

ANEXO II.2.4-3 - TESTES DE TOXICIDADE

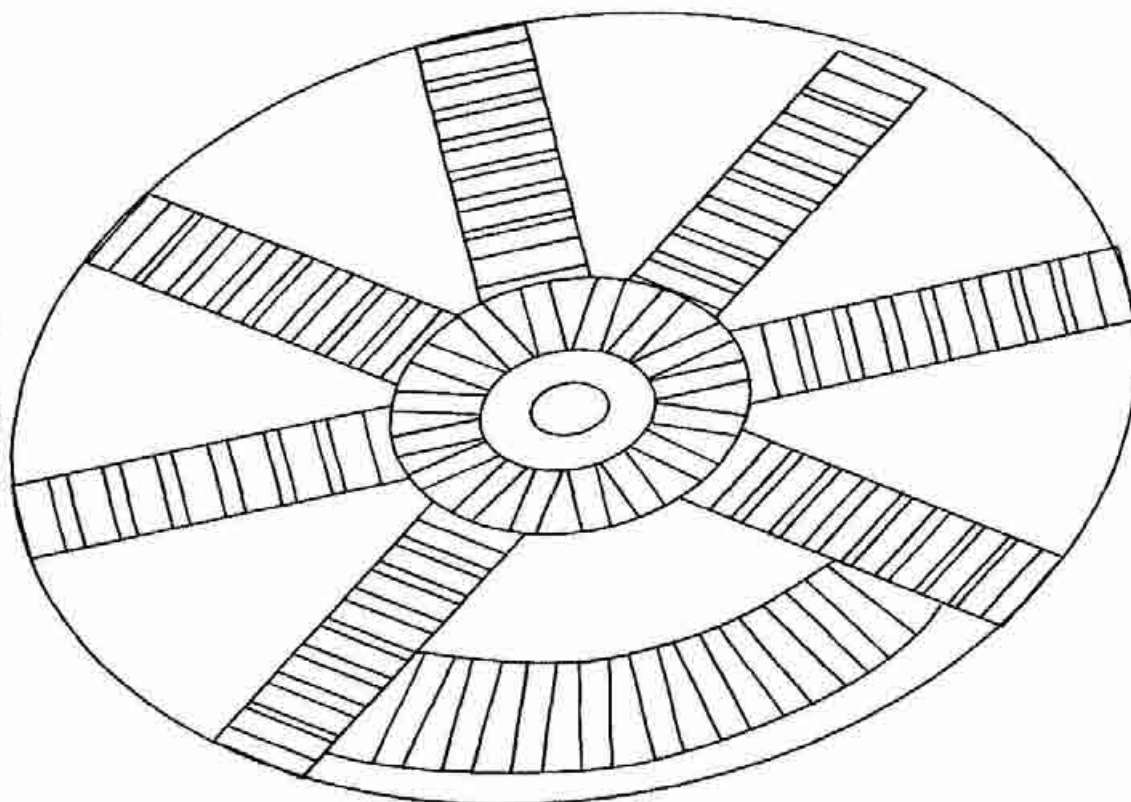


AVALIAÇÕES DA TOXICIDADE E DA BIODEGRADABILIDADE
DO FLUORENE R2 (Fluoresceína)

CT BIO Nº 12/2002

Comunicação Técnica

CENPES/PDEP/BIO



CENPES

**Centro de Pesquisas e Desenvolvimento
Leopoldo A. Miguez de Mello**



CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO LEOPOLDO A. MIGUEZ DE MELLO
PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E ENGENHARIA DO E&P
Gerência de Biotecnologia e Ecossistemas

702151: Avaliação Ecotoxicológica dos Produtos da SS06

COMUNICAÇÃO TÉCNICA:
Avaliações da Toxicidade e da Biodegradabilidade do Fluorene R2
(Fluoresceína)

CT BIO N.º 12/2002

Relator

Eduardo Barcelos Platte – Biólogo Pleno (CENPES/PDEP/BIO)



Mat: 020928-6

Colaboradores

Alexandre Alves Amigo – Biólogo (FUNDAÇÃO PADRE LEONEL FRANCA)
Fabio Francisco de Oliveira – Químico (FUNDAÇÃO PADRE LEONEL FRANCA)
Gleidice de Fátima Ribeiro - Bióloga (FUNDAÇÃO PADRE LEONEL FRANCA)

Participantes externos

Lab. LABTOX (Fundação BIORIO - UFRJ)
Lab. TECAM (Tecnologia Ambiental Ltda.)

Rio de Janeiro
Abril de 2002



SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Toxicidade e Testes de Toxicidade	1
1.2 - Objetivos.....	2
2 - METODOLOGIA.....	3
2.1 - Preparo das Amostras para Teste de Toxicidade.....	3
2.2 - Teste de Toxicidade com <i>Vibrio fischeri</i> (Sistema Microtox®).....	5
2.3 - Teste de Toxicidade com <i>Artemia</i> sp.	6
2.4 - Teste de Toxicidade com o ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i>	7
2.5 - Teste de Toxicidade com o crustáceo <i>Mysidopsis juniae</i>	8
2.6 - Teste de Toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	9
2.7 - Teste de Toxicidade com o peixe <i>Brachydanio rerio</i>	10
2.8 - Teste de Toxicidade com o peixe <i>Poecilia vivipara</i>	11
2.9 - Teste de avaliação da biodegradabilidade.....	12
3 - RESULTADOS.....	13
4 - DISCUSSÃO.....	18
5 - CONCLUSÕES.....	19
6 - BIBLIOGRAFIA.....	20
Anexos.....	21
Anexo I: Fichas Técnica, de Segurança e de Emergência do Fluorene R2.....	22
Anexo II: Laudos as Análises de Toxicidade do Produto Fluorene R2 realizadas pelo Laboratório Labtox.....	23
Anexo III: Dados brutos das Análises de Toxicidade do Produto Fluorene R2 realizadas pelo Laboratório de Ecotoxicologia do CENPES.....	24
Anexo IV: Laudo do Teste de Biodegradabilidade do Produto Fluorene R2 realizado pelo Laboratório TECAM.....	25





1. INTRODUÇÃO

Gasodutos e oleodutos inoperantes podem ser mantidos em hibernação por longos períodos, preenchidos com água acrescida de inibidor de corrosão ou outros produtos. Desta forma, as paredes internas das tubulações de aço permanecem protegidas contra os processos de biocorrosão e de formação de biofilmes bacterianos.

Os fluidos de preenchimento também podem atuar como coadjuvantes nos testes hidrostáticos que sejam implementados durante a hibernação do duto. Para que estes dutos entrem em operação devem ser efetuados testes de integridade e posterior esvaziamento, o que envolve o descarte do fluido de preenchimento. O destino do fluido de preenchimento variará com o tipo de produto que foi empregado e também com a função do duto (gasoduto/oleoduto), podendo ser encontradas alternativas para descarte do produto.

Para viabilizar o eventual descarte do fluido de preenchimento, a toxicidade do mesmo ou de seus componentes deve ser avaliada a fim de se ter uma abordagem das possíveis implicações ambientais deste processo.

A fluoresceína é um composto orgânico de caráter não-iônico, solúvel em água, utilizado na composição de produtos usados como marcadores para fase aquosa, chamados Traçadores Químicos Hidrofilicos e como corante em medicamentos (Reprotox®). Estes produtos marcadores têm sido amplamente utilizados na indústria de petróleo, para testes de hermeticidade de dutos, tanques de armazenamento e reservatórios.

O produto Fluorene R2 é composto de fluoresceína e é utilizado como traçador químico na composição de fluidos de testes hidrostáticos e de estanqueidade realizados em sistemas de dutos. Para a avaliação da toxicidade deste produto foram empregados diversos organismos-teste, com a finalidade de reunir uma gama de dados ecotoxicológicos, além do ensaio de biodegradabilidade.

O objetivo desta Comunicação Técnica é apresentar os procedimentos adotados e os resultados obtidos acerca da toxicidade da fluoresceína (na forma do produto comercial Fluorene R2) para diferentes organismos-teste e da sua biodegradabilidade.

1.1 Toxicidade e Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade estimam os efeitos tóxicos de amostras de águas, efluentes, produtos formulados, substâncias puras, solos e sedimentos, sobre organismos vivos. Esses testes consistem na exposição de organismos vivos a diferentes concentrações da amostra, sob condições de laboratório, controladas e específicas para cada espécie. Os efeitos sobre os organismos incluem ações sinérgicas, antagônicas e aditivas de todos os componentes físicos, químicos e biológicos que compõem a amostra. Os efeitos observados no teste diferem para cada sistema-teste e podem estar baseados na mortalidade ou efeitos adversos sobre o comportamento ou metabolismo. A sensibilidade na detecção da toxicidade de uma amostra depende do organismo-teste e do sistema teste empregado.



**PETROLEO BRASILEIRO S.A.**
PETROBRAS

Os testes de toxicidade aguda expressam o efeito de uma amostra sobre uma fase curta no ciclo de vida do organismo-teste. Testes de toxicidade crônica expressam o efeito de uma amostra sobre o organismo durante o seu ciclo de vida ou uma parte importante dele.

Os resultados de testes de toxicidade aguda são expressos como CL50 ou CE50 que é a concentração que causou efeito letal, ou efeito adverso, respectivamente, para 50% dos organismos expostos à amostra. Testes de toxicidade crônica são expressos em CENO, que corresponde a maior concentração testada onde não foi observado efeito adverso.

Desta forma, a toxicidade de uma amostra é inversamente proporcional ao valor de CE50, CL50 ou CENO, ou seja, quanto menor o valor da CE50, CL50 ou CENO mais tóxica é a amostra.

O controle do teste é feito mantendo-se um grupo de organismos sob as mesmas condições daqueles expostos à amostra, mas apenas com água isenta de qualquer contaminante. Além disso, cada teste ou lote de testes deve ser acompanhado de um teste de sensibilidade com uma substância de referência padrão, que tem sua toxicidade conhecida, para verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de sensibilidade previamente estabelecida para as condições de laboratório.

São consideradas tóxicas amostras que, diluídas ou não, causam efeitos em 50% dos organismos-testes em qualquer concentração. Amostras não diluídas, ou seja, na concentração 100%, que causam efeitos aos organismos-teste inferior a 50% e superior ao limite de aceitação para o controle são classificadas como amostras com indícios de toxicidade. São consideradas não tóxicas amostras que, sem qualquer diluição, ou seja, na concentração 100% não apresentam efeitos adversos superior ao limite de aceitação para o controle.

A tomada de decisão quanto ao uso ou descarte de efluentes e produtos no ambiente e/ou a avaliação quanto aos impactos decorrentes do vazamento ou lançamento dos mesmos no meio ambiente deve considerar entre outros aspectos as condições reais do corpo receptor (hidrodinâmica, fatores de diluição), a legislação ambiental em vigor, exigências específicas do órgão ambiental local, etc.

1.2 – Objetivos

Avaliar a ecotoxicidade da fluoresceína sob a forma comercial de Fluorene R2 e a sua biodegradabilidade em água do mar.



2. METODOLOGIA

A amostra de Fluorene R2 deu entrada no laboratório de ecotoxicologia do CENPES com o código LET2364.

2.1 Preparo das Amostras para Teste de Toxicidade

O preparo das amostras seguiu a metodologia descrita em Petrobras NR 2594 (1994), utilizando o procedimento Anderson, que consiste na solubilização de 500µl em 500ml em água do mar sintética sob agitação rápida por 5 segundos. Como o Fluorene R2 é um produto solúvel em água, foi obtida uma solução verdadeira, na concentração final de 1000ppm. Esta solução foi utilizada como solução-mãe para preparo das soluções teste.

A composição da água do mar sintética está constante no Quadro 1 apresentado abaixo.

Quadro 1 Composição da água do mar sintética*.

Reagente	Quantidade (g/L)
NaF	0,003
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,02
H ₃ BO ₃	0,03
KBr	0,1
KCl	0,7
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,113
Na ₂ SO ₄	4,0
MgCl ₂ .6 H ₂ O	10,78
NaCl	23,5
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	0,02
Na ₄ EDTA*	0,001
NaHCO ₃	0,2

O EDTA sódico não deve ser usado quando a água for utilizada como água de diluição em testes de toxicidade.

* Preparado segundo Standard Methods (1989)

2.2. Organismos teste empregados na avaliação

Os organismos empregados nesta avaliação incluíram tanto organismos de água doce como marinhos, a fim de abranger uma lista de organismos. Para tanto, foram utilizados diversos organismos aquáticos, com a finalidade de contemplar uma gama de espécies representativas da comunidade aquática, com diferentes sensibilidades a estes produtos.





Quadro 2: Organismos-teste utilizados na avaliação da toxicidade do Fluorene R2 fluoresceína.

Organismo-teste	Sistema - Efeito	Habitat
<i>Mysidopsis juniae</i> Misidáceo	Agudo – mortalidade	Marinho
<i>Lytechinus variegatus</i> Ounço do mar	Crônico – desenvolvimento embrio-larval	
<i>Artemia sp.</i> Microcrustáceo	Agudo – mortalidade	
Microtox® (<i>Vibrio fischeri</i>) Bactéria	Agudo – efeito na luminescência	
<i>Poecilia vivipara</i> Peixe	Agudo - mortalidade	
<i>Daphnia similis</i> Microcrustáceo	Agudo – imobilidade	Água doce
<i>Brachydanio rerio</i> Peixe	Agudo - mortalidade	

Os testes com *Artemia sp.*, Microtox®, *Daphnia similis* e *Brachydanio rerio* foram executados no Centro de Pesquisas Leopoldo A Miguez de Mello (CENPES) da PETROBRAS enquanto os testes com *Mysidopsis juniae*, *Lytechinus variegatus* e *Poecilia vivipara* foram executados no laboratório LABTOX da fundação BIORIO da UFRJ – Universidade federal do Rio de Janeiro.

As metodologias empregadas em cada sistema teste estão descritas nos itens abaixo e seguiram protocolos padronizados. Os detalhes dos procedimentos aplicados estão descritos nos laudos referentes às respectivas análises que estão apresentados nos anexos.





2.2 - Teste de toxicidade com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)

Uma suspensão de uma cultura de bactérias da espécie *Vibrio fischeri* é exposta a diferentes concentrações da amostra. A toxicidade é medida em termos de redução da luminescência emitida naturalmente pela bactéria. A concentração efetiva da amostra que causa 50% do efeito medido (CE50) é obtida em leituras após 5 e 15 minutos de exposição. O teste é realizado em equipamento conhecido como Sistema MICROTOX®. O resumo do método está descrito no Quadro 1 e o procedimento seguiu o descrito no manual do equipamento MICROTOX® modelo M500.

QUADRO 2: CONDIÇÕES DO TESTE DE TOXICIDADE COM *Vibrio fischeri*

TIPO DE TESTE	Agudo, estático, sem renovação.
ÁGUA DE DILUIÇÃO	NaCl 2%
FRASCO TESTE	Cubeta de borossilicato
VOLUME DE SOLUÇÃO	1 mL
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	Suspensão de células (1 milhão de bactérias)
Nº DE RÉPLICAS	1
LUMINOSIDADE	Sem luz
FOTOPERIODISMO	Não tem
TEMPERATURA	15 °C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	5 e/ou 15 minutos
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Inibição da emissão de luz
LEITURA	Fotômetro de absorção de luz (MICROTOX 500)
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CE50 5minutos e/ou CE50 15minutos
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Programa computacional do próprio equipamento
PADRÃO DE TOXICIDADE	Cu ²⁺ (Cobre)

VALIDADE DO TESTE:

O teste com Microtox® é considerado válido quando a resposta (CE50) ao cobre (Cu²⁺) estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Valor de Referência	Valor Obtido para este Estudo
CE50 _{15 min} (0,18 – 0,56 mg/L Cu ²⁺) X = 0,37	CE50 _{15 min} = 0,3 mg/L

FAIXA DE DILUIÇÕES

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:

Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste:	112,5 ppm	225 ppm	450 ppm	900 ppm



2.3 - Teste de toxicidade com *Artemia sp.*

Jovens de *Artemia sp.*, após 24h de eclosão, em fase de larval náuplio II - III, são expostos a diferentes concentrações da amostra, num sistema estático por um período de 48 horas. A toxicidade é medida em termos de efeitos sobre a mortalidade, em leituras do teste após 24 e 48 horas de exposição. O resumo do método está descrito no Quadro 3.

QUADRO 3: CONDIÇÕES DO TESTE DE TOXICIDADE COM *Artemia sp.*

TIPO DE TESTE	Agudo estático sem renovação
ÁGUA DE DILUIÇÃO	Água do mar sintética
FRASCO TESTE	becher de 20 mL
VOLUME DE SOLUÇÃO	10 mL
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	10
Nº DE RÉPLICAS	4
Nº DE CONCENTRAÇÕES	5 + 1 controle*
ALIMENTAÇÃO	sem alimentação
LUMINOSIDADE	Sem luz
FOTOPERIODISMO	Não tem
TEMPERATURA	24 ± 2° C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	24 e 48 horas
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Mortalidade
LEITURA	Observação direta
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CE50 48 h
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Trimmed Spearman-Kärber

Validade do teste:

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90% e a resposta (CL50) ao dodecil-sulfato de sódio (DSS) estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Valor de Referência	Valor Obtido para este Estudo
CL50 _{48h} (13,95 - 20,23 mg/L) X = 17,09	CL50 _{48h} = 16,6 mg/L

Faixa de diluições:

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:

Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste:	1,0 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
-----------------	---------	--------	---------	----------





2.4 - Teste de toxicidade embrio-larval com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

O teste consiste na exposição de ovos de ouriço-do-mar às diferentes amostras ou várias diluições de uma mesma amostra. Ao final de 24 horas o número de larvas é contado e o seu desenvolvimento é avaliado. O desenvolvimento embrionário é considerado anormal quando há retardo no crescimento ou são observadas deformações nas larvas. São consideradas normais as larvas que atingem o estágio pluteus em 24 horas, sem deformações. Os procedimentos para realização dos testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* foram baseados em CETESB (1992).

QUADRO 4: Condições do teste de toxicidade com *Lytechinus variegatus*

TIPO DE TESTE	Crônico, estático, sem renovação.
ÁGUA DE DILUIÇÃO	Água do mar natural filtrada (salinidade 34±1‰)
FRASCO TESTE	Tubo de ensaio
VOLUME DE SOLUÇÃO	10 ml
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	300 ovos
Nº DE RÉPLICAS	3 ou 5
FOTOPERIODISMO	12:12h luz:escuro
TEMPERATURA	25±1 °C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	24 horas
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Desenvolvimento dos embriões
LEITURA	Observação em microscópio.
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CENO e CEO
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Toxstat 3.3
PADRÃO DE TOXICIDADE	Dodecil Sulfato de Sódio

Validade do teste:

O teste com embriões de *Lytechinus variegatus* é considerado válido quando o número de larvas pluteus normais no grupo controle é superior a 80% e a resposta (CE50) ao DSS (Dodecil Sulfato de Sódio) estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Intervalo de valores de referência do padrão	Valor obtido para o padrão neste estudo
CE50 (1,02 a 2,82 mg/l)	CE50 _{5,98} = 1,32 mg/L

Faixa de diluições:

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:
Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	500 ppm	700 ppm	1000 ppm





PETROLEO BRASILEIRO S.A.
PETROBRAS

2.5 - Teste de Toxicidade com crustáceo *Mysidopsis juniae*.

Jovens de *Mysidopsis juniae*, com 4 dias de idade, são expostos a amostra, num sistema estático por um período de 96 horas. A toxicidade é medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência dos organismos, por leituras do teste após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. O resumo do método está descrito no Quadro 4.

QUADRO 5: Condições do teste de toxicidade com *Mysidopsis juniae*.

TIPO DE TESTE	Agudo estático sem renovação
AGUA DE DILUIÇÃO	Água do mar natural filtrada
FRASCO TESTE	becher de 400 mL
VOLUME DE SOLUÇÃO	300 mL
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	10
Nº DE RÉPLICAS	3
Nº DE CONCENTRAÇÕES	5 + 1 controle
ALIMENTAÇÃO	Náuplios de artêmia recém eclodidos
LUMINOSIDADE	Iluminação durante 12 horas
FOTOPERIODISMO	12 horas / 12 horas
TEMPERATURA	25 ± 0,5° C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	96 horas
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Sobrevivência
LEITURA	Observação direta
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CL50 96 h
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Trimmed Spearman-Kärber
PADRÃO DE TOXICIDADE	Zinco (CL50 96h)
SALINIDADE	34±1‰

Validade do teste:

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 80% e a resposta (CE50) ao padrão de zinco estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Intervalo de valores de referência do padrão	Valor obtido para o padrão neste estudo
CL50 _{48h} 0,20 - 0,36 mg Zn/L	CL50 _{48h} = 0,34mg/L

Faixa de diluições:

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:

Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste:	100 ppm	300 ppm	500 ppm	700 ppm	1000 ppm



2.6 - Teste de toxicidade com *Daphnia similis*.

Jovens de *Daphnia similis*, após 24h da eclosão, são expostos a diferentes concentrações da amostra, num sistema estático por um período de 48 horas. A toxicidade é medida em termos de efeitos sobre a imobilidade dos organismos, em leituras do teste após 24 e 48 horas de exposição. O resumo do método está descrito no Quadro 5.

QUADRO 6: CONDIÇÕES DO TESTE DE TOXICIDADE COM *Daphnia similis*.

TIPO DE TESTE	Agudo estático sem renovação
ÁGUA DE DILUIÇÃO	Água Mole Sintética (ABNT, 1993), 40 g/L CaCO ₃
FRASCO TESTE	becher de 20 mL
VOLUME DE SOLUÇÃO	10 mL
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	5
Nº DE RÉPLICAS	4
Nº DE CONCENTRAÇÕES	5 + 1 controle*
ALIMENTAÇÃO	sem alimentação
LUMINOSIDADE	Sem luz
FOTOPERIODISMO	Não tem
TEMPERATURA	20 ± 2° C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	24 e 48 horas
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Imobilidade
LEITURA	Observação direta
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CE50 48 h
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Trimmed Spearman-Kärber

Validade do teste:

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90% e a resposta (CE50) ao dicromato de potássio estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Valor de Referência	Valor Obtido para este Estudo
CE50 _{48h} (0,06 – 0,17 mg/L) s = 0,04	CE50 _{48h} = 0,17 mg/L

Faixa de diluições:

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:

Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste:	1,0 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm





2.7 - Teste de Toxicidade com Peixe *Brachydanio rerio*.

Jovens de *Brachydanio rerio*, com cerca de 30 ± 5 mm, são expostos a diferentes concentrações da amostra, num sistema estático por um período de 24 a 48 horas. A toxicidade é medida em termos de efeitos sobre a mobilidade, em leituras do teste após 24 e 48 horas de exposição. As condições de teste estão descritas no Quadro 7.

QUADRO 7: CONDIÇÕES DO TESTE DE TOXICIDADE COM *Brachydanio rerio*

TIPO DE TESTE	Agudo, estático, sem renovação
ÁGUA DE DILUIÇÃO	Água Mole Sintética (ABNT.1993), 40 mg/L CaCO ₃
FRASCO TESTE	Bêquer de 4000 mL
VOLUME DE SOLUÇÃO	3000 mL
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	10
Nº DE RÉPLICAS/CONCENTRAÇÃO	1
LUMINOSIDADE	Sem luz
FOTOPERIODISMO	Não tem
TEMPERATURA	25 °C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	48 h
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Letalidade
LEITURA	Observação em lupa após 24 e 48 h de incubação
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CL 50 24h e CL50 48h
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Trimmed Spearman-Kärber
PADRÃO DE TOXICIDADE	K ₂ Cr ₂ O ₇ (CL50 96h)

Validade do teste:

O teste é considerado válido quando o percentual de mortalidade no controle é menor ou igual a 10% e a resposta (CL50) ao dicromato de potássio estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Valor de Referência	Valor Obtido para este Estudo
CL5096h (69 - 129 mg/L) X = 99,07; n=11; s=15,02	CL50 96h = 83,4 mg/l

Faixa de diluições:

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:

Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste:	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
-----------------	--------	---------	---------	----------



2.8. Teste de toxicidade com *Poecilia vivipara*

Jovens de *Poecilia vivipara*, com cerca de 30 ± 5 mm, são expostos a diferentes concentrações da amostra, num sistema estático por um período de 24 a 48 horas. A toxicidade é medida em termos de efeitos sobre a mobilidade, em leituras do teste após 24 e 48 horas de exposição. As condições de teste estão descritas no Quadro 8.

QUADRO 8: Condições do teste de toxicidade com *Poecilia vivipara*

TIPO DE TESTE	Agudo
ÁGUA DE DILUIÇÃO	Água do mar natural 33 - 35g/kg NaCl
FRASCO TESTE	Béquer de 2 L
VOLUME DE SOLUÇÃO	1000 mL
Nº DE ORGANISMOS/FRASCO	3
Nº DE RÉPLICAS	3
LUMINOSIDADE	122 Lux
FOTOPERIODISMO	12 h luz/ 12 h escuro
TEMPERATURA	25 ± 1 °C
AGITAÇÃO	Não tem
TEMPO DE INCUBAÇÃO	96 horas
PARÂMETRO FINAL DE AVALIAÇÃO	Morte
LEITURA	Contagem nos tempos: 0, 24, 48, 72, a 96 h
EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	CL 50 96h
CÁLCULO ESTATÍSTICO	Trimmed Spearman-Kärber

Validade do teste:

O teste com *Poecilia vivipara* é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90% e a resposta (CL50) ao dodecil sulfato de sódio (DSS) estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista.

Intervalo de valores de referência do padrão	Valor obtido para o padrão neste estudo
2,12 a 4,8 mg/l de DSS	4,26 mg/l de DSS

Faixa de diluições:

As concentrações teste empregadas na avaliação do teste definitivo foram:

Solução-Mãe: 1000 ppm

Soluções-teste:	100 ppm	300 ppm	500 ppm	700 ppm	1000 ppm
-----------------	---------	---------	---------	---------	----------

**PETROLEO BRASILEIRO S.A.**
PETROBRAS

2.9. Teste de avaliação da biodegradabilidade

A avaliação da biodegradabilidade do Fluorene R2 foi feita segundo a metodologia OECD 306 – Biodegradability in Seawater (OECD,1992) para avaliação da biodegradabilidade de substâncias em água do mar.

O teste consiste no acompanhamento da biodegradabilidade do produto em água do mar natural filtrada e que, portanto, já contém microorganismos capazes de inocular o sistema. O acompanhamento da biodegradabilidade é feito por acompanhamento do teor de oxigênio dissolvido durante um período de 28 dias a 25°C.

O produto é exposto em uma concentração única de 2,0 mg/l, a partir da qual é determinado a DBO inicial da solução. Os tratamentos empregados no estudo foram os seguintes.

- a) Amostra (2,0 mg/l): 6 mg de Fluorene R2 + 3000 ml de água do mar filtrada;
- b) Substância de referência (2,0 mg/l): 6,0 mg de anilina (subst. de referência) + 3000 ml de água do mar filtrada;
- c) Controle branco: somente água do mar filtrada;
- d) Controle físico-químico: 6,0 mg de Fluorene R2 + cloreto de mercúrio + 3000 ml de água do mar filtrada;
- e) Controle de toxicidade: 6,0 mg do produto + 6,0 mg da substância de referência + 3000 ml de água do mar filtrada.

Este trabalho foi desenvolvido pelo laboratório TECAM Tecnologia Ambiental Ltda e os detalhes da metodologia empregada no estudo podem ser visualizados nos anexos.



3 – RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises ecotoxicológicas com os diversos organismos-teste utilizados na caracterização da ecotoxicidade do Fluorene R2 estão apresentados nas tabelas 1 a 7. Na tabela 9 estão apresentados todos os resultados finais dos testes de toxicidade. Na tabela 8 está apresentado o resultado do teste de biodegradabilidade do produto Fluorene R2. Todos os testes de toxicidade foram feitos a partir de uma solução de 1000 ppm.

Tabela 1A: Resultado do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri* (Microtox®) para o produto Fluorene R2 diluído em água do mar.

<i>Vibrio fischeri</i>	Efeito – Inibição da luminescência	
Concentração	Efeito em 5 minutos (%)	Efeito em 15 minutos (%)
90% (maior concentração testada)	23,8	20,3
Resultado Final	CE50 5min >900ppm	CE50 15min >900ppm

CE50: concentração que causou efeito a 50% da população exposta.
Máxima concentração testada foi 900 ppm em função dos procedimentos do teste.

Tabela 1B: Resultado do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri* (Microtox®) para o produto Fluorene R2 diluído em água doce (reconstituída mole).

<i>Vibrio fischeri</i>	Efeito – Inibição da luminescência	
Concentração	Efeito em 5 minutos (%)	Efeito em 15 minutos (%)
81% (maior concentração testada)	0,0	0,0
Resultado Final	CE50 5min >810ppm	CE50 15min >810ppm

CE50: concentração que causou efeito a 50% da população exposta.
Máxima concentração testada foi 900 ppm em função dos procedimentos do teste.





Tabela 2: Resultado do teste de toxicidade com *Artemia sp.* para o produto Fluorene R2.

<i>Artemia sp.</i>	Efeito - Mortalidade	
	24 horas (%)	48 horas (%)
Contração	0	0
1,0 ppm	0	0
10 ppm	0	0
100 ppm	0	0
1000 ppm	0	0
Resultado Final	CL50 24h > 1000 ppm	CL50 48h > 1000ppm

CL50: concentração que causou letalidade a 50% da população exposta;

Tabela 3: Resultado do teste de toxicidade com *Mysidopsis juniae* para o produto Fluorene R2.

<i>Mysidopsis juniae</i>	Efeito - Mortalidade			
	24 horas (%)	48 horas (%)	72 horas (%)	96 horas (%)
Contração	0	0	0	0
100 ppm	10	10	10	10
500 ppm	10	30	35	35
700 ppm	5	25	40	45
1000 ppm	5	35	65	70
Resultado Final	CL50 96h = 705,08 ppm IC = 509,72-975,30ppm			

CL50: concentração que causou letalidade a 50% da população exposta;
IC: Intervalo de Confiança (95%)



Tabela 4: Resultado do teste de toxicidade com *Poecilia vivipara* para o produto Fluorene R2.

<i>Poecilia vivipara</i>	Efeito - Mortalidade			
	24 horas (%)	48 horas (%)	72 horas (%)	96 horas (%)
Controle	0	0	0	0
100 ppm	0	0	0	0
500 ppm	0	0	0	0
700 ppm	0	0	0	0
1000 ppm	0	0	0	0
Resultado Final	CL50 sen > 100ppm			

CL50: concentração que causou letalidade a 50% da população exposta;

Tabela 5: Resultado do teste de toxicidade crônica com embriões de *Lytechinus variegatus* para o produto Fluorene R2.

<i>Lytechinus variegatus</i>	Efeito - alterações do desenvolvimento embrionário	
	24 horas (%)	Sig.
Controle	11,0	
50 ppm	22,5	
100 ppm	22,5	
200 ppm	22,0	
300 ppm	69,8	*
500 ppm	87,8	*
700 ppm	100,0	*
1000 ppm	100,0	*
Resultado Final	CENO = 200 ppm	CEO = 300 ppm

CENO: maior concentração testada onde não foi observado efeito;
CEO: menor concentração testada onde foi observado efeito
Sig: efeito significativamente maior em relação ao controle (p=0,05).





Tabela 6: Resultado do teste de toxicidade com *Daphnia similis* para o produto Fluorene R2.

<i>Daphnia similis</i>	Efeito – Imobilidade	
	24 horas (%)	48 horas (%)
Concentração		
Controle	0	0
1,0 ppm	0	0
10 ppm	0	0
100 ppm	0	0
1000 ppm	0	0
Resultado Final	CE50 24h > 1000 ppm	CE50 48h > 1000ppm

CE50: concentração que causou efeito a 50% da população exposta,

Tabela 7: Resultado do teste de toxicidade com *Brachydanio rerio* para o produto Fluorene R2.

<i>Brachydanio rerio</i>	Efeito – Mortalidade	
	24 horas (%)	48 horas (%)
Concentração		
Controle	0	0
10 ppm	0	0
100 ppm	0	0
500 ppm	0	0
1000 ppm	0	0
Resultado Final	CL50 24h > 1000 ppm	CL50 48h > 1000ppm

CL50: concentração que causou letalidade a 50% da população exposta;
IC: Intervalo de Confiança (95%).

Tabela 8: Resultado do teste de biodegradabilidade em água do mar do produto Fluorene R2.

Produto	Biodegradabilidade 28dias
Fluorene R2	22%



Tabela 9: Tabela resumo dos resultados dos testes de toxicidade realizados com o produto Fluorene R2.

Organismo	Resultado	Observações
<i>Microtox (Vibrio fischeri)</i>	CE50 _{15min} >900ppm	Indícios de toxicidade a 900ppm
<i>Artemia sp.</i>	CL50 _{48h} >1000ppm	Não tóxico
<i>Poecilia vivipara</i>	CL50 _{96h} >1000ppm	Não tóxico
<i>Mysidopsis juniae</i>	CL50 _{96h} =705,08ppm	Efeito de toxicidade a 705,08ppm
<i>Lytechinus variegatus</i>	CENO=200ppm CEC=300ppm	Efeito de toxicidade crônica a 300ppm
<i>Daphnia similis</i>	CE50 _{48h} >1000ppm	Não tóxico
<i>Brachydanio rerio</i>	CL50 _{48h} >1000ppm	Não tóxico

CE50: Concentração que causa efeito a 50% da população exposta.
 CL50: Concentração que causa letalidade a 50% da população exposta.
 CENO: Maior concentração testada onde não foi observado efeito adverso.
 CEC: Menor concentração testada em que foi observado efeito adverso.



**PETROLEO BRASILEIRO S.A.**
PETROBRAS

4. DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações de toxicidade do FLUORENE R2, apresentados neste estudo demonstraram que o produto não apresentou toxicidade para nenhum dos testes agudos, quando testado até a concentração de 1000ppm, exceto para *Mysidopsis juniae*, cuja CL50 96h foi de 705,08 ppm. Não foram observados efeitos sobre os peixes (água doce ou marinha) nem para os microcrustáceos *Daphnia similis* (água doce) ou *Artemia sp.* (água marinha). Para a bactéria *Vibrio fischeri* foram observados apenas indícios de toxicidade quando a solução foi preparada em água marinha. Não foram observados efeitos para este organismo quando a solução foi preparada em água doce.

No teste crônico com embriões de *Lytechinus variegatus* foram observados efeitos de toxicidade crônica na concentração de 300ppm de Fluorene R2 e não foram mais observados efeitos significativos na concentração de 200ppm.

Deve-se atentar que a toxicidade é inversamente proporcional ao valor de CE50, CL50 ou CENO, ou seja, quanto maiores estes valores, menor é a toxicidade.

Desta forma, deve ser destacado que o efeito observado para *Lytechinus variegatus* se deu em uma concentração de 300ppm, e a CL50 para *Mysidopsis juniae* (numa concentração 705,08 ppm) muito superiores àquela utilizada na composição do fluido de preenchimento do duto, cuja concentração é de 50ppm, conforme dosagem recomendada nas Informações Técnicas do Fluorene R2. Ou seja, a concentração de uso do Fluorene R2 é seis vezes inferior àquela em que foram observados efeitos tóxicos para *Lytechinus variegatus* e cerca de 14 vezes inferior para *Mysidopsis juniae*.

Portanto, o produto apresentou uma baixa toxicidade para os organismos avaliados e não são esperados efeitos adversos em decorrência do Fluorene R2 para a biota, nas concentrações em que este produto é usado como traçador no fluido de preenchimento para testes de tubulação.

A avaliação da biodegradabilidade do Fluorene R2 demonstrou que o produto apresentou 22% de biodegradabilidade em 28 dias de teste. Este resultado indicou que o produto não apresentou potencial de biodegradação, nas condições estabelecidas pelo método utilizado. Deve-se destacar, entretanto, que os períodos de hibernação dos dutos podem superar em muito este tempo de 28 dias, o que favoreceria a taxas de degradação absolutas maiores do que as observadas no ensaio. Além disso, a baixa biodegradabilidade do produto não deve acarretar em efeitos danosos ao ambiente graças a sua baixa toxicidade.

Os testes referem-se à avaliação da toxicidade para organismos aquáticos e de biodegradabilidade com fins e critérios ambientais. Não podem ser feitas inferências quanto às implicações na saúde pública.



5. CONCLUSÕES

- O Fluorene R2, composto de fluoresceína, não apresentou toxicidade para os microcrustáceos *Artemia sp.* e *Daphnia similis*, para os peixes *Brachydanio rerio* e *Poecilia vivipara* até a concentração de 1000 ppm. Foram observados apenas indícios de efeito para *Vibrio fischeri* em 900 ppm na solução preparada com água marinha, porém, não foram observados efeitos para este organismo quando a solução foi preparada em água doce.
- Foram observados efeitos tóxicos para *Lytechinus variegatus* e *Mysidopsis juniae* nas concentrações de 300 ppm (CEO) e 705,08 ppm (CL50) respectivamente. Entretanto, estas concentrações são muito superiores às utilizadas nos fluidos de preenchimento.
- O produto apresentou baixo potencial de biodegradabilidade.
- Não são esperados efeitos adversos sobre a biota em decorrência do Fluorene R2, quando utilizado na dose recomendada de 50 ppm.



6. BIBLIOGRAFIA

APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th ed. American Public Health Association. 1989.

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Biodegradability in seawater. 306, 27p., 1992.

Araújo, N.A.; Veiga, L.F. & Mauro, C.A. Avaliação da toxicidade dos produtos Rhodamina B e Fluoresceína. Comunicação Técnica no. 48/86. Centro de Pesquisas Leopoldo A. Miguez de Mello / Divisão de Tecnologia de Processos. 1986.

Petrobras. Preparo de amostra para teste de toxicidade. Norma Técnica. Contec N-2594. 1996.

Reprottox®. Banco de dados. www.tomescps.com CAS 518-47-8.





ANEXOS

 **PETROLEO BRASILEIRO S.A.**
PETROBRAS

ANEXO I: Fichas Técnica, de Segurança e de Emergência do Fluorene R2

CENPES – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello

22



NICHO Tecnologia Ltda.
Consultoria & Representações

Informações Técnicas do FLUORENE R2

Descrição :

O FLUORENE R2 é um fluido que contém agentes corantes de base orgânica de caráter não-iônico. O FLUORENE R2 é solúvel em água. É um produto biodegradável e não tóxico. O produto se diferencia pela sua especificidade molecular devido à modificação química e seletiva da estrutura original da uranina. A intensa fluorescência apresentada pelo FLUORENE R2, quando diluído facilitam a sua identificação e análise.

Aplicação :

O FLUORENE R2 pode ser utilizado amplamente, na indústria do petróleo desde os reservatórios petrolíferos, produção e refino, até os oleodutos de exportação, navios petrolíferos e tanques de armazenamento. Da mesma forma o FLUORENE R2 pode ser aplicado para testes hidrostáticos e identificação de vazamentos de qualquer sistema hidráulico.

O FLUORENE R2 é indicado para o preparo de fluidos de contraste empregados na indústria de petróleo.

Propriedades :

Aspecto Físico	Líquido vermelho
Caráter	não-iônico
Diluyente	Solvente polar + água
Densidade	0.99 kg/l
Viscosidade	7,2 Cp
pH	7,2

Solubilidade :

Água industrial	até 10000 ppm
Álcool etílico	totalmente
Acetona	totalmente
Hexano	insolúvel
Tolueno	insolúvel

Impacto Ambiental :

O FLUORENE R2 é um marcador para fase aquosa e alguns copostos polares. As quantidades recomendadas são muito pequenas, da ordem de 50 partes por milhão (ppm).

O produto tem como base agentes corantes de base orgânica e de caráter não-iônico, que apresentam biodegradabilidade aceitável, não é tóxicos para o meio nas concentrações recomendadas. Testes de toxicidade aguda com algumas culturas, do tipo Mysidium graciele DANA, não apresentaram efeitos tóxicos em águas com elevada salinidade.

Tel./Fax : (21) 2462-5056 – (21) 2467-4747 www.nicho.ind.br

e-mail : niche@niche.ind.br

FICHA DE SEGURANÇA**Seção I : Nome e Fabricante****Fluorene R2**

NICHO Tecnologia Ltda.
Est. Do Galeão, 634 s/205
Ilha do Governador CEP-21940-290
Rio de Janeiro – RJ
Brasil

Tel.: (021) 2462-5056
Tel.: (021) 2467-4747
Fax: (021) 2462-5056
<http://www.nicho.ind.br>
e-mail : nicho@nicho.ind.br

Seção II : Produtos Perigosos

Este Produto é inflamável

Seção III : Propriedades

Estado : Líquido	Ponto de Ebulição : 90 °C
Cor : Vermelho	Viscosidade : 7,2 cp
Solúvel em água e álcool	Densidade : 0,99 g/cc
Caráter : Não iônico	PH : 6 a 8

Seção IV : Fogo ou Explosão**PRODUTO INFLAMÁVEL****PODE INFLAMAR COM CALOR, FAGULHA OU CHAMA**

Armazenar em Lugar Fresco

Método de Extinção de Fogo : Pó Químico, SECO

Substancias Perigosas Produzidas pela Combustão : Monóxido de carbono, fumaça, etc.

Seção V : Reatividade

Estabilidade : O produto é estável em condições ambientais normais ;
Incompatibilidade : Evitar contato do produto com ácidos minerais, alcalis, ácidos orgânicos e amins de baixo peso molecular ;
Decomposição : Quando aquecido acima de 300 °C há liberação de Monóxido e dióxido de carbono ;
Polimerização perigosa : Não acontece.

Seção VI : Precauções para o Manuseio e o Uso

Derrame ou Vazamento : Minimize o Contato coma pele. Use os equipamentos de proteção adequados de acordo com as normas e regulamentos

Precauções Para Manuseio e Armazenamento : Guarde em recipientes fechados. Não armazenas próximo ao calor, chama ou outro composto que apresente incompatibilidade

Seção VII : Precauções para a Saúde

Evitar : Inalação, contato com a pele ou ingestão
Perigo : Contato com os olhos ou pele pode causar irritação forte. Se ingerido pode causar distúrbios gástricos. Se inalado pode causar irritação ou dificuldades respiratórias.
Emergência e Primeiros Socorros : Lave os olhos com água em abundância por pelo menos 15 minutos ou até que todo produto seja removido. Lave a pele afetada com água e sabão. Se a irritação persistir consulte um médico

Seção VIII : Informações para Proteção na Industria

Use o material e/ou equipamentos de segurança : Roupas de PVC, capacete de proteção, luva PVC, bota de borracha, mascara facial com filtro combinado para vapores orgânicos. Em caso de envolvimento com fogo use vestuário apropriado e completo para combate-lo.

Evitar contato com os olhos e pele, não inalar, não ingerir, não fume próximo ao produto.

Obs. : As prescrições legais e de higiene de trabalho em vigor devem ser respeitadas. As indicações acima baseiam-se no estado atual de nossos conhecimentos. As mesmas apresentam o estado de investigação referente aos nossos produtos, sem compromisso de nossa parte.

NICHO Tecnologia Est. do Galeão, 634 s/205 Ilha do Governador CEP-21940-290 Rio de Janeiro – RJ Brasil Tel.: (021) 2462-5056 http://www.nicho.ind.br e-mail: nicho@nicho.ind.br	FICHA DE EMERGÊNCIA		Numero de Risco:	30
	Nome do produto apropriado para embarque : <u>Traçador Químico Hidrofílico</u>		Numero da ONU:	1263
Nome Comercial Fluorene R2		Classe ou Subclasse:		3
		Descrição da classe ou subclasse de risco : INFLAMÁVEL		
ASPECTO :		LÍQUIDO VERMELHO – SOLÚVEL EM ÁGUA		
EPI :		Roupa de PVC, capacete de proteção, luva PVC, bota de borracha, máscara facial com filtro combinado para vapores orgânicos. Em caso de envolvimento com fogo use vestuário apropriado e completo para combate-lo.		
RISCOS				
FOGO : PRODUTO INFLAMÁVEL EM CONTATO DIRETO COM FONTE DE IGNIÇÃO OU AQUECIMENTO PODE EXPLODIR COM O CALOR DO FOGO SAUDE : IRRITA A PELE, OS OLHOS E VIAS AÉREAS SUPERIORES. INALAÇÃO PROLONGADA PODE CAUSAR DOR DE CABEÇA, NÁUSEA, ALUCINAÇÕES VISUAIS, EMBRIAGUEZ E PERDA DE CONSCIÊNCIA. MEIO AMBIENTE : CONTAMINA CURSOS D'ÁGUA TORNANDO-OS IMPRÓPRIOS PARA USO EM QUALQUER FINALIDADE, PODENDO VIR A DESTRUIR A FAUNA E A FLORA DO LOCAL DO DERRAME. O ESCOAMENTO PARA REDE DE ESGOTO PODE CRIAR RISCO DE FOGO OU EXPLOÇÃO.				
EM CASO DE ACIDENTE				
VAZAMENTO		<ul style="list-style-type: none"> • AFASTE O VEICULO DA RODOVIA E DESLIGUE O MOTOR • NÃO FUMAR E EVITAR FONTES DE IGNIÇÃO (FAISCA, CHAMA) NA ÁREA • ISOLE E SINALIZE O LOCAL. AFASTE OS CURIOSOS • TENHA PARAR O VAZAMENTO, USANDO EPI E EVITANDO O CONTATO COM O PRODUTO • AVISE A POLÍCIA RODOVIÁRIA, CORPO DE BOMBEIROS, DEFESA CIVIL, EMPRESA TRANSPORTADORA E ÓRGÃO DE MEIO AMBIENTE • USE NEBLINA D'ÁGUA PARA DISSIPAR O FOGO • SE IMPOSSÍVEL CONTER O VAZAMENTO TRANSFERIR O MAIOR VOLUME PARA OUTRO VEÍCULO 		
FOGO		<ul style="list-style-type: none"> • USAR EXTINTORES DE PÓ QUÍMICO, CO² OU ESPUMA PARA HIDROCARBONETO • USE ÁGUA NA FORMA DE NEBLINA PARA RESFRIAR LATERALMENTE OS RECIPIENTES EXPOSTOS AO FOGO 		
POLUIÇÃO		<ul style="list-style-type: none"> • TENHA CONTER O LÍQUIDO EVITANDO ESCOAMENTO PARA CURSOS D'ÁGUA E ESGOTOS • ADSORVA O PRODUTO EM TERRA E TRANSFIRA PARA UMA CAÇAMBA • REMOVA PARA ÁREA ABERTA E SEGURA PARA QUE A EVAPORAÇÃO SE REALIZE • AVISE AO ÓRGÃO DE MEIO AMBIENTE 		
PRIMEIROS SOCORROS		<ul style="list-style-type: none"> • LEVAR A VITIMA PARA UM LOCAL BASTANTE AREJADO • SE A VITIMA NÃO ESTÁ RESPIRANDO, FAZER RESPIRAÇÃO ARTIFICIAL • LAVAR OS OLHOS E OUTRAS PARTES ATINGIDAS COM BASTANTE ÁGUA • REMOVER ROUPAS CONTAMINADAS COM O PRODUTO • EM CASO DE INGESTÃO NÃO PROVOCAR VÔMITOS. SE A VITIMA ESTIVER CONSCIENTE FAZER INGERIR ÁGUA 		
INFORMAÇÕES AO MÉDICO		<ul style="list-style-type: none"> • TRATAMENTO SINTOMÁTICO 		
FABRICANTE : NICHO Tecnologia Ltda.				

 **PETROLEO BRASILEIRO S.A.**
PETROBRAS

**ANEXO II: Laudos das análises de toxicidade do Produto Fluorene R2 realizadas pelo
Laboratório LABTOX**

CENPES – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello

23



**TESTE DE TOXICIDADE COM FLUORENE R2
(CÓDIGO DO LET N° 2364) COM *Poecilia vivipara*
(OSTEICHTHYES - CYPRINODONTIFORMES)**

Solicitante:

SEAMB/CENPES/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

Executado por:

LABTOX – Tecnologia Ambiental
Av. 24, s/n° - Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Pólo BIO-RIO – Incubadeira 3 - 4
CEP: 21941-590

Teste n° 528

Tel: (21) 3867-5501 ramal 220

Rio de Janeiro



LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Eduardo Platte

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello Ilha do Fundão Cidade
Universitária Q7

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Teste de toxicidade aguda com peixe

Organismo teste: *Poecilia vivipara*

Tipo de teste: Agudo

Resposta do teste: Efeitos sobre a SOBREVIVÊNCIA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluorene R2 (Código do Let 2364)

Data: 29/01/2002

Código de entrada no Labtox: 060102 Labtox

RESULTADO DEFINITIVO
A amostra não apresentou efeito agudo para <i>Poecilia vivipara</i>
Sobrevivência no controle: 100 %
Padrão (DSS): 4,26 mg/L (IC = 3,61 - 5,04).

IC = intervalo de confiança

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado em 18 de fevereiro de 2002, foi verificar a toxicidade aguda de Fluorenc R2 (Código do Let 2364) sobre os alevinos de *Poecilia vivipara*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *Poecilia vivipara* seguiu a metodologia descrita em Kraus *et al.* (1998), com adaptações.

Jovens de *Poecilia vivipara* com 10 a 15 dias de idade, foram expostos a diferentes concentrações da amostra, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do teste a cada 24 horas.

São consideradas não tóxicas amostras que apresentam o máximo de 20% de mortalidade na concentração de 100%.

A cada série de amostra testada é realizado um teste de toxicidade com o padrão, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para as condições de laboratório do Labtox.

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ

**RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE**

Tipo de teste: ----- estático sem renovação, com aeração
Temperatura de incubação: ----- $25 \pm 0,5$ °C
Luminosidade: ----- 12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste: ----- béquer de 600 mL
Volume de solução teste: ----- 500 mL
Origem dos organismos: ----- Cultivo Labtox
Idade dos organismos: ----- 10 a 15 dias
Nº de organismos / frasco: ----- 5
Nº de réplicas / concentração: ----- 3
Nº de diluições: ----- 5 + 1 controle *
Água de diluição: ----- água do mar natural filtrada
Salinidade da água: ----- 35 ± 1 ‰
Duração do teste: ----- 96 horas
Resposta: ----- mortalidade
Valor medido: ----- CL50; 96h (concentração letal a 50% dos
Organismos em teste em um período de 96h)
Método de cálculo: ----- Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*,
1977)

* Controle com água de diluição: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi preparada no laboratório de Ecotoxicologia do Cenpes/Scamb e mantida a uma temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ até a realização do teste. A partir desta solução-estoque (1000 ppm) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes concentrações: 100; 300; 500; 700 e 1000 ppm (fichas em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando o percentual de mortalidade no controle é menor ou igual a 10% e a resposta (CL50) ao DSS estiver dentro da faixa de sensibilidade estabelecida para a espécie. Para as condições de testes do Labtox, a faixa de toxicidade estabelecida para *P. vivipara* com DSS é de 2,12 a 4,80 mg/L.

3 - RESULTADOS

A tabela 1 apresenta o percentual de mortos e o número de alevinos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas nas diferentes concentrações testadas. Em todas as concentrações testadas, incluindo o controle, foi observada 100% de sobrevivência dos organismos.

Os resultados de salinidade, pH e oxigênio dissolvido, medidos no início e no final do teste, nas diferentes concentrações, encontram-se listados na ficha em anexo.

O resultado da CL50; 96h obtido com o DSS foi 4,26 mg/L (IC = 3,61 – 5,04).



Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



6



Tabela 1 - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de alevinos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no teste conduzido com Fluorene R2 (Código do Let 2364).

Concentração da amostra (ppm)	Número de alevinos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	5	5	5	5	5	0
	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	
100	5	5	5	5	5	0
	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	
300	5	5	5	5	5	0
	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	
500	5	5	5	5	5	0
	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	
700	5	5	5	5	5	0
	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	
1000	5	5	5	5	5	0
	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	

Almeida

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



4 - CONCLUSÃO

O resultado obtido com o padrão encontra-se dentro da faixa estabelecida para a espécie.

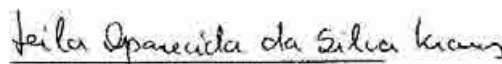
A sobrevivência no controle (100%) e os resultados obtidos nas análises químicas validam o teste realizado. Os resultados indicam que Fluorene R2 (Código do Let 2364) não apresentou efeito agudo para *Poecilia vivipara*, nas condições de teste.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.

Kraus, L.A.S.; Bonecker, A.C.T. & Vital N.A.A. 1998. Acute toxicity of potassium dichromate, sodium dodecyl sulfate, copper and zinc to *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes). *Frenesius Environmental Bulletin*, 7(11-12): 654-658.

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2002.


Leila Aparecida da Silva Kraus
CRB-2 - 12156/02

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ





EQUIPE TÉCNICA:

Biólogas:

MSc Marcia Vieira Reynier CRB-2 - 07135/02

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus CRB-2 - 12156/02

MSc Maria Cristina da Silva Maurat CRB-2 - 12671/02

Técnicas:

Priscila Reis da Silva
Viviane Euzébio Luiz

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



ANEXOS

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



TESTE Nº 528 Operador(es): Jenka
Espécie: P. guayanae

ORIGEM DOS ORGANISMOS			
Cultivo (<input checked="" type="checkbox"/>)	Fonte:	<u>LABTOZ</u>	
Campo ()	Local de coleta:	Temperatura:	°C
	Data:	Salinidade:	‰

MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS:	
Alimento: náuplios de <i>Artemia</i> sp. <i>ad libitum</i>	Temperatura: <u>25 ± 1</u> °C
Tempo de cultivo: <u>8</u> dias	Salinidade: <u>30 ± 1</u> ‰
Idade dos organismos: <u>7 a 8</u> dias	Fotoperíodo: 12:12h

TESTE			
INÍCIO	Data: <u>17/02/02</u>	Hora: <u>11</u> h <u>00</u> min	
TÉRMINO	Data: <u>22/02/02</u>	Hora: <u>12</u> h <u>00</u> min	
Preliminar ()	Estático: (<input checked="" type="checkbox"/>)	Com aeração: (<input checked="" type="checkbox"/>)	
Definitivo (<input checked="" type="checkbox"/>)	Semi-estático ()	Sem aeração: ()	
	Renovação:	h.	

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Laboratório 3 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



AMOSTRA				
Descrição: CÓDIGO DO LET 2364				
Código de entrada no laboratório: 060102		Data de entrada: 29,01,02	Salinidade: 34 ‰ sem ajuste: (X) com ajuste ()	
Ajuste da salinidade				
Volume de água destilada: _____ mL	Volume salmoura _____ mL	Volume de amostra: _____ mL	Salinidade final da amostra _____ ‰	Concentração final da amostra: _____ ppm
pH: da amostra (X) sem ajuste 8,29 () com ajuste _____ µL de _____ pH final _____				
Salmoura: Método _____ Salinidade: _____ ‰ pH _____				

ÁGUA DE DILUIÇÃO		
Fonte: Angra dos Reis	Data da coleta ou preparo: 18,01,02	
Salinidade: 34 ‰	Oxigênio dissolvido: 5,76 mg/L	pH: 8,32

Volume da solução-teste por béquer: 500 mL
 N° de organismos por béquer: 05
 N° de réplicas por concentração: 3

J. Almeida

Avenida 24, s/n° - Polo Bio-Rio - Laboratório 3 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
 Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ

SR





Preparo da solução-estoque: 1.000 (ppm) (mg/L, %) Teste nº 528
 mL (mg) da substância (amostra bruta) + mL de água de diluição.

Preparo das soluções-teste

- Solução 1: 0,0 ppm (mg/L, %) mL da solução-estoque + 1.500 mL de água de diluição.
- Solução 2: 100 ppm (mg/L, %) 150 mL da solução-estoque + 1.350 mL de água de diluição.
- Solução 3: 300 ppm (mg/L, %) 450 mL da solução-estoque + 1.050 mL de água de diluição.
- Solução 4: 500 ppm (mg/L, %) 750 mL da solução-estoque + 750 mL de água de diluição.
- Solução 5: 700 ppm (mg/L, %) 1.050 mL da solução-estoque + 450 mL de água de diluição.
- Solução 6: 1.000 ppm (mg/L, %) 1.500 mL da solução-estoque + mL de água de diluição.
- Solução 7: ppm (mg/L, %) mL da solução-estoque + mL de água de diluição.

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Concentração (ppm)/mg/L, %	Bêquer nº	Início			Término		
		S ‰	OD (mg/l)	pH	S ‰	OD (mg/l)	pH
0,0	2	34	5,76	8,32	39	5,06	8,56
100	4	34	5,85	8,10	35	5,25	8,49
300	9	34	5,85	8,12	35	5,34	8,49
500	12	34	5,65	8,22	36	5,26	8,55
700	13	34	5,87	8,16	36	5,45	8,52
1.000	18	34	5,95	8,29	35	5,18	8,62

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
 Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br

Jhans



ACOMPANHAMENTO DO TESTE

TESTE Nº 528

béquero nº	Nº de org. mortos				béquero nº	Nº de org. mortos			
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
1	Ø	Ø	Ø	Ø	↖				
2	Ø	Ø	Ø	Ø					
3	Ø	Ø	Ø	Ø					
4	Ø	Ø	Ø	Ø					
5	Ø	Ø	Ø	Ø					
6	Ø	Ø	Ø	Ø					
7	Ø	Ø	Ø	Ø					
8	Ø	Ø	Ø	Ø					
9	Ø	Ø	Ø	Ø					
10	Ø	Ø	Ø	Ø					
11	Ø	Ø	Ø	Ø					
12	Ø	Ø	Ø	Ø					
13	Ø	Ø	Ø	Ø					
14	Ø	Ø	Ø	Ø					
15	Ø	Ø	Ø	Ø					
16	Ø	Ø	Ø	Ø					
17	Ø	Ø	Ø	Ø					
18	Ø	Ø	Ø	Ø					

Concentração de alimento: _____ náuplios de *Artêmia* sp. por misidáceo/dia.

Volume da solução de *Artêmia* sp.: 0h _____ µL 24h _____ µL
 48h _____ µL 72h _____ µL

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Laboratório 3 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
 Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



REGISTRO DE DADOS

TESTE Nº 52X

Conc. nominal (ppm) % ou mg/L)	réplica 1		réplica 2		réplica 3		réplica 4		Total de mortos	Mortalidade %
	M	V	M	V	M	V	M	V		
0,0	0	5	0	5	0	5			0	0
100	0	5	0	5	0	5			0	0
300	0	5	0	5	0	5			0	0
500	0	5	0	5	0	5			0	0
700	0	5	0	5	0	5			0	0
1000	0	5	0	5	0	5			0	0

M = número de organismos mortos
V = número de organismos vivos

Sobrevivência no controle: 100 %

Obs:

RANDOMIZAÇÃO DE BÉQUERES

Concentração (ppm)	Béquer nº	Concentração (ppm)	Béquer nº
0,0	1-3	1000	16-18
100	4-6		
300	7-9		
500	10-12		
700	13-15		

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Laboratório 3 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



**TESTE DE TOXICIDADE COM FLUORENE R2 (CÓDIGO LET 2364)
COM O OURIÇO-DO-MAR *Lytechinus variegatus* (Echinodermata-Echinoidea)**

SOLICITANTE:

SEAMB/CENPES/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

EXECUTADO POR:

LABTOX - Tecnologia Ambiental
Av. 24, s/nº - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Pólo BIO-RIO - Incubadeira 3 - 4
CEP: 21941-590

Teste nº 527

Tel: (21) 3867-5501 ramal 220

Rio de Janeiro



I. LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: SEAMB/CENPES/PETROBRAS

Técnico requisitante: Eduardo Platte

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello, Ilha do Fundão - Cidade
Universitária - Q7

Telefone: (21) 3865-6100

Avaliações solicitadas: Teste EMBRIOLARVAL

Organismo teste: *Lytechinus variegatus*

Tipos de teste: Crônico de curta duração.

Resposta do teste: Efeito no desenvolvimento dos embriões (retardamento e/ou
ocorrência de anomalias)

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluorene R2 - código LET 2364
Data 29/01/2002

Código de entrada no LABTOX: 060102

RESULTADO DEFINITIVO	
CENO 200 ppm	CEO 300 ppm
VC = 244,9 ppm	
Controle: 89 % de pluteus	
DSS: CE50 = 1,32 mg/L (IC= 1,25-1,41 mg/L)	

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



1 - OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade crônica de curta duração do produto Fluorene R2 (código LET 2364), sobre os embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*, em um teste realizado em 31/01/2002.

2 - METODOLOGIA

O teste embriológico seguiu a Norma CETESB (1992). Este teste consiste na exposição dos ovos a diferentes concentrações do poluente, avaliando-se a concentração que causa retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições de teste.

A cada série de amostra testada é realizado um teste de toxicidade com o padrão, dodecil sulfato de sódio (DSS), com o objetivo de verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida.

CÁLCULO DA CENO, CEO E VC

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). Após a obtenção destes valores, foi calculado o VC (valor crônico), que representa a média geométrica de CENO e CEO e indica a concentração máxima aceitável da amostra.



Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



A normalidade e homocedasticidade da proporção de embriões desenvolvidos foi verificada através dos testes de "Chi-square" e "Bartlett", respectivamente. A estimativa dos valores de CENO e CEO foi feita através do teste paramétrico de "Dunnetts".

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste.....	estático sem renovação
Temperatura de incubação.....	25 ± 1,0° 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 / diluição.....	04
Nº de diluições.....	12 + 1 controle*
Alimentação.....	sem alimentação
Água de diluição.....	água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Salinidade da água.....	34 ± 1 ‰
Duração do teste.....	28 horas
Resposta.....	embriões mal formados ou com o desenvolvimento retardado
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.

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi preparada pela equipe do Laboratório de Ecotoxicologia do CENPES/ SEAMB e enviada para o LABTOX, sendo mantida a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a realização do teste. Esta amostra teve o pH ajustado de 8,99 para 8,33 com 10 μL de HCl. A partir desta foram retiradas alíquotas para as soluções-teste, sendo testadas as seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 500,0; 700,0 e 1.000 ppm.

VALIDADE DO TESTE

O teste EMBRIOLÓGICO é considerado válido quando:

- Apresentar no controle o mínimo de 80% de embriões no estágio de pluteus;
- Os parâmetros de qualidade da água estiverem dentro dos limites estabelecidos para a espécie;
- O resultado com a substância de referência estiver dentro do limite estabelecido para a espécie pelo LABTOX (1,02 - 2,82 mg/L).

3 - RESULTADOS

Os dados brutos da contagem do número de pluteus mal formados e/ou com atraso no desenvolvimento são apresentados nas tabelas I.

O produto Fluorene R2 (código LET 2364), apresentou valor de CENO de 200 ppm, valor de CEO de 300 ppm e VC de 244,9 ppm.

O valor médio do percentual de pluteus saudáveis obtido no controle foi de 89% e a CE50 obtida com a substância de referência (DSS) foi de 1,32 mg/L (IC=1,25-1,41 mg/L).

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



6



Tabela I: Número de pluteus afetados e saudáveis de *L. variegatus* expostos às diferentes diluições do Fluorene R2 (código LET 2364), no teste conduzido em 31/01/2002.

Réplicas	Conc. (ppm)	saudáveis	afetados	% afetados	Média afetados	Total	Total afetados
2	Controle	88	12	12,0	11,0	400	44
8		90	10	10,0			
6		92	8	8,0			
5		86	14	14,0			
111		50	69	31			
112	84		16	16,0			
113	79		21	21,0			
114	78		22	22,0			
115	100	80	20	20,0	22,5	400	90
116		78	22	22,0			
117		82	18	18,0			
118		70	30	30,0			
120	200	79	21	21,0	22,0	400	88
121		76	24	24,0			
122		84	16	16,0			
123		73	27	27,0			
124	300	47	53	53,0	69,8	400	279 *
125		16	84	84,0			
126		36	64	64,0			
127		22	78	78,0			
128	500	8	92	92,0	87,8	400	351 *
129		17	83	83,0			
130		7	93	93,0			
131		17	83	83,0			
133	700	0	100	100,0	100,0	400	400 *
134		0	100	100,0			
135		0	100	100,0			
136		0	100	100,0			
137	1.000	0	100	100,0	100,0	400	400 *
138		0	100	100,0			
139		0	100	100,0			
140		0	100	100,0			

* significativamente diferente do controle

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



4 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no controle, com o padrão e nas análises físicas e químicas estiveram dentro dos limites estabelecidos, garantindo a aceitabilidade do teste.

Nas condições de teste, Fluorene R2 (código LET 2364), apresentou valor de CENO de 200 ppm, valor de CEO de 300 ppm e VC de 244,9 ppm.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1992. Água do mar. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. Norma Técnica L5.250, São Paulo, Cetesb, p20.
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Bergman, H.L. 1991. "TOXSTAT Realease 3.3", Laramie, WY University of Wyoming, 19 p.



6 - EQUIPE TÉCNICA

BIÓLOGAS:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus CRB-2 - 12156/02
MSc Marcia Vieira Reynier CRB-2 - 07135/02
MSc Maria Cristina da Silva Maurat CRB-2 - 12671/02

TÉCNICOS:

Priscila Reis da Silva
Viviane Euzébio Luiz

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2002.


Maria Cristina da Silva Maurat
CRB-2 - 12671/02

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ



Anexos



Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ

2364 tarzwell L.variegatus
: t527 Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

CE	DF	SS	MS	F
een	6	2.103	0.350	70.000
in (Error)	21	0.105	0.005	
l	27	2.207		

ritical F value = 2.57 (0.05,6,21)
nce F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

2364 tarzwell L.variegatus
: t527 Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control>Treatment

P	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
	0.0	0.110	0.110		
	10	0.200	0.200	1.800	
	50	0.225	0.225	2.300	
	100	0.225	0.225	2.300	
	200	0.220	0.220	2.200	
	300	0.698	0.698	11.750	*
	500	0.878	0.878	15.350	*

ett table value = 2.46 (1 Tailed Value, P=0.05, df=20,6)

2364 tarzwell L.variegatus
: t527 Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control>Treatment

P	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
	0.0	4			
	10	4	0.123	111.8	-0.090
	50	4	0.123	111.8	-0.115
	100	4	0.123	111.8	-0.115
	200	4	0.123	111.8	-0.110
	300	4	0.123	111.8	-0.588
	500	4	0.123	111.8	-0.768



TESTE N° 027 Data: 31/01/02 Organismo-teste: L. VOLUCATUS
Tipo de teste: () fecundação () embriológico

FLUORENE R2
Amostra: COLET 2364 - 5L de 1000 ppm Cód. de entrada no laboratório: 060102
Data de entrada: 29/01/02 Data do preparo da amostra: 29/01/02
DADOS DO SOBRENADANTE
Salinidade: 34 ‰ pH: 8,99 OD: 5,99 mg/L

AJUSTE DA SALINIDADE () SIM () NÃO

Volume de água destilada	Volume de salmoura:	Volume de amostra:	Salinidade final da amostra:	Concentração final da amostra:
— mL	— mL	— mL	— ‰	— ppm

SALMOURA

Método de obtenção: _____ Salinidade: _____ ‰ pH: _____

AJUSTE DO pH () SIM () NÃO

Volume da amostra:	Adição:	pH final:
<u>+400</u> mL	<u>10</u> µL de HCl	<u>8,33</u>
	— µL de NaOH	—

DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO
Local de coleta: Parque do Rio Data: 29/01/02
Data de filtração: 29/01/02 Aeração: Data 31/01/02
Salinidade: 34 ‰ pH: 8,50 OD: 5,97 mg/L
OBS: _____

Avenida 24, s/n° - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



TESTE N° 527

FLUORENE R2

Amostra: CONDIT 236.4 - 2L de 1000ppm - Tac3well

Solução-estoque: 1000 ppm Vol. final a ser preparado: 100 mL

Concentração (ppm)	Vol. amostra a 100% adicionada (mL)	Vol. água do mar adicionada (mL)	Número dos tubos	
			leitura	F/Q
0,0	—	100	1-9	10
0,1	0,01	99,99	83-91	92
0,5	0,05	99,95	93-96	150
1,0	0,1	99,9	97-100	101
5,0	0,5	99,5	102-105	151
10	1,0	99	106-109	110
50	5,0	95	111-114	152
100	10	90	115-118	119
200	20	80	120-123	153
300	30	70	124-127	154
500	50	50	128-131	132
700	70	30	133-136	155
1000	100	—	137-140	141

OBS:

Avenida 24, s/n° - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
 Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel.(5521) 3887-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br

SR

mf



**TESTE DE TOXICIDADE COM FLUORENE R2
(CÓDIGO DO LET Nº 2364) COM *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

Solicitante:

SEAMB/CENPES/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

Executado por:

LABTOX - Tecnologia Ambiental
Av. 24, s/nº - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Pólo BIO-RIO - Incubadeira 3 - 4
CEP: 21941-590

Teste nº 526

Tel: (21) 3867-5501 ramal 220

Rio de Janeiro



LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Eduardo Platte

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello Ilha do Fundão Cidade
Universitária Q7

Telefone: (21) 3865 6100

Avaliação solicitada: Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de teste: Agudo

Resposta do teste: Efeitos sobre a SOBREVIVÊNCIA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluorene R2
Solução de 1000 ppm (Método Tarzwell)
Amostra Código do Let 2364
Data: 29/01/2002

Código de entrada no Labtox: 060102

RESULTADO DEFINITIVO
CL50; 96 horas: 705,08 ppm
Intervalo de confiança (IC = 509,72 – 975,30%)
Sobrevivência no controle: 100%
Padrão (Zinco): 0,34 mg/L (IC = 0,28 – 0,40 mg/L)

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado em 08 de março de 2002, foi verificar a toxicidade aguda do Fluorene R2 (Código do Let 2364) sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2 - METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em Reynier (1996), modificada.

Jovens de *M. juniae* com 1 a 4 dias de idade, foram expostos a diferentes concentrações do produto, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do teste a cada 24 horas.

São consideradas não tóxicas amostras que apresentam o máximo de 20% de mortalidade na concentração de 100%.

A cada série de amostra testada é realizado um teste de toxicidade com o padrão, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se os organismos estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida.

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@bio.org.br



RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste: ----- estático sem renovação, com aeração
Temperatura de incubação: ----- $25 \pm 0,5$ °C
Luminosidade: ----- 12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste: ----- béquer de 400 mL
Volume de solução teste: ----- 300 mL
Origem dos organismos: ----- Cultivo Labtox
Idade dos organismos: ----- 1 a 4 dias
Nº de organismos / frasco: ----- 10
Nº de réplicas / concentração: ----- 2
Nº de diluições: ----- 4 + 1 controle *
Alimentação: ----- 30 náuplios de *Artemia* sp. Recém eclodidos/
misidáceo/dia
Água de diluição: ----- água do mar natural filtrada
Salinidade da água: ----- 35 ± 1 ‰
Duração do teste: ----- 96 horas
Resposta: ----- mortalidade
Valor medido: ----- CL50; 96h (concentração letal a 50% dos
Organismos em teste em um período de 96h)
Método de cálculo: ----- Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*,
1977)

* Controle com água de diluição: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



PREPARO DA AMOSTRA

O preparo da amostra (solução estoque de 1000 ppm) foi realizado pelo laboratório de Ecotoxicologia do Cenpes/Seamb. A partir desta solução, foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes concentrações: 100; 500 700 e 1000 ppm.

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90% e a resposta (CL50) ao zinco estiver dentro da faixa de sensibilidade prevista. A faixa de toxicidade com o padrão zinco (0,20 – 0,36 mg/L) foi estabelecida para esta espécie pelo Laboratório de Ecotoxicologia da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB.

3 - RESULTADOS

A tabela 1 apresenta o percentual de misidáceos mortos e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas nas diferentes concentrações testadas. A CL50;96h foi de 705,08 ppm (IC = 509,72 – 975,30 ppm) e a sobrevivência no controle foi de 100%.

Os resultados de salinidade, pH e oxigênio dissolvido, medidos no início e no final do teste nas diferentes concentrações, encontram-se listados na ficha em anexo.

O resultado da CL50; 96h obtido com o zinco foi 0,34 mg/L (IC = 0,28 – 0,40 mg/L).

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: iabtox@biorio.org.br



Tabela 1 - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no teste conduzido com o Fluorene R2 (Código do Let 2364).

Concentração da amostra (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
100	10	8	8	8	8	10
	10	10	10	10	10	
500	10	10	7	6	6	35
	10	8	7	7	7	
700	10	9	8	7	6	45
	10	10	7	5	5	
1000	10	10	8	3	2	70
	10	9	5	4	4	

4 - CONCLUSÃO

O resultado obtido com o padrão encontra-se dentro da faixa estabelecida para a espécie.

A sobrevivência no controle (100%) e os resultados obtidos nas análises químicas validam o teste realizado. Os resultados indicam que o Fluorene R2 (Código do Let 2364) apresentou efeito agudo para *Mysidopsis juniae*, na concentração de 705,08 ppm, nas condições de teste.



Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel:(5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



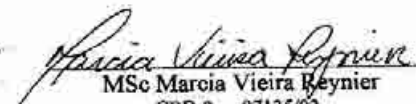


5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.

Reynier, M.V. 1996. Aspectos do ciclo de vida de *Mysidium gracile* (Dana, 1852) (Crustacea – Mysidacea) e um estudo sobre a sua adequação para testes de toxicidade com hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Paulo, 95p.

Rio de Janeiro, 12 de março de 2002.


MSc Marcia Vieira Reynier
CRB-2 - 07135/02

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel.(5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



EQUIPE TÉCNICA:

Biólogas:

MSc Marcia Vieira Reynier CRB-2 - 07135/02

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus CRB-2 - 12156/02

MSc Maria Cristina da Silva Maurat CRB-2 - 12671/02

Técnicas:

Priscila Reis da Silva
Viviane Euzébio Luiz

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel:(5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



ANEXOS

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R. 220 - e-mail: iabtox@bio rio.org.br

A handwritten signature in black ink, appearing to be "DL", is located at the bottom left of the page.

Teste no. 526

Date: 08/03/2002 Test Type: agudo

Duration: 96 hours

Chemical: Fluorene R2

Species: *Mysidopsis juniae*

Concentration Unit: ppm

Raw Data:

Concentration:	100	500	700	1.000
Number Exposed:	20	20	20	20
Mortalities:	2	7	9	14
SPEARMAN-KARBER TRIM:			30.00%	

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 705.08

95% Lower Confidence: 509.72

95% Upper Confidence: 975.30

MSD

526

1



TESTE Nº 526 Operador(es): M^{rs} CASSIANA, Uiba
Espécie: M. JUNIAE

ORIGEM DOS ORGANISMOS			
Cultivo <input checked="" type="checkbox"/>	Fonte:	<u>LABTOX</u>	
Campo ()	Local de coleta:	Temperatura:	°C
	Data:	Salinidade:	‰

MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS:	
Alimento: náuplios de <i>Artemia</i> sp. <i>ad libitum</i>	Temperatura: <u>25 ± 1</u> °C
Tempo de cultivo: <u>4</u> dias	Salinidade: <u>35 ± 1</u> ‰
Idade dos organismos: <u>1 a 4</u> dias	Fotoperíodo: 12:12h

TESTE			
INÍCIO	Data:	Hora:	
	<u>03/03/02</u>	<u>16 h 00 min</u>	
TÉRMINO	Data:	Hora:	
	<u>12/03/02</u>	h min.	
Preliminar ()	Estático: <input checked="" type="checkbox"/>	Com aeração: <input checked="" type="checkbox"/>	
Definitivo <input checked="" type="checkbox"/>	Semi-estático ()	Sem aeração: ()	
	Renovação: _____ h.		

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3887-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



Preparo da solução-estoque: 1.000 ppm (mg/L, %) Teste nº 526
 mL (mg) da substância (amostra bruta) + mL de água de diluição.

Preparo das soluções-teste

- Solução 1: 0,0 ppm (mg/L,%)
 mL da solução-estoque + 600 mL de água de diluição.
- Solução 2: 100 ppm (mg/L,%)
60 mL da solução-estoque + 540 mL de água de diluição.
- Solução 3: 500 ppm (mg/L,%)
300 mL da solução-estoque + 300 mL de água de diluição.
- Solução 4: 700 ppm (mg/L,%)
420 mL da solução-estoque + 180 mL de água de diluição.
- Solução 5: 1.000 ppm (mg/L,%)
600 mL da solução-estoque + mL de água de diluição.
- Solução 6: ppm (mg/L,%)
 mL da solução-estoque + mL de água de diluição.
- Solução 7: ppm (mg/L,%)
 mL da solução-estoque + mL de água de diluição.

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Concentração (ppm) mg/L, %	Bêquer nº	Início			Término		
		S ‰	OD (mg/l)	pH	S ‰	OD (mg/l)	pH
0,0	1	34	5,00	8,53	35	5,13	8,66
100	3	34	5,01	8,54	34	4,91	8,48
500	6	34	5,13	8,33	34	4,88	8,60
700	7	34	5,19	8,39	34	4,69	8,53
1.000	9	34	5,35	8,25	35	4,51	8,55

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão
 Ccp - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel: (5521) 3867-5501 R: 220 - e-mail: labtox@biorio.org.br



REGISTRO DE DADOS

TESTE Nº 526

Conc. nominal (ppm) % ou mg/L)	réplica 1		réplica 2		réplica 3		réplica 4		Total de mortos	Mortalidade %
	M	V	M	V	M	V	M	V		
0,0	0	10	0	10					0	0
100	2	8	0	10					2	10
500	4	6	3	7					7	35
700	4	6	5	5					9	45
1000	8	2	6	4					14	70

M = número de organismos mortos

V = número de organismos vivos

Sobrevivência no controle: 100 %

Obs:

RANDOMIZAÇÃO DE BÉQUERES

Concentração (ppm)	Béquer nº	Concentração ()	Béquer nº
0,0	1-2		
100	3-4		
500	5-6		
700	7-8		
1000	9-10		

Avenida 24, s/nº - Polo Bio-Rio - Incubadeira 3-4 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão

Cep - 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Tel (5521) 3857-5501 R: 220 - e-mail: labtox@bionio.org.br



**ANEXO III: Dados brutos das Análises de toxicidade do Fluorene R2 realizadas pelo
Laboratório de Ecotoxicologia do CENPES.**

CENPES – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello

24

PETROBRAS
PETROBRAS

RESULTADO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

PROJETO: UN-BG/ATPS/PDCP N° de Análise: 13/2002
 CLIENTE: UN-BG/ATPS/PDCP CÓDIGO DO LET: 2364
 DATA (1): 29/01/02 (2) 31/01/02 ORGANISMO-TESTE: ADMIA LOTE: 10-05-00
 AMOSTRA: Tipo Produto Identificação Ilwouk R2 (Nome Comercial Fluoresceína)
 TRATAMENTO: Inoculante - Jazwell (FDA) em H₂O da fase Sulfética - diluição a partir de uma solução de 1.000 ppm Tempo: 48h

C	N° de Organismos Afetados		TOTAL TESTADO	%
	TESTADO	AFETADO		
1	0/10	0/10	40	0
10	0/10	0/10	40	0
100	0/10	0/10	40	0
1.000	0/10	0/10	40	0
Cont	0/10	0/10	40	0

C	N° de Organismos Afetados		TOTAL TESTADO	%
	TESTADO	AFETADO		
1	0/10	0/10	40	0
10	0/10	0/10	40	0
100	0/10	0/10	40	0
1.000	0/10	0/10	40	0
Cont	0/10	0/10	40	0

Padrão de Toxicidade: D.S.S Marca: Veve Lote: JANUÁRIO/2002
 Data: 15/01/02 CESO (1): 310 CESO (2): 310



RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

AMOSTRA Fluorene R2 CÓDIGO 2364
 Data (i) 29/01/02 Data (f) 31/01/02 Responsável Fabio

C (ppm)	pH		OD		Dureza mg/L CaCO3	Alcalinidade mg/L CaCO3	Cloreto mg/L	Salinidade g/L	O&G ()
	(i)	(f)	(i)	(f)					
1000	7,54	7,80	762	747	-	-	35	-	-

Detalhamento do Trabalho Realizado no Laboratório

(Descrever a amostra e o tratamento prévio dado a mesma, as características e o tratamento dado a solução, extrato ou líquido preparado e informar as não conformidades encontradas e os desvios do PETS ocorridos durante a efetiva realização do teste. Indicar outras análises químicas da amostra bruta ou do extrato, caso tenham sido realizadas) - Consultar os documentos de Referência descritos no PETS.

[Handwritten signature and notes]
 Eduardo
 Biólago
 Mar 020 9286
 Mar 124007
 Mar 74116



RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

AMOSTRA Fluorexuma CÓDIGO 2364
 Data (i) 29/01/02 Data (f) 31/01/02 Responsável Judice Fabiana

C (%)	pH		OD		Dureza mg/L CaCO3	Alcalinidade mg/L CaCO3	Cloretos mg/L	Salinidade g/L	O&G (%)
	(i)	(f)	(i)	(f)					
1	-	-	6,81	215	-	-	-	-	-
10	-	-	6,23	175					
50	-	-	6,10	143					
100	5,8	5,5	6,01	137					

Detalhamento do Trabalho Realizado no Laboratório

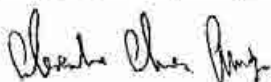
(Descrever a amostra e o tratamento prévio dado a mesma, as características e o tratamento dado a solução, extrato ou lixiviado preparado e informar as não conformidades encontradas e os desvios do PEIT ocorridos durante a efetiva realização do teste. Indicar outras análises químicas da amostra (líquida ou do extrato, caso tenham sido realizadas) - Consultar os documentos de Referência descritos no PEIT.

OD (24 horas)

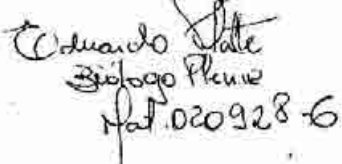
1% - 1,96
10% - 1,30
50% - 1,49
100% - 2,40

Judice Fabiana
 Bióloga Pleno
 inscrita: 124007
 Conselho B. Plante
 Biólogo Pleno
 I.H. 020 928-6

Cód. LET	DATA DO TESTE	Descrição da Amostra	pH	Maior [C] Testa da (%)	RESULTADOS			
					Efeito em 5 minutos		Efeito em 15 minutos	
					CE50 % (ppm)	Efeito na Maior Concentração testada (%)	CE50 % (ppm)	Efeito na Maior Concentração testada (%)
364	31/01/02	Fluorene R2-água mole- Tarzwel(FDA)- 1000PPM	5,80	81	>81	0	>81	0
364	31/01/02	Fluorene R2-água do mar- Tarzwel(FDA)- 1000PPM	7,54	90	>90	23,8	>90	20,3



Técnico responsável: Alexandre Alves Amigo



Biólogo Pleno
Mat. 020928-6



**ANEXO IV: Laudo do Teste de Biodegradabilidade do Produto Fluorene R2 Realizado
pelo Laboratório TECAM.**

CENPES – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello

25





**TÍTULO DO ESTUDO:
TESTE DE BIODEGRADABILIDADE EM ÁGUA MARINHA
PARA O PRODUTO: FLUORENE R2.**

LABORATÓRIO CONTRATADO: TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

EMPRESA: PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A.

CÓDIGO TECAM: 0322/2002.

RELATÓRIO Nº: RL0322-02BD.

INÍCIO DO ESTUDO: 04/02/02.

TÉRMINO DO ESTUDO: 06/03/02.

EMISSÃO DO RELATÓRIO: 14/03/02.

DIRETOR DE ESTUDO: Regina Sawaia Sáfydi (PhD).

PESQUISADOR PRINCIPAL: Alice Fumie Aita, Bióloga.

pg. 1/10

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



CONFIDENCIAL 2

ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO	3
RESUMO	4
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS	5
1. Substância-teste	5
2. Sistema-teste	5
3. Água de diluição	5
4. Preparo das soluções	6
5. Condições de teste e procedimentos	7
6. Tratamento dos resultados	7
RESULTADOS	8
CONCLUSÃO	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
TABELAS	9
FIGURA	10



CONFIDENCIAL 3

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com o produto **FLUORENE R2** requerido pela empresa **PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A** foi conduzido de acordo com o protocolo descrito nesse relatório e sob a orientação e supervisão do Diretor de Estudo. 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 R. Fábria, 59 - S. Paulo - SP.


REGINA SÁWAIÁ SÁFADI (PhD)
Diretor de Estudo

14/03/02

PETROBRAS - PETRÓLEO BRASILEIRO S/A

____/____/____

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a biodegradabilidade do produto **FLUORENE R2 (0322/2002)** em água marinha. Após 28 dias de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e no escuro, foi observado que a concentração 2 mg/L do produto não apresentou biodegradação nas condições de teste.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the biodegradability of the product **FLUORENE R2 (0322/2002)** in seawater. After 28 days of incubation at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark, the concentration 2 mg/L of the sample was not biodegradable under the test conditions.

INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradabilidade do produto **FLUORENE R2** em água marinha. O método consiste na diluição de uma concentração pré-estabelecida do produto, seguida de exposição a microorganismos presentes em água marinha natural filtrada. A solução é mantida em frascos de DBO fechados, no escuro, sob temperatura constante, e a degradação é acompanhada por análises da concentração de oxigênio dissolvido durante um período de 28 dias. Tal procedimento permite determinar a porcentagem de biodegradação do produto após 28 dias.

A metodologia adotada segue a norma OECD 306 - Biodegradability in Seawater (OECD, 1992). Conforme estabelecido nesta norma, a avaliação deve ser feita a partir de uma solução de 2 mg/L do produto, podendo ser de até 10 mg/L em casos especiais.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Substância-teste

O produto **FLUORENE R2** (Código Tecam 0322/2002) foi recebido no laboratório em 04/02/02, acondicionado em frasco de vidro. A demanda química de oxigênio (DQO) do produto foi analisada em 963000 mg/kg.

2. Sistema-teste

Foram utilizadas várias espécies de microorganismos naturalmente presentes na água marinha, não identificadas individualmente. No início e durante o teste foram realizadas análises microbiológicas da água, através do método de contagem padrão de bactérias heterotróficas.

3. Água de diluição

Para o preparo das soluções-teste foi utilizada água marinha natural filtrada, enriquecida com nutrientes minerais.

A água marinha foi coletada em 21/01/02, próximo à Ilha de Urubuqueçaba, no litoral da cidade de Santos (SP). A qualidade desta água foi caracterizada através das seguintes análises:

- . Salinidade: 33 ‰
- . Demanda química de oxigênio (DQO): 390 mg/L
- . Nitrato: 0,4 mg/L
- . Amônia: 0,18 mg/L
- . Fósforo total: 0,09 mg/L
- . Contagem padrão de bactérias: 240 UFC/mL

Após a coleta, a água foi mantida no laboratório por 14 dias, sob aeração suave, na mesma temperatura de teste e no escuro. Antes de ser utilizada no teste, foi filtrada em papel de filtro para remover partículas grosseiras e organismos plancônicos. Em seguida, foram adicionados nutrientes (nitrogênio e fósforo) para garantir a sobrevivência dos microorganismos.

4. Preparo das soluções

Foi preparada uma solução de 2 mg/L do produto em água de diluição em volume suficiente para preencher oito frascos de incubação (dois frascos para cada dia de leitura). Para avaliar a atividade dos microorganismos presentes na água foi preparada uma solução 2 mg/L com a substância de referência, anilina. Foram, também, preparados um controle somente com água marinha enriquecida (controle branco) e outro idêntico à solução do produto, porém sem atividade microbiológica devido à adição de cloreto de mercúrio (controle físico-químico). A ocorrência de efeitos inibitórios devido à toxicidade do produto foi avaliada através do preparo de uma solução de 2 mg/L da substância de referência com 2 mg/L do produto (controle de toxicidade).

Portanto, para o presente teste, foram preparadas as seguintes soluções:

- A. Amostra (2 mg/L): 6 mg do produto + 3000 mL de água de diluição.

- B. Substância de referência (2 mg/L): 6 mg da substância de referência + 3000 mL de água de diluição.
- C. Controle branco: somente água de diluição.
- D. Controle físico-químico: 6 mg do produto + cloreto de mercúrio + 3000 mL de água de diluição.
- E. Controle de toxicidade: 6 mg do produto + 6 mg da substância de referência + 3000 mL de água de diluição.

5. Condições de teste e procedimentos

O teste teve início em 06/02/02 e término em 06/03/02. No início do teste, as soluções foram transferidas para os frascos de incubação, mantidos em ambiente escuro, com temperatura de 25 ± 1 °C, durante 28 dias.

A concentração de oxigênio dissolvido de cada tratamento foi analisada em frascos duplicados, no início do teste e após 5, 15 e 28 dias de teste. Nas mesmas datas, foram feitas análises de contagem padrão de bactérias heterotróficas e de DQO no início do teste.

6. Tratamento dos resultados

Para cada dia de análise foi calculado o consumo líquido de oxigênio como a diferença no consumo de oxigênio do controle branco e da solução do produto, nas condições de teste, e o resultado foi expresso em mg O₂/mg de amostra. A biodegradação foi calculada como a razão entre este consumo líquido e a DQO do produto, expressa em porcentagem.

Para verificar se o produto foi tóxico para os microorganismos durante o teste, foi comparado o consumo líquido de oxigênio do controle de toxicidade com a soma dos consumos das soluções do produto e da substância de referência.

RESULTADOS

Os resultados do teste com o produto **FLUORENE R2** estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 e o consumo real de oxigênio de todas as soluções preparadas está representado graficamente na Figura 1.

As soluções apresentaram relativa variação nos valores iniciais de DQO e de bactérias heterotróficas ao longo do teste (Tabela 1). A presença destes organismos e a concentração de oxigênio dissolvido nos frascos-teste indicaram que os compostos orgânicos presentes nas soluções poderiam ser degradados por via aeróbica. A exceção prevista foi o controle físico-químico, no qual praticamente não havia microorganismos durante o teste.

Foi verificado que houve consumo de oxigênio no controle branco, porém a porcentagem foi inferior ao limite recomendado de 30% de consumo para aprovação da água de diluição (OECD, 1992).

Os resultados obtidos indicaram que a amostra apresentou certa toxicidade aos microorganismos, uma vez que o consumo de oxigênio do controle de toxicidade (contendo amostra e substância de referência) foi cerca de uma vez inferior à soma do consumo separado de cada uma destas soluções (Tabela 2). Além disso, o consumo observado no controle físico-químico indicou que não houve degradação abiótica na solução da amostra. A presença de compostos nitrogenados na amostra pode afetar os resultados do teste. O consumo de oxigênio da solução contendo a substância de referência indicou que os microorganismos presentes na água marinha estiveram aptos a degradar a matéria orgânica presente nas diversas soluções preparadas.

O consumo de oxigênio na solução da amostra foi similar ao do controle branco, indicando que a amostra não sofreu degradação microbiana. Ao final do período de 28 dias de exposição, a biodegradação da amostra foi estimada em 22 %, valor este inferior ao limite recomendado pela norma OECD para considerar um composto biodegradável em água marinha.

CONCLUSÃO

A concentração 2 mg/L da amostra não apresentou biodegradação após 28 dias de exposição em meio marinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OECD *Guidelines for the testing of chemicals*. Biodegradability in Seawater. 306, 27 p., 1992.

Tabela 1 – Análises de demanda química de oxigênio inicial (DQO) e contagem padrão de bactérias das soluções preparadas para o Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha para o produto **FLUORENE R2**.

Solução	DQO inicial (mg/L)	Contagem padrão de bactérias (UFC/mL)			
		Dia 0	Dia 5	Dia 15	Dia 28
Controle branco	190	270	500	560	2300
Amostra	100	250	460	420	340
Controle físico-químico	350	12	3	< 1	< 1
Controle de toxicidade	< 20	240	140	360	310

UFC = unidades formadoras de colônias.

Tabela 2 – Consumo de oxigênio e biodegradação após 28 dias das soluções preparadas para o Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha para o produto **FLUORENE R2**.

Solução	Consumo líquido de oxigênio (mg O ₂ /mg de amostra)			Biodegradação (%)
	Dia 5	Dia 15	Dia 28	
Amostra	0,20	-0,06	0,21	22
Controle físico-químico	-0,65	-0,99	-1,32	-137
Controle de toxicidade	0,93	0,84	0,75	19

ri0322-02bd.doc

TECAM
TECNOLOGIA AMBIENTAL

CONFIDENCIAL 10

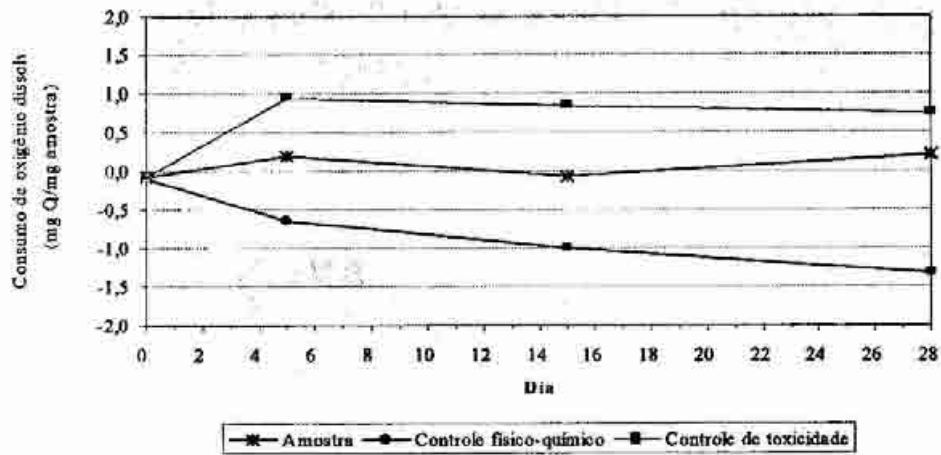


Figura 1 - Consumo líquido de oxigênio dissolvido das soluções preparadas para o Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha para o produto **FLUORENE R2**.

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

ri0322-02bd.doc