	4,75
50,00% FDA	17	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
100,0% FDA	14	8,05	7,66	32	32	6,25	4,77

N.A.: Não analisado.

RL1206/2008 – 2.0 LYC

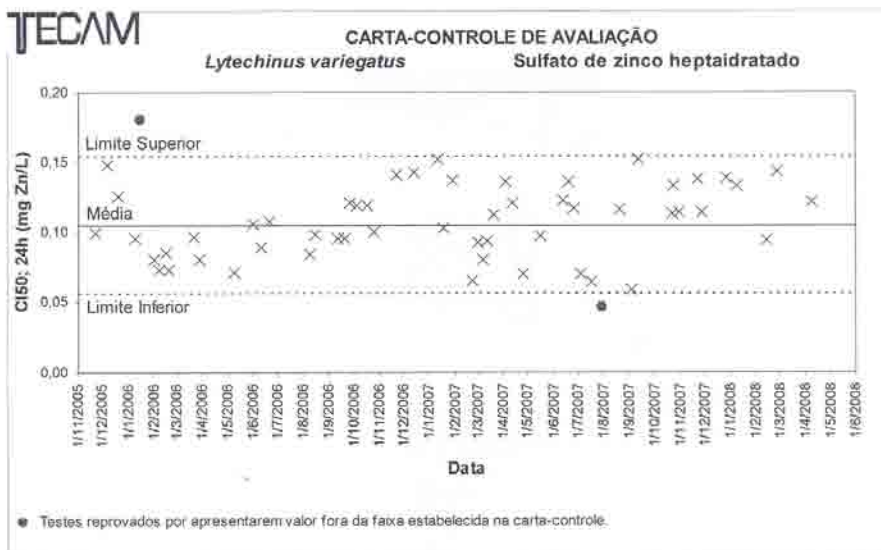
Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3882-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*



CONFIDENCIAL 10

ANEXO I



RL.1206/2008 -- 2.0 LYC

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: [11] 3873-2553 • Fax: [11] 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus***



CONFIDENCIAL

**Relatório Final RL0181/2008 – 2.1 LYC**  
11 de Março de 2008

**Título do Estudo**

Teste de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus*  
para o produto AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS

**Patrocinador**

CTQ Análises Químicas e Ambientais S/S LTDA.  
Estrada de Ferro Santos-Jundiá, KM 38, s/n. – 09154-100.  
Santo André – SP.

**Laboratório executor**

TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábria, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

Este relatório cancela e substitui o relatório N° 0181/2008 – 2.0 LYC.

Página 1 de 12

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*



CONFIDENCIAL 2

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
1. Dados da substância-teste.....	6
2. Dados dos organismos-teste.....	6
3. Condições de teste.....	6
4. Aclimação e controle de sensibilidade.....	7
5. Procedimentos.....	7
6. Análises estatísticas.....	8
RESULTADOS.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
TABELA.....	11
ANEXO I.....	12

RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fátima, 59  
05061-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus***

CONFIDENCIAL 3

**DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com o produto AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, requerido pela empresa CTQ ANÁLISES QUÍMICAS E AMBIENTAIS S/S LTDA, foi conduzido dentro dos preceitos estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA, à Rua Fábria, 59-São Paulo – SP.

11/03/08

MARIA FERNANDA ROMANELLI  
Bióloga (MSc)  
CRBio 35816/01-D

CTQ ANÁLISES QUÍMICAS E  
AMBIENTAIS S/S LTDA.  
Patrocinador

16/04/08

RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3882-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 4

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), verificando a ocorrência de retardamento no desenvolvimento embrião-larval e/ou anomalias em ovos e larvas pluteus. Foi preparada uma mistura 1:9 da amostra com água marinha e a fração hidrossolúvel (FHS) foi utilizada para preparar as seguintes concentrações: 1,56% FHS, 3,13% FHS, 6,25% FHS; 12,50% FHS; 25,00% FHS; 50,00% FHS e 100,0% FHS. Quatro réplicas com cerca de 300 ovos recém-fecundados cada foram expostas por 24 horas a um controle com água marinha e a cada concentração de FHS do produto. Após o período de exposição, foi observado que as concentrações superiores a 50,00% FHS exerceram efeitos tóxicos significativos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Desta forma, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 25,00% FHS, a concentração de efeito observado (CEO) em 50,00% FHS e o valor crônico (VC) em 35,36% FHS. Adicionalmente, a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) foi estimada em 73,81% FHS, com intervalo de 95% de confiança de 72,63 a 74,84% FHS.

## ABSTRACT

This study was carried out to determine the chronic toxicity of the product **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** to embryo-larval development of sea urchin (*Lytechinus variegatus*). A 1:9 sample to seawater mixture was prepared and the water-soluble fraction (WSF) solution was diluted to the following concentrations: 1.56% WSF; 3.13% WSF; 6.25% WSF; 12.50% WSF; 25.00% WSF; 50.00% WSF and 100.0% WSF. Four groups of 300 eggs newly fertilized were exposed during 24 hours to control (synthetic seawater) and each WSF concentration. After the exposure period, concentrations higher than 50.00% WSF showed chronic toxicity to sea urchin, when compared to the control. Therefore, under the test conditions, the no observed effect

RL0181/2008 - 2.1 LYC

Rua Fábrica, 59  
05061-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 0882-8954



Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*



CONFIDENCIAL 5

concentration (NOEC) was estimated in 25.00% WSF, the lowest observed effect concentration (LOEC) was 50.00%, and the chronic value (CV) was 35.36% WSF. Furthermore, the median inhibition concentration (24-h IC50) was estimated in 73.81% WSF, with 95% confidence limits of 72.63 to 74.84% WSF.

RL0181/2008 - 2.1 LYC

Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus***

CONFIDENCIAL 6

**INTRODUÇÃO**

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade crônica do produto **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** para embriões de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*), com base no grau de desenvolvimento embrio-larval e/ou anomalias em ovos e larvas. Após o período de 24 a 28 horas, os ovos recém-fecundados devem se desenvolver até o estágio de larva pluteus, a menos que o produto exerça efeitos tóxicos durante este período de exposição.

**MATERIAIS E MÉTODOS**

A metodologia adotada segue a Norma ABNT NBR 15350:2006 (ABNT, 2006).

**1. Dados da substância-teste**

Identificação: **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS**.

Protocolo nº: 0181/2008.

Data de entrada: 11/01/2008.

Acondicionamento: frasco plástico.

Estado Físico: Líquido.

**2. Dados dos organismos-teste**

Espécie: *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Idade: ovos fecundados em laboratório, utilizados até 30 minutos após a fecundação.

**3. Condições de teste**

Data de início: 14/02/2008.

Data de término: 15/02/2008.

Temperatura média da água:  $26,0 \pm 0,0$  °C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fábria, 53  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3362-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL

7

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

#### 4. Aclimatação e controle de sensibilidade

Animais adultos foram coletados por mergulho na região costeira próxima ao CEBIMAR-USP (São Sebastião - SP) e colocados em caixas de isopor, protegidos por macroalgas coletadas no mesmo local. No laboratório, foram transferidos para caixas plásticas contendo água marinha sintética e aeração intensa. A água marinha foi preparada a partir de sal comercial marca Coral Reef Red Sea Salt<sup>®</sup>, com salinidade entre 32 e 35‰.

Simultaneamente ao teste com a amostra, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração de inibição (CI50; 24h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 0,046mg Zn/L (I.C.: 0,092 a 0,097mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários testes (Anexo 1), indica uma CI50; 24h média de 0,105mg Zn/L, com limites de controle (média  $\pm$  2.desvios-padrão) de 0,056 a 0,154mg Zn/L. Portanto, o resultado do teste simultâneo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste.

#### 5. Procedimentos

A amostra foi homogeneizada manualmente e uma alíquota de 200mL foi retirada, diluída com 1800mL de água marinha sintética (diluição 1:9) e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 20 horas. Esta mistura foi colocada em funil de separação e mantida em repouso para decantação por uma hora. Por se tratar de amostra oleosa, a porção inferior da mistura (fase aquosa) foi retirada para utilização no teste, sendo considerada a fase hidrossolúvel (FHS) da amostra. As seguintes soluções-teste foram preparadas: 1,56% FHS; 3,13% FHS; 6,25% FHS; 12,50% FHS; 25,00% FHS; 50,00% FHS e 100,0% FHS.

Os gametas masculinos e femininos foram obtidos através de injeção de solução de cloreto de potássio 0,5M na região perioral dos animais adultos, conforme

RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fabris, 58  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus***

CONFIDENCIAL 8

metodologia descrita em ABNT (2006). A fecundação foi feita “in vitro” e os embriões obtidos foram utilizados até 30 minutos após a fecundação.

As soluções-teste foram transferidas para tubos de ensaio, em alíquotas de 10mL, sendo preparadas quatro réplicas para cada concentração e nove para o controle com água de diluição. Uma réplica extra de algumas concentrações, com 20mL de solução, foi preparada para realização das análises físico-químicas no final do teste. Com um micro-pipetador, um volume equivalente a 300 ovos foi transferido para cada tubo de ensaio.

Após 24 horas de incubação, um dos tubos do controle foi retirado e o estágio de desenvolvimento de 100 embriões foi avaliado. O teste foi encerrado após este período porque foi obtido o limite recomendado de mais de 80% dos embriões em estágio de larva pluteus bem desenvolvido (ABNT, 2006).

O conteúdo de cada réplica foi transferido para potes plásticos e preservado com 0,5mL de formol tamponado. Uma sub-amostra de cada réplica foi analisada ao microscópio em câmara de Sedgewick-Rafter, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos encontrados. Foi calculada a porcentagem de pluteus normais e anormais em cada réplica e concentração.

No início e no final do teste foram realizadas análises de pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água de diluição (controle) e de quatro concentrações da amostra.

**6. Análises estatísticas**

O grau de desenvolvimento embrio-larval observado no controle e nas soluções-teste foi analisado para obtenção das seguintes estimativas:

Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO), respectivamente a maior concentração do produto que não causa efeitos significativos no crescimento dos organismos e a menor concentração que causa

RL0181/2008 – 2.1.LYC

Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 9

efeitos significativos, estimados através do teste de normalidade de Chi-Quadrado (USEPA, 2002), do teste de Bartlett para homogeneidade de variância (USEPA, 2002) e do teste de Williams (Gelber et al, 1985; Williams, 1971, 1972). A partir da média geométrica entre CENO e CEO, foi obtido o valor crônico (VC).

Concentração de inibição mediana (CI50; 24h - concentração que causa inibição no desenvolvimento de 50% dos organismos após 24 horas de exposição) e intervalo de 95% de confiança, estimados através do método de interpolação linear (USEPA, 2002).

### RESULTADOS

O resultado do teste com o produto **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** está apresentado na Tabela 1, com dados de efeito tóxico e análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2006).

Após o período de exposição, foi observado um aumento na toxicidade do fluido com o aumento da concentração da fração hidrossolúvel. A aplicação das análises estatísticas indicou que as concentrações superiores a 50,00%FHS exerceram efeitos tóxicos crônicos sobre *L. variegatus*, em comparação com o controle. Assim, nas condições de teste, a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada em 25,00% FHS, a concentração de efeito observado (CEO) em 50,00% FHS e o valor crônico (VC) em 35,36% FHS.

A aplicação de outra metodologia de análise estatística indicou que a concentração de inibição mediana (CI50; 24h) do fluido pode ser estimada em 73,81% FHS, com intervalo de 95% de confiança de 72,63 a 74,84ppm FHS.

RL0181/2008 - 2.1.LYC

Rua Fábis, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL 10

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma NBR 15350. Rio de Janeiro, ABNT, 17 p., 2006.
- ABNT Ecotoxicologia aquática – Preservação e preparo de amostras. Norma NBR 15469. Rio de Janeiro, ABNT, 7 p., 2007.
- Gelber, R.D.; Lavin, P.T.; Mehta, C.R.; Schoenfeld, D.A. Statistical analysis. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington, Hemisphere Publ. Co., p. 110-23, 1985.
- USEPA **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. 4.ed. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EPA-821-R-02-013. 2002.
- Williams, D.A. A test for differences between treatment means when several doses levels are compared with a zero dose control. **Biometrics**, v. 27, p. 103-17, 1971.
- Williams, D.A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. **Biometrics**, v. 28, p.519-31, 1972.

RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*

CONFIDENCIAL

11

## TABELA

**Tabela 1** – Resultados de toxicidade e análises físicas e químicas (iniciais e finais) obtidas no teste de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus* para a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, após o período de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	20	7,84	7,64	33	32	6,25	5,18
1,56% FHS	12	7,94	7,76	33	33	6,17	5,12
3,13% FHS	14	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
6,25% FHS	16	7,93	7,84	33	33	6,17	5,70
12,50% FHS	17	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
25,00% FHS	24	7,89	7,82	33	33	6,10	5,60
50,00% FHS	29	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
100,0% FHS	90	7,74	7,60	33	33	5,45	4,64

N.A.: Não analisado.

RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fátima, 59  
01605-1-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3882-8954

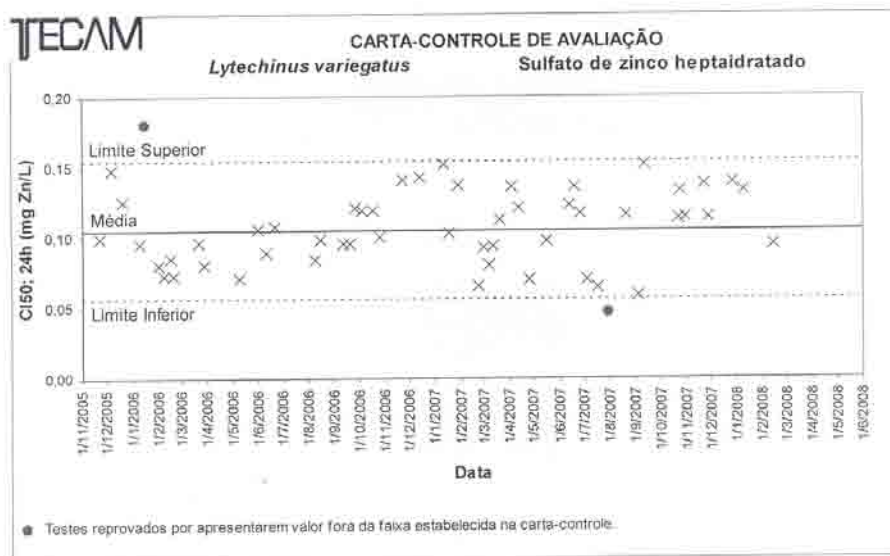
Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Lytechinus variegatus*



CONFIDENCIAL

12

ANEXO 1



RL0181/2008 – 2.1 LYC

Rua Fábis, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954



**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***



CONFIDENCIAL

**Relatório Final RL1206/2008 – 1.0 MYA**  
09 de Abril de 2008

**Título do Estudo**  
Teste de Toxicidade Aguda com *Mysidopsis juniae*  
para a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS

**Patrocinador**  
CTQ ANÁLISES QUÍMICAS E AMBIENTAIS S/S LTDA.  
Estrada de Ferro Santos-Jundiaí, KM 38 – 09154-100  
Santo André, SP.

**Laboratório executor**  
TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábía, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

Página 1 de 9

Rua Fábía, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*



CONFIDENCIAL 2

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO.....	3
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
1. Dados da substância-teste.....	5
2. Dados dos organismos-teste .....	5
3. Condições de teste .....	5
4. Aclimação e controle de sensibilidade .....	6
5. Procedimentos .....	6
6. Análise estatística .....	7
RESULTADOS .....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
TABELA .....	8
ANEXO 1 .....	9

RL1206/2008 – 1.0 MYA

Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***


CONFIDENCIAL 3

**DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, requerido pela empresa CTQ ANÁLISES QUÍMICAS E AMBIENTAIS S/S LTDA., foi conduzido dentro dos preceitos de qualidade estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA, à Rua Fábria, 59-São Paulo – SP.

*Maria Fernanda Romanelli*  
MARIA FERNANDA ROMANELLI  
Bióloga (MSc)  
CRBio 35816/01-D

09 / 04 / 08

  
CTQ Análises Químicas e Ambientais S/S LTDA.  
Patrocinador

24 / 04 / 08

RL1206/2008 – 1,0 MYA

Rua Fábria, 59  
05081-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*

CONFIDENCIAL 4

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda da AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS para *Mysidopsis juniae*. Foi preparada a fração dispersa em água (FDA) da amostra. O teste foi realizado utilizando-se as seguintes concentrações: 6,25% FDA; 12,50% FDA; 25,00% FDA; 50,00% FDA e 100,0% FDA. Três réplicas de dez animais cada foram expostas a um controle com água marinha sintética e a cada concentração da FDA por 96 horas. Após o período de exposição, a concentração letal mediana (CL50; 96h) foi estimada através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton et al, 1977). A CL50; 96h da FDA, nas condições de teste, foi estimada em aproximadamente 85,22% FDA.

## ABSTRACT

This study was carried out to determine the acute toxicity to *Mysidopsis juniae* of the AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS. The water dispersed fraction (WDF) of the sample was prepared. The following concentrations were used in the test: 6.25% WDF; 12.50% WDF; 25.00% WDF; 50.00% WDF and 100.0% WDF. Three replicates with ten animals were exposed to the control (synthetic seawater) and each WDF concentration for 96 hours. After the period of exposure, the median lethal concentration (96-h LC50) was estimated using the trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton et al, 1977). Under the test conditions, the 96-h LC50 of the WDF was estimated in approximately 85.22% WDF.

RL1206/2008 – I.0 MYA

Rua Fátima, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***



CONFIDENCIAL 5

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda da **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** para jovens *Mysidopsis juniae*. Após 96 horas de exposição, deve ser estimada a concentração letal mediana da amostra, isto é, a concentração que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos, nas condições teste - CL50; 96h.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada segue a Norma ABNT NBR 15308:2005 (ABNT, 2005).

### 1. Dados da substância-teste

Nome comercial: **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS**.

Protocolo nº: 1206/2008.

Data de entrada: 11/01/2008.

Acondicionamento: frasco plástico.

Estado Físico: Líquido.

### 2. Dados dos organismos-teste

Espécie: *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea).

Idade: 2 a 5 dias.

### 3. Condições de teste

Data de início: 18/03/2008.

Data de término: 22/03/2008.

Temperatura média da água:  $23,0 \pm 1,0$  °C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

Aeração: não.

Duração: 96 horas.

RL1206/2008 – 1.0 MYA

Plus Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***

CONFIDENCIAL 6

**4. Aclimação e controle de sensibilidade**

Os jovens utilizados no teste foram obtidos junto a um laboratório particular e aclimatados às mesmas condições de teste por no mínimo 24 horas antes do início do teste. A manutenção dos animais foi feita com água marinha sintética, preparada a partir de sal comercial marca Coral Reef Red Sea Salt<sup>®</sup>, com salinidade entre 32 e 35‰.

Periodicamente, os organismos-teste são submetidos a um teste de sensibilidade com a substância de referência, sulfato de zinco. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL(I)50; 96h média de 0,22mg Zn/L, com limites de controle (média  $\pm$  2.desvios-padrão) de 0,11 a 0,34mg Zn/L (Anexo 1). O último teste realizado, correspondente ao período de avaliação do presente estudo, apresentou uma concentração letal mediana de 0,30mg Zn/L, com intervalo de confiança de 0,28 a 0,33mg Zn/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste.

**5. Procedimentos**

Foi utilizada a metodologia de preparo da fração dispersa em água (FDA) da amostra, segundo ABNT (2007). Uma solução de 1000mg/L da amostra em água marinha sintética foi preparada utilizando-se um agitador industrial para dispersão física. A amostra foi adicionada à água e a mistura foi submetida à agitação durante 5 segundos, a uma velocidade de 12000rpm. Após a dispersão, a mistura permaneceu sob agitação magnética lenta durante o preparo das seguintes soluções-teste: 6,25% FDA; 12,50% FDA; 25,00% FDA; 50,00% FDA e 100,0% FDA.

Os organismos-teste foram transferidos aleatoriamente para béqueres de 30mL, contendo pequeno volume de água marinha e, em seguida, adicionados também aleatoriamente aos frascos-teste com cerca de 250mL de solução-teste. Foram colocados dez jovens em cada frasco e foram preparadas três réplicas para cada

RL1206/2008 – 1.0 MYA

Rua Fátima, 59  
05051-000 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*

CONFIDENCIAL 7

solução-teste. Um controle com três réplicas e somente com água de diluição foi preparado da mesma forma.

Diariamente, os animais mortos foram removidos e os animais vivos foram contados e alimentados com uma gota de suspensão concentrada de náuplios de *Artemia* recém-eclodidos. Também diariamente, foram realizadas análises de pH, salinidade e oxigênio dissolvido de uma réplica do controle e de três concentrações testadas da FDA.

#### 6. Análise estatística

Após 96 horas de exposição, a concentração letal mediana (CL50; 96h) foi estimada através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton et al, 1977).

### RESULTADOS

O resultado do teste com a **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** está apresentado na Tabela 1, com dados de mortalidade e análises físicas e químicas efetuadas durante o teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2005). O teste foi considerado válido, conforme estabelecido pela norma ABNT (2005), uma vez que a mortalidade obtida no controle foi inferior ao limite de 10%.

Na maior concentração testada (100,0 % FDA) foi registrada mortalidade de 60% dos animais após o período de exposição. A concentração letal mediana da fração dispersa em água da amostra, nas condições de teste, foi estimada em aproximadamente 85,22% FDA. Em função dos resultados obtidos, o intervalo de 95% de confiança não pode ser estimado.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com misidáceos (Crustacea). **Norma NBR 15308**. Rio de Janeiro, ABNT, 17 p., 2005.

RL1206/2008 – 1.0 MYA

Rua Fabião, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***


CONFIDENCIAL 8

ABNT Ecotoxicologia aquática – Preservação e preparo de amostras. **Norma NBR 15469**. Rio de Janeiro, ABNT, 7 p., 2007.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 11, p. 714-19, 1977.

**TABELA**

**Tabela 1** – Mortalidade e análises físicas e químicas (iniciais e finais) obtidas no teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* para a **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS**, após 96 horas de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH		Salinidade (%)		Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	0	7,88	7,77	32	32	6,51	5,90
6,25% FDA	3	7,90	7,80	32	32	6,46	5,82
12,50% FDA	0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
25,00% FDA	7	7,90	7,81	32	32	6,44	5,91
50,00% FDA	17	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
100,0% FDA	60	7,91	7,81	32	32	6,42	5,90

N.A.: Não analisado.

RI.1206/2008 – 1.0 MYA

Rua Fábria, 59  
06051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954



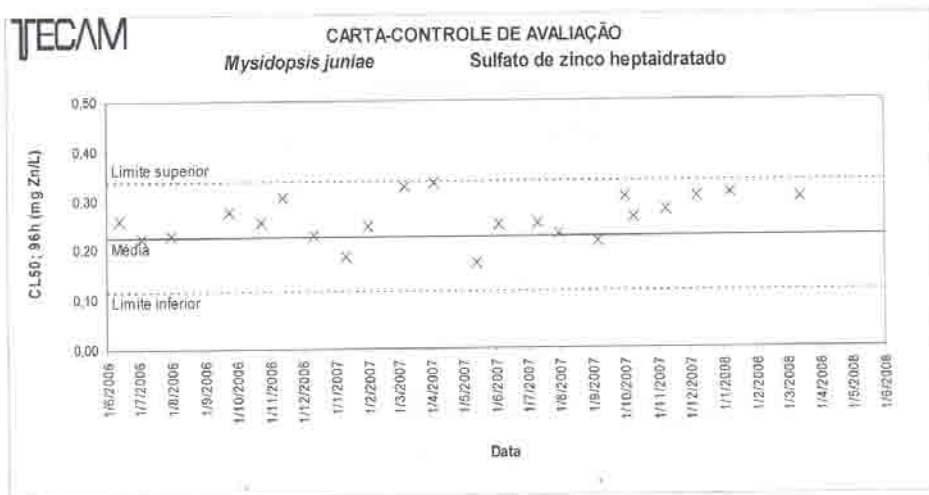
Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*



CONFIDENCIAL

9

ANEXO I



RL.1206/2008 – 1.0 MYA

Rua Fábila, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3882-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***



CONFIDENCIAL

**Relatório Final RL0181/2008 – 1.1 MYA**  
11 de Março de 2008

**Título do Estudo**  
Teste de Toxicidade Aguda com *Mysidopsis juniae*  
para a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS

**Patrocinador**  
CTQ Análises Químicas e Ambientais S/S LTDA.  
Estrada de Ferro Santos-Jundiaí, KM 38, s/n. – 09154-100.  
Santo André – SP.

**Laboratório executor**  
TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábía, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

Este relatório cancela e substitui o relatório N° 0181/2008 – 1.0 MYA.

Página 1 de 9

Rua Fábía, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*



CONFIDENCIAL 2

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO .....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
1. Dados da substância-teste .....	5
2. Dados dos organismos-teste .....	5
3. Condições de teste .....	5
4. Aclimação e controle de sensibilidade .....	6
5. Procedimentos .....	6
6. Análise estatística .....	7
RESULTADOS .....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	8
TABELA.....	8
ANEXO 1 .....	9

RL0181/2008 – 1.1 MYA


Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*


CONFIDENCIAL 3

## DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, requerido pela empresa CTQ Análises Químicas e Ambientais S/S LTDA., foi conduzido dentro dos preceitos de qualidade estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA, à Rua Fábria, 59-São Paulo – SP.

  
\_\_\_\_\_  
MARIA FERNANDA ROMANELLI  
Bióloga (MSc)  
CRBio 35816/01-D

11 / 03 / 08

  
\_\_\_\_\_  
CTQ Análises Químicas e Ambientais S/S LTDA.  
Patrocinador

16 / 04 / 08

RL0181/2008 – 1.1 MYA

Rua Fábria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*

CONFIDENCIAL 4

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda da **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** para *Mysidopsis juniae*. Foi preparada uma mistura 1:9 da amostra com água marinha e a fração hidrossolúvel (FHS) foi utilizada para preparar as seguintes concentrações: 6,25% FHS; 12,50% FHS; 25,00% FHS; 50,00% FHS e 100,0% FHS. Três réplicas de dez animais cada foram expostas a um controle com água marinha e a cada concentração da FHS por 96 horas. Após o período de exposição, foi observado um aumento da mortalidade dos animais expostos com o aumento da concentração. Com os dados de mortalidade, a concentração letal mediana após 96 horas de exposição (CL50; 96h) e respectivo intervalo de 95% de confiança foram estimados através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton *et al.*, 1977). A CL50; 96h da FHS, nas condições de teste, foi estimada em 36,21% FHS, com intervalo de 95% de confiança de 30,77 a 42,61% de FHS.

## ABSTRACT

This study was carried out to determine the acute toxicity to *Mysidopsis juniae* of the **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS**. A 1:9 sample to seawater mixture was prepared and the water-soluble fraction (WSF) solution was diluted to the following concentrations: 6.25% WSF; 12.50% WSF; 25.00% WSF; 50.00% WSF and 100.0% WSF. Three replicates with ten animals were exposed to control (synthetic seawater) and each WSF concentration for 96 hours. After the period of exposure, the median lethal concentration (96-h LC50) and 95% confidence limits were estimated using the trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton *et al.*, 1977). Under the test conditions, the 96-h LC50 of the WSF was estimated in 36.21% WSF, with 95% confidence limits of 30.77 to 42.61 % WSF.

RL0181/2008 – 1.1 MYA

Rua Fabril, 59  
06051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2653 • Fax: (11) 3862-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***

CONFIDENCIAL 5

**INTRODUÇÃO**

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda da AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS para jovens *Mysidopsis juniae*. Após 96 horas de exposição, deve ser estimada a concentração letal mediana do produto, isto é, a concentração que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos, nas condições teste - CL50; 96h.

**MATERIAIS E MÉTODOS**

A metodologia adotada segue a Norma ABNT NBR 15308:2005 (ABNT, 2005).

**1. Dados da substância-teste**

Identificação: AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS.

Protocolo nº: 0181/2008.

Data de entrada: 11/01/2008.

Acondicionamento: frasco plástico.

Estado Físico: Líquido.

**2. Dados dos organismos-teste**

Espécie: *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea).

Idade: 2 a 5 dias.

**3. Condições de teste**

Data de início: 29/01/2008.

Data de término: 02/02/2008.

Temperatura média da água:  $25,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

Aeração: não.

Duração: 96 horas.

RL0181/2008 – 1.1 MYA

Rua Fábio, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3862-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*

CONFIDENCIAL

6

**4. Aclimação e controle de sensibilidade**

Os jovens utilizados no teste foram obtidos junto a um laboratório particular e aclimatados às mesmas condições de teste por no mínimo 24 horas antes do início do teste. A manutenção dos animais foi feita com água marinha sintética, preparada a partir de sal comercial marca Coral Reef Red Sea Salt®, com salinidade entre 32 e 35‰.

Periodicamente, os organismos-teste são submetidos a um teste de sensibilidade com a substância de referência, sulfato de zinco. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL(I)50; 96h média de 0,22mg Zn/L, com limites de controle (média  $\pm$  2.desvios-padrão) de 0,11 a 0,34mg Zn/L (Anexo 1). O último teste realizado, correspondente ao período de avaliação do presente estudo, apresentou uma concentração letal mediana de 0,31mg Zn/L, com intervalo de confiança de 0,29 a 0,33mg Zn/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste.

**5. Procedimentos**

A amostra foi homogeneizada manualmente e uma alíquota de 200mL foi retirada, diluída com 1800mL de água marinha sintética (diluição 1:9) e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 20 horas. Esta mistura foi colocada em funil de separação e mantida em repouso para decantação por uma hora. Por se tratar de amostra oleosa, a porção inferior da mistura (fase aquosa) foi retirada para utilização no teste, sendo considerada a fase hidrossolúvel (FHS) da amostra. As seguintes soluções-teste foram preparadas: 6,25% FHS; 12,50% FHS; 25,00% FHS; 50,00% FHS e 100,0% FHS.

Os organismos-teste foram transferidos aleatoriamente para béqueres de 30mL, contendo pequeno volume de água marinha e, em seguida, adicionados também aleatoriamente aos frascos-teste com cerca de 250mL de solução-teste. Foram colocados dez jovens em cada frasco e foram preparadas três réplicas para cada

RL0181/2008 – I.I MYA

Rua Fébia, 59  
05051-090 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3852-8954

**Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae***

CONFIDENCIAL 7

solução-teste. Um controle com três réplicas e somente com água de diluição foi preparado da mesma forma.

Diariamente, os animais mortos foram removidos e os animais vivos foram contados e alimentados com uma gota de suspensão concentrada de náuplios de *Artemia* recém-eclodidos. Para as soluções com turbidez elevada ou com material decantado, a contagem dos animais foi realizada somente no final do teste, após o período de exposição. Também diariamente, foram realizadas análises de pH, salinidade e oxigênio dissolvido de uma réplica do controle e de três concentrações testadas.

**6. Análise estatística**

Após 96 horas de exposição, a concentração letal mediana (CL50; 96h) e respectivo intervalo de 95% de confiança foram estimados através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton *et al.*, 1977).

**RESULTADOS**

O resultado do teste com a **AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS** está apresentado na Tabela I, com dados de mortalidade e análises físicas e químicas efetuadas durante o teste. Os valores obtidos estiveram dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2005).

Foi observado um aumento da mortalidade dos animais expostos com o aumento da concentração do produto. Na maior concentração testada (100,0% FHS) foi registrada mortalidade de todos os animais após 24 horas de exposição. A concentração letal mediana da fração hidrossolúvel do produto, nas condições de teste, foi estimada em 36,21% FHS, com intervalo de 95% de confiança de 30,77 a 42,61% FHS.

**CL50;96h: 36,21% FHS. I.C.(95%): 30,77 a 42,61% FHS.**

RL0181/2008 – 1.1 MYA

Rua Fabril, 69  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2563 • Fax: (11) 3862-8954



Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*

CONFIDENCIAL

8

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com misidáceos (Crustacea). Norma NBR 15308. Rio de Janeiro, ABNT, 17 p., 2005.
- ABNT Ecotoxicologia aquática – Preservação e preparo de amostras. Norma NBR 15469. Rio de Janeiro, ABNT, 7 p., 2007.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v. 11, p. 714-19, 1977.

## TABELA

**Tabela 1** – Mortalidade e análises físicas e químicas (iniciais e finais) obtidas no teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* para a AMOSTRA 01-3-ESP-22D-RJS, após 96 horas de exposição.

Concentração	Efeito (%)	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7	7,88	7,47	32	32	6,50	4,91
6,25% FHS	0	8,01	7,71	32	32	6,36	5,06
12,50% FHS	3	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
25,00% FHS	30	8,03	7,70	32	33	6,19	4,84
50,00% FHS	70	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
100,0% FHS	100	7,93	7,64	32	33	3,95	5,15

N.A.: Não analisado.

RL0181/2008 – I.I MYA

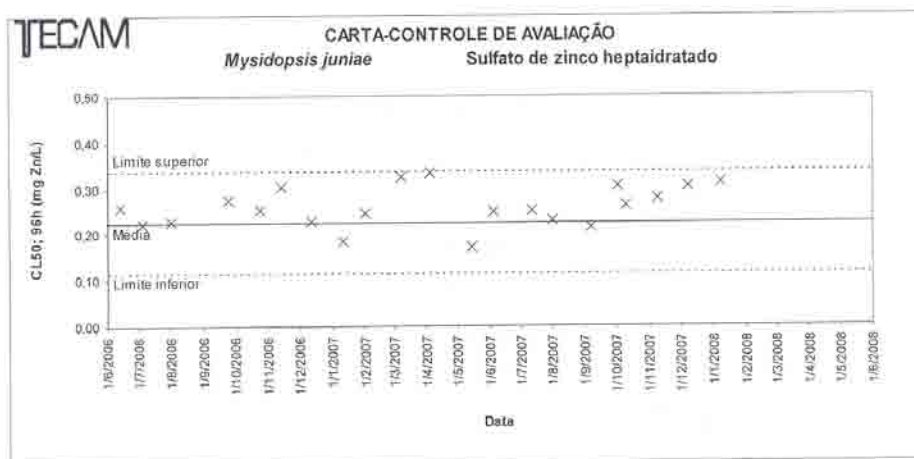
Rua Féria, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel.: (11) 3873-2553 • Fax: (11) 3882-8954

Teste de Toxicidade de Óleo Produzido - Amostra 01-3-ESP-22D-RJS - *Mysidopsis juniae*



CONFIDENCIAL 9

ANEXO 1



RL0181/2008 - 1.1 MYA

Rua Patrie, 59  
05051-030 • São Paulo • SP  
Tel. (11) 3873-2553 • Fax (11) 3862-8954