IBAMA
MINTER
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
e dos Recursos Naturais Renováveis — IBAMA

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS

Brasília
2.ª Edição, março/1990.

IBAMA-DIRCOF – Departamento de Qualidade Ambiental

– Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos

Brasília, 1990.

351 p.

1. Ecotoxicidade – Avaliação.
2. Meio Ambiente – Agentes Químicos.
3. Ecotoxicidade – Manual. I. Título

. COORDENAÇÃO GERAL

Marília Marreco Cerqueira

. ORGANIZAÇÃO E REVISÃO FINAL

Fausto Antônio de Azevedo
Maria Tereza de Oliveira Barros

. ELABORAÇÃO E CONSULTORIA

- Alberto Furtado Rahde
- Anali Machado de Campos
- Aparecida Y. H. Fujimura
- Carlos C. do Amaral e Silva
- Clarice Paschoal
- Denise Navas Pereira
- Eduardo Bertoletti
- Elenita Gherardi Goldstein
- Elza Flores Rüegg
- Elza Yuriko O. Bastian
- Fausto Antônio de Azevedo
- Henrique Vicente Della Rosa
- Isa Ramos de Queiroz
- João Lauro V. de Camargo
- João Ruocco Júnior
- Luiza Luciana Varin
- Maria A. La Regina Rodrigues
- Maria de Lourdes Ramos
- Maria Elisa P. B. Siqueira
- Maria Inês Z. Sato
- Maria Nazareth R. Gay
- Maria Neusa Alves
- Marília Marreco Cerqueira
- Marion Grosze Nipper
- Neemias de Castro
- Pedro Antônio Zagatto
- Petra Sanches
- Renato Amaral
- Reynaldo Luis Victorio
- Roberto Alcântara Gomes
- Rodrigo de Araújo Cunha
- Rolf Roland Weber
- Roque Monteleone Neto
- Rosalina Araújo
- Roseana Duarte Trein
- Rúbia Kuno
- Sandra Hacon
- Sérgio Colacioppo
- Silvia Berlanga Barros
- Stella Piva Bertoletti
- Suely M. G. de S. M. Carvalho
- Virginia B. C. Junqueira
- Walquiria Lara
- Vilma Aparecida da Silva

Ministério do Desenvolvimento
Urbano e Meio Ambiente

GABINETE DO MINISTRO

POTARIA Nº 145, DE 22 DE OUTUBRO DE 1985

O MINISTRO DE ESTADO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE, no uso das atribuições que lhe confere os artigos 2º,3º e 9º do Decreto Nº 91.145, de 15 de março de 1985;

Considerando a necessidade de se subsidiar o gerenciamento de agentes.potencialmente tóxicos, que deverá disciplinar a produção, importação, comercialização, transporte, uso e disposição final;

Considerando a necessidade da Secretaria Especial do Meio Ambiente de propor métodos, normas e padrões para o estabelecimento de uma classificação dos níveis de riscos ambientais, de agentes potencialmente tóxicos para a adoção de medidas na sua área de competência:

RESOLVE:

Art. 1º - Criar um Grupo de Trabalho formado por especialistas, com o fim específico de , no prazo de 90 dias propor:

- métodos analíticos para avaliação de parâmetros ecotoxicológicos específicos;
- critérios para avaliação e estabelecimento de níveis de risco ambiental de agentes potencialmente tóxicos;
- uma listagem de substâncias consideradas, a priori, com maior potencial de periculosidade ao ambiente.

Art. 2º - O Grupo de Trabalho será integrado pelos seguintes especialistas:

do Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente - Secretaria Especial do Meio Ambiente:

- SUELY MONTEIRO GALVÃO DE SÃO MARTINHO CARVALHO
- MARÍLIA MARRECO CERQUEIRA
- ROSEANA DUARTE TREIN

da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo:

- CARLOS CELSO DO AMARAL E SILVA
- RODRIGO DE ARAÚJO CUNHA
- NEEMIAS DE CASTRO
- ELZA YURIKO ONISHI BASTIAN
- ELENITA GHERARDI GOLDSTEIN
- PETRA SANCHET
- DENISE NAVAS PEREIRA
- ISA RAMOS
- RENATO AMARAL

do Centro de Energia Nuclear na Agricultura:

- REYNALDO LUIZ VICTORIA

da Escola Paulista de Medicina:

- ROQUE MONTELEONE NETO

do Centro de Informações Toxicológicas:

- ALBERTO FURTADO RAHDE

do Centro de Recursos Ambientais:

- FAUSTO ANTÔNIO DE AZEVEDO

da Financiadora de Estudos e Projetos:

- SANDRA HACON

da Universidade Federal Fluminense:

- WILMA APARECIDA DA SILVA

do Instituto Adolfo Lutz:

- WALQUIRIA LARA

do Instituto Biológico:

- ELZA FLORES RUEGG

da Universidade de São Paulo:

- SILVIA BERLANGA BARROS
- APARECIDA YOSHIKO FUJIMURA
- ROLF ROLAND WEBER
- VIRGINIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
- MARIA ELISA PEREIRA BASTOS DE SIQUEIRA

Art. 3º - A Secretaria Especial do Meio Ambiente prestará apoio técnico e administrativo ao Grupo de Trabalho.

FLÁVIO PEIXOTO DA SILVEIRA

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO/SEXTA-FEIRA, 25 OUT 1985
SEÇÃO II PÁG 5116

Ministério do Desenvolvimento
Urbano e Meio Ambiente

GABINETE DO MINISTRO

PORTARIA Nº 132, DE 19 DE AGOSTO DE 1987

O MINISTRO DE ESTADO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE, no uso de suas atribuições legais;

- Considerando que os trabalhos objeto da Portaria nº 145, de 22 de outubro de 1985 não foram concluídos no prazo estabelecido;

- Considerando, ainda, a necessidade de se integrar novos membros ao Grupo de Trabalho criado através da referida Portaria.

RESOLVE:

Art. 1º - A Portaria nº 145 de 22 de outubro de 1985 que cria Grupo de Trabalho fica prorrogada por mais 30 (trinta) dias para a conclusão dos trabalhos.

Art. 2º - Fica acrescida a citada Portaria dos seguintes especialistas:

da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo:

- RUBIA KUNO
- JOÃO RUOCCO JUNIOR
- STELA PIVA BERTOLETTI
- ANALI MACHADO DE CAMPOS
- CLARICE PASCHOAL
- LUISA LUCIANA VARIN
- MARIA INÊS ZANOLI SATO
- MARIA NEUSA ALVES
- EDUARDO BERTOLETTI
- MARIA DE LOURDES RAMOS
- MARION GROSZE NIPPER
- PEDRO ANTÔNIO ZAGATTO
- ROSALINA ARAÚJO

do Instituto Biológico de São Paulo:

- MARIA AMÉLIA LA REGINA RODRIGUES

.v.

da Universidade de São Paulo:
- SERGIO COLACIOPPO
- HENRIQUE VICENTE DELLA ROSA
do Instituto Butantã de São Paulo:
- MARIA NAZARETH RABELLO GAY
da Faculdade de Medicina de Botucatu:
- JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO

Art. 3º - Esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação.

DENI LINEU SCHWARTZ

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO/SEXTA-FEIRA, 21 DE AGO DE 1987
SEÇÃO II PÁG 4550

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS

COMO USAR ESTE MANUAL

Os testes aqui reunidos e descritos foram selecionados e revisados por especialistas em cada um deles, convidados pela SEMA para este fim. Pretende-se que os mesmos especialistas, e outros mais que puderem ser detectados e se acrescerem ao grupo, reavaliem periodicamente tais testes, à luz da experiência que se acumulará no Brasil com sua realização e dos novos fatos apresentados pela ciência mundial.

Portanto, seguindo este critério, os testes ora apresentados poderão ser alterados eventualmente, ou excluídos, bem como novos testes poderão ser introduzidos.

Por isso, para facilitar, foram utilizadas folhas coloridas na impressão, adotando-se por divisão os grandes grupos de testes. As páginas do Manual não receberam, a propósito, uma numeração sequencial. Elas são numeradas apenas dentro da descrição de cada teste, em seguida à codificação do mesmo. Logo após o título do teste coloca-se sempre a data da última revisão. Quando uma alteração for efetuada em um dos testes, sugere-se ao usuário trocar a(s) folha(s) antiga(s) pela(s) nova(s).

R E S U M O

Este Manual contém a descrição de 41 testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos, enfocando suas toxicidade, biodegradabilidade, mobilidade, etc., e visando criar as bases que possibilitem a implantação de um sistema racional para registro público de agentes químicos no país.

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS

SUMÁRIO

Apresentação.....i
Sumário.....S.-01/05
Resumo.....ii
Portarias de criação do Grupo de Trabalho.....iii
Como usar este Manual.....vii

PARTE A: Informações sobre o uso industrial e/ou agronômico, etc, do produto.

PARTE B: Informações sobre a classificação toxicológica do Ministério da Saúde.

PARTE C: Avaliação das propriedades físico-químicas.

PARTE D: (folhas rosas): Avaliação da toxicidade de agentes químicos para microrganismos, microcrustáceos, peixes, algas, organismos do solo, aves, animais silvestres e plantas.

D.1. Avaliação da toxicidade para microrganismos
- D.1.1. Avaliação da toxicidade aguda para Photobacterium phosphoreum.....D.1.1.- 01 a 08
- D.1.2. Avaliação da toxicidade aguda para Spirillum volutans.....D.1.2.- 01 a 09

D.2. Avaliação da toxicidade para microcrustáceos
- D.2.1. Avaliação da toxicidade aguda para Daphnia similis.....D.2.1.- 01 a 14
- D.2.2. Avaliação da toxicidade crônica para Daphnia similis.....D.2.2.- 01 a 09
- D.2.3. Avaliação da toxicidade crônica para Ceriodaphnia dubia.....D.2.3.- 01 a 10

D.3. Avaliação da toxicidade para peixes

D.3.1. Avaliação da toxicidade aguda para peixes.....D.3.1.- 01 a 10

D.3.2. Avaliação da toxicidade crônica para peixes.....D.3.2.- 01 a 09

D.3.3. Avaliação da bioconcentração em peixes.....D.3.3.- 01 a 09

D.4. Avaliação da toxicidade para algas

D.4.1. Avaliação da toxicidade para Chlorella vulgaris.....D.4.1.- 01 a 13

D.5. Avaliação da toxicidade para organismos do solo

D.5.1. Avaliação da toxicidade para minhoca (Eisenia fetida).....D.5.1.- 01 a 07

PARTE E: (folhas amarelas): Avaliação dos processos de degradação e de transporte.

E.1. Teste de biodegradabilidade

E.1.1. Teste de biodegradabilidade imediata

E.1.1.1. Teste da biodegradabilidade imediata pela medida do decaímento do DQO-solúvel.....E.1.1.1.- 01 a 16

E.1.1.2. Teste da biodegradabilidade imediata pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema aberto.....E.1.1.2.- 01 a 18

E.1.1.3. Teste da biodegradabilidade imediata pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema fechado.....E.1.1.3.- 01 a 13

E.1.1.4. Teste da biodegradabilidade imediata pela medida de consumo do oxigênio dissolvido.....E.1.1.4.- 01 a 14

E.1.1.5. Teste da biodegradabilidade imediata pela medida do decaimento do carbono orgânico dissolvido COD....E.1.1.5.- 01 a 14

E.1.2. Teste da biodegradabilidade dos solos.....E.1.2.- 01 a 04

E.2. Teste para avaliação da mobilidade.....E.2.- 01 a 03

E.3. Teste para avaliação da absorção/dessorção.....E.3.- 01 a 04

PARTE F: (folhas azuis): Avaliação da toxicidade para animais superiores (mamíferos) e dos efeitos neurotóxicos.

F.1. Avaliação da toxicidade oral

F.1.1. Toxicidade oral a curto prazo para ratos.....F.1.1.- 01 a 05

F.1.2. Toxicidade oral a curto prazo com doses repetidas para ratos.....F.1.2.- 01 a 04

F.1.3. Toxicidade oral a médio prazo para ratos.....F.1.3.- 01 a 05

F.1.4. Toxicidade oral a médio prazo para cães.....F.1.4.- 01 a 05

F.2. Avaliação da toxicidade inalatória

F.2.1. Toxicidade inalatória a curto prazo para ratos.....F.2.1.- 01 a 05

F.2.2. Toxicidade inalatória a curto prazo com exposições repetidas para ratos.....F.2.2.- 01 a 06

F.2.3. Toxicidade inalatória a médio prazo para ratos.....F.2.3.- 01 a 06

F.3. Avaliação da toxicidade cutânea

F.3.1. Toxicidade cutânea a curto prazo para ratos.....F.3.1.- 01 a 04

F.3.2. Toxicidade cutânea a curto prazo com doses repetidas para ratos.....F.3.2.- 01 a 05

F.3.3. Toxicidade cutânea a médio prazo para ratos.....F.3.3.- 01 a 05

F.3.4. Irritação/corrosão cutânea a curto prazo (coelhos).....F.3.4.- 01 a 04

F.4. Avaliação da irritação/corrosão ocular a curto prazo (coelhos).....F.4.- 01 a 05

F.5. Avaliação da toxicidade a longo prazo para mamíferos.....F.5.- 01 a 06

PARTE G: (folhas verdes): Avaliação do potencial mutagênico embrio-fetotóxico e carcinogênico.

G.1. Avaliação do potencial mutagênico com microrganismos

G.1.1. Testes de mutagenicidade com microrganismos

G.1.1.1. Teste de mutação gênica reversa em Salmonella typhimurium (teste de Ames).....G.1.1.1.- 01 a 11

G.1.1.2. Teste de conversão gênica mitótica, mutação reversa e recombinação mitótica em Saccharomyces cerevisae.....G.1.1.2.- 01 a 09

G.1.1.3. Cromoteste (teste baseado na indução das funções SOS).....G.1.1.3.- 01 a 08

G.1.2. Testes de mutagenicidade com células eucarióticas

G.1.2.1. Teste com linfócitos de sangue periférico.....G.1.2.1.- 01 a 06

G.1.2.2. Teste de alteração no locus da hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (teste CHO/HGPRT).....G.1.2.2.- 01 a 04

G.1.2.3. Teste de metáfases na medula óssea.....G.1.2.3.- 01 a 04

G.1.2.4. Teste do micronúcleo.....G.1.2.4.- 01 a 06

G.1.2.5. Teste do letal dominante...G.1.2.5.- 01 a 06

G.1.2.6. Bibliografia.....G.1.2.6.- 01 a 06

G.1.3. Conclusões.....G.1.3.- 01 a 02

G.2. Teste para avaliação do potencial embrio-fetotóxico do agente químico

G.2.1. Estudos experimentais com animais de laboratório.....G.2.1.- 01 a 06

G.3. Teste para avaliação do potencial carcinogênico do agente químico

G.3.1. Teste de longa duração com roedores...G.3.1.- 01 a 06

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS

PARTE A

INFORMAÇÕES SOBRE O USO INDUSTRIAL E/OU AGRONÔMICO, ETC., DO PRODUTO

Julga-se que na avaliação global do potencial ecotóxico de um agente químico, seja ele uma substância pura ou uma mistura de substâncias (por exemplo, um produto técnico, uma formulação de praguicida, etc.) são de extrema relevância informações sobre o modo de produção do agente, a quantidade da produção, os tipos de comercialização, as formas de uso, as propriedades técnicas ou agronômicas, etc.

Tais informações devem estar presentes quanto do delineamento da pesquisa sobre a ecotoxicidade do agente químico, pois que poderão influir de muitas maneiras no protocolo da investigação, bem como devem constar do(s) relatório(s) final(is) do estudo.

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS

PARTE B

INFORMAÇÕES SOBRE A CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

Se, por ventura, o produto já foi classificado toxicologicamente pelo Ministério da Saúde com vistas a um uso seguro pelo homem, esta classificação, assim como os dados apresentados para tanto, são de suma importância para se fechar a investigação global do potencial ecotoxicológico do agente e, portanto, devem ser considerados devidamente, inclusive para o planejamento dos demais testes de avaliação da ecotoxicidade.

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE
AGENTES QUÍMICOS

PARTE C

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

As seguintes informações físico-químicas sobre o agente químico são necessárias para uma perfeita avaliação de seu potencial ecotóxico, bem como para subsidiar qualquer análise para fins de registro do produto.

C.01. Estado físico, aspecto e cor
C.02. Espectros de absorção atômica: no ultra-violeta, no visível e no infra-vermelho
C.03. Espectro de massa
C.04. Grau de pureza
C.05. Ponto de fusão/faixa de fusão
C.06. Ponto de ebulição/faixa de ebulição
C.07. Curva de pressão de vapor
C.08. Solubilidade em água
C.09. Coeficiente de partição n-octanol/água
C.10. pH do produto e/ou de suas soluções
C.11. Capacidade de formação de complexos na água
C.12. Adsorção/dessorção
C.13. Densidade de líquidos e sólidos
C.14. Distribuição de partículas por tamanho/distribuição do comprimento e do diâmetro da fibra
C.15. Hidrólise (com fusão do pH)
C.16. Constante de dissociação na água
C.17. Estabilidade térmica e ao ar
C.18. Viscosidade de líquidos
C.20. Tensão superficial de soluções aquosas
C.20. Lipossolubilidade
C.21. Estabilidade no veículo e no alimento

As informações sobre tais propriedades deverão ser obtidas pelo emprego das metodologias consagradas na literatura específica. Os resultados dos testes deverão ser apresentados de forma objetiva e direta e a metodologia utilizada deverá ser referida.

PARTE D

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS PARA MICRORGANISMOS, MICROCRUSTÁCEOS, PEIXES, ALGAS, ORGANISMOS DO SOLO, AVES, ANIMAIS SILVESTRES E PLANTAS

D.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA MICRORGANISMOS

D.1.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA PARA Photobacterium phosphoreum

Data da Revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Este ensaio microbiológico tem por objetivo detectar a ação tóxica de um determinado composto químico, ou de uma mistura complexa de compostos químicos, sobre o microrganismo-teste, Photobacterium phosphoreum, através da medida da redução da quantidade de luz naturalmente emitida por este microrganismo.

2. APLICAÇÃO

O Sistema Microtox tem uma ampla aplicação, incluíndo-se entre as principais:

. Avaliação da toxicidade de efluentes industriais:
. Avaliação da toxicidade de águas residuárias, a serem submetidas a tratamento biológico;
. Determinação do risco potencial de novas substâncias químicas, através da avaliação de sua toxicidade:
. Estudos relativos a sinergismo e antagonismo de misturas de substâncias tóxicas;
. Avaliação de substâncias tóxicas no meio ambiente;
. Avaliação da toxicidade de materiais usados em biomedicina:
. Avaliação de águas subterrâneas quanto à possível presença de contaminantes tóxicos.

3. FUNDAMENTO

Este bioensaio é baseado na verificação das variações na emissão de luz, por unidade de tempo, por uma bactéria de origem marinha, Photobacterium phosphoreum. Nestas bactérias, a luciferase utiliza a flavina - um aldeído de cadeia longa - em sua forma reduzida, e oxigênio para produção de luz. Bioquimicamente, a via da bioluminescência é uma parte da cadeia de transporte de elétrons. Nestas bactérias, a emissão de luz é o

resultado do processo total da célula, ou seja, é a expressão da taxa total em que uma série complexa de reações bioquímicas produtoras de energia estão ocorrendo. A inibição de quaisquer das inúmeras enzimas envolvidas neste processo irá causar uma diminuição nesta taxa, com conseqüente diminuição na quantidade de luz emitida.

Para este bioensaio é utilizada uma cultura liofilizada de Photobacterium phosphoreum, contendo 10^8 bactérias por ampola. Para realização do teste, suspensões com a mesma quantidade desta bactéria (10^6 células) são misturadas com uma série de diluições da amostra a ser testada. São efetuadas medidas da quantidade de luz emitida por essas suspensões bacterianas antes e após a mistura com a amostra, em intervalos de tempo específicos.

Quando a razão corrigida entre a quantidade de luz perdida e a quantidade de luz remanescente é registrada em gráfico, como uma função da concentração da amostra, verifica-se uma relação normalmente linear, determinando-se, a partir do gráfico, a concentração efetiva da amostra que causa uma redução de 50% na quantidade de luz emitida (CE_{50}), após os períodos de exposição determinados para o teste.

4. DEFINIÇÕES

4.1. TOXICIDADE AGUDA

É a propriedade do agente tóxico de causar efeitos adversos a organismos vivos após um curto período de exposição dos mesmos a esse agente.

4.2. CE_{50}

É a concentração efetiva do agente tóxico na solução da amostra em teste, que causa 50% da redução da quantidade de luz emitida pelo microrganismo-teste, após sua exposição a este agente durante um determinado período, a uma determinada temperatura.

5. MATERIAL NECESSÁRIO

5.1 Equipamentos

Microtox Model 2055 - Toxicity Analyser System (Beckman Intruments, Inc.): é um fotômetro de precisão, especialmente desenvolvido para realização deste bioensaio.

5.2 Vidraria

Cubetas de borossilicato de 360 x 11,75 x 50 mm e atóxicas.

5.3 Organismos-teste

Cultura liofilizada da bactéria bioluminescente Photobacterium phosphoreum (cepa NRRL B-11 177).

5.4 Soluções

- Solução de reconstituição - água destilada livre de substâncias orgânicas;
- Diluente - solução de cloreto de sódio a 2%, preparada com água altamente purificada, utilizada no ensaio para fornecer proteção osmótica aos microrganismos-teste;
- Solução de ajuste osmótico - solução de cloreto de sódio a 22%, preparada com água altamente purificada, utilizada para o ajuste da osmolaridade das amostras em teste.

Obs.: O organismo-teste e a solução de reconstituição são fornecidos pela Beckman Instruments, Inc.

6. PROCEDIMENTO

O procedimento para execução desse bioensaio é descrito detalhadamente no Manual de Operação da Beckman Instruments (1982) e inclui basicamente a seguinte sequência:

- Verificação do funcionamento do equipamento e do registrador a ele acoplado, segundo instruções do fabricante.
- Reconstituição das bactérias liofilizadas, mantendo-se a

suspensão bacteriana reconstituída na câmara de pré-resfriamento do equipamento (3ºC).

. Preparo das diferentes concentrações da amostra a serem testadas, as quais são mantidas nas câmaras de incubação do equipamento (15ºC). O preparo das mesmas é feito empregando-se uma solução de cloreto de sódio a 2% como diluente, e a solução de ajuste osmótico em quantidade adequada, para ser obtida uma concentração final de 2% de cloreto de sódio em cada concentração da amostra a ser testada.

. Preparo de suspensões bacterianas com cerca de 10^6 células, a partir da suspensão bacteriana reconstituída previamente, em número correspondente às diferentes concentrações de amostra a serem testadas.

. Verificação da quantidade de luz produzida por cada uma dessas suspensões bacterianas, através de sua colocação na câmara de reação do equipamento (15ºC), sendo obtido o registro gráfico correspondente a cada uma dessas suspensões.

. Adição, a cada uma dessas suspensões bacterianas, de um volume estabelecido da concentração da amostra em teste a elas correspondentes.

. Depois da adição da amostra em teste à suspensão bacteriana a ela correspondente, efetuar a verificação da produção de luz por cada uma dessas suspensões bacterianas, após tempos de exposição de 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos.

7. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. DETERMINAÇÃO DA CE_{50}

A partir dos dados obtidos através do Sistema Microtox e desde que tenham sido empregadas as concentrações adequadas da amostra em teste, é possível determinar a CE_{50}, ou seja, a concentração efetiva da amostra que causa 50% de redução na quantidade de luz produzida pela suspensão bacteriana utilizada no ensaio.

Essa determinação é feita graficamente, registrando-se o log das concentrações testadas da amostra versus o decréscimo na produção de luz (expresso em porcentagem) no período especificado para o ensaio - % Δ (t).

Cálculos mais precisos e maiores informações podem ser obtidos utilizando-se como medida do decréscimo de luz, o efeito gama, que é definido como a razão entre o decréscimo na quantidade de luz produzida durante o tempo de ensaio (t) e a quantidade de luz remanescente nesse período. Neste caso, a determinação gráfica da CE_{50} é feita registrando-se o logarítmo das concentrações testadas da amostra versus o logarítmo dos valores de gama obtidos.

Obs.: Para a agilização nos cálculos requeridos para a determinação da CE_{50}, podem ser empregadas calculadoras programáveis ou programas correspondentes para uso em computador.

Considerando que o valor da CE_{50} é inversamente proporcional à toxicidade da amostra (quanto menor o valor da CE_{50}, maior a toxicidade da mesma), a transformação desses valores em unidade tóxica (U.T.) pode facilitar a compreensão dos resultados, visto que a mesma apresenta uma relação direta com o grau de toxicidade da amostra (quanto maior o valor da U.T., maior a toxicidade). Para este bioensaio, a unidade tóxica (U.T.) é calculada da seguinte forma:

$$U.T. = \frac{100}{CE_{50}}$$

8. INTERPRETAÇÃO E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

A expressão dos resultados é feita através do valor da CE_{50} devendo-se especificar o tempo correspondente de exposição da suspensão bacteriana às diferentes concentrações da amostra em teste (5, 10, 15, 20 e 30 minutos), a temperatura em que foi realizado o ensaio (15ºC) e o pH da amostra.

Se não for observada inibição na produção de luz pelo microrganismo-teste, o resultado pode ser relatado como ausência de efeito tóxico da amostra analisada, nas condições do teste.

9. CLASSIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

O grau de toxicidade da amostra é definido através do valor de

CE_{50} obtido. Com exceção dos casos em que concentrações conhecidas de substâncias químicas são testadas (individualmente ou em mistura), a concentração da amostra é expressa em porcentagem, sendo os resultados de CE_{50} fornecidos em termos de porcentagem da amostra original. Nestes casos, as amostras podem ser classificadas, em função do valor de CE_{50} obtido, conforme segue:

CE_{50} (% da amostra original)	Classificação da amostra
25	muito tóxica
25-50	tóxica
51-75	moderadamente tóxica
75	levemente tóxica

10. LAUDO TÉCNICO

O laudo técnico relativo ao ensaio deve incluir as seguintes informações:

- metodologia empregada
- tipo de cepa empregada
- pH da amostra
- concentração efetiva da amostra em teste que causou redução de 50% da quantidade de luz produzida pelo microrganismo-teste (CE_{50}) nas condições do ensaio (definir o tempo de exposição dos microrganismos à amostra em teste e a temperatura em que foi realizado o ensaio). Valor da unidade tóxica correspondente (U.T.).
- classificação da amostra quanto ao grau de toxicidade
- interpretação dos resultados obtidos.

11. LITERATURA BÁSICA

As referências fornecidas a seguir podem colaborar no desenvolvimento e elaboração de protocolos e fornecer informações sobre o ensaio descrito, não devendo, no entanto, serem consideradas como única fonte de informação para realização do ensaio.

11.1. BECKMAN INSTRUMENTS, INC. Microtox™ model 2055 toxicity analyzer system: an approved bioassay for the assessment of toxicity - pratical, real-time, measurement of toxicity with a biological system. California, Beckman Instruments, s.d. 8p. (bulletin 6984A: U.S. Patent: 4213703).

11.2. _____. Microtox™ system operating manual. Califórnia, Beckman Instruments, 1982. p.i. (CA92634: 015-555879).

11.3. BULICH, A.A. Use of luminescent for determining toxicity in aquatic enviroments. In: MARKING & KIMERLE ed. Aquatic Toxicology, Philadelphia , 1979, p.98-106. (ASTM-667).

11.4. _____. Microtox: a bacterial toxidity test with several environmental applications. In: LIU & DUTKA, ed. Toxicity screening procedures using bacterial systems. New York, Marcel Dekker, 1984. p.55-64.

11.5. CHANG, J.C.; TAYLOR, P.B. & LEACH, F.R. Use of the microtox™ assay system for environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26: 150-156, 1981.

11.6. COLEMAN, R.N. & QURESHI, A.A. Microtox and Spirillum volutans test for assessing toxicity of environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35: 443-451, 1985.

11.7. De ZWART,D. & SLOOF, W. The microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of wster polluitants. Aquatic Toxicology, 4: 129-138, 1983.

11.8. QURESHI, A.A.; COLEMAN, R.N. & PARAN, J.H. Evaluation and refinement of the microtox™ test for use in toxicity screening. In: LIU & DUTKA, ed. Toxicity screening procedures using bacterial systems. New York, Marcel Dekker, 1984. p. 1-22.

D.1.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA PARA Spirillum volutans

Data de revisão: 09/87

1. OBJETIVO

O ensaio de toxicidade aguda utilizando-se Spirillum volutans tem por objetivo detectar a ação tóxica de um determinado composto químico ou de uma mistura complexa sobre o microrganismo-teste, S. volutans, através da perda da motilidade reversa típica dessa bactéria.

2. APLICAÇÃO

O teste de toxicidade aguda utilizando-se S. volutans tem uma ampla aplicação, incluindo-se entre as principais:

- avaliação da toxicidade de efluentes industriais e corpos d'água receptores;
- avaliação da toxicidade de águas residuárias, a serem submetidas a tratamento biológico, protegendo o lodo ativado de choques tóxicos;
- determinação do risco potencial de novas substâncias químicas, através da avaliação de sua toxicidade;
- avaliação da toxicidade de lixiviados de despejos sólidos.

Deve-se tomar certo cuidado na utilização deste ensaio para avaliação da toxicidade de amostras contendo sódio (Na^+), uma vez que estas bactérias são sensíveis a este íon, bem como na avaliação da toxicidade de amostras contendo misturas de íons metálicos, uma vez que estes podem apresentar efeitos antogônicos, aditivos ou sinérgicos.

3. FUNDAMENTO

O fundamento do teste é o fato dessas bactérias, extremamente móveis, perderem sua motilidade reversa típica quando em presença de substâncias tóxicas.

4. DEFINIÇÕES

4.1. Toxicidade aguda

É a propriedade do agente tóxico causar efeitos adversos a organismos vivos após um curto período de exposições dos mesmos a este agente.

4.2. Motilidade reversa

É o movimento bacteriano típico devido à presença de flagelos polares em cada uma das extremidades do Spirillum volutans.

4.3. Sistema de "endpoints"

É o conjunto das 3 alterações que podem ocorrer na motilidade típica da bactéria-teste (S. volutans) pela ação de produtos químicos tóxicos.

4.3.1. Motilidade "forward" ou descoordenada - é o movimento bacteriano em apenas uma direção devido à rotação unidirecional dos flagelos.

4.3.2. Motilidade vibratória ou de "spin" - é o movimento vibratório em uma área muito limitada, ou então movimento tipo "spin", devido à rotação oposta dos flagelos. Nesse estágio podemos observar bactérias imóveis apenas com os flagelos em movimento.

4.3.3. Imobilização total bacteriana - quando ocorre perda total do movimento celular e flagelar (inativação celular).

4.4. $MEC_{90,30'}$

É a concentração mínima efetiva do produto tóxico que causa a perda da motilidade típica de 90% dos microrganismos-teste (Spirillum volutans) em 30 minutos de exposição nas condições do teste.

5. MATERIAL NECESSÁRIO

5.1. Equipamento

Microscópio de campo escuro

5.2. Solução-padrão

A substância-padrão de referência utilizada é o mercúrio ($HgCl_2$) podendo, no entanto, ser também utilizado: zinco ($ZnSO_4$), níquel ($NiCl_2$), chumbo ($PbCl_2$) ou cobre ($CuSO_4$).

5.3. Organismo-teste

O Spirillum volutans é uma bactéria aquática de grandes dimensões (1,4 - 1,7 / 16 - 28 um), com motilidade característica, descrita em 1832 por Ehrenberg, e somente isolada como cultura pura em 1962 por Rittenberg e colaboradores.

A cepa Spirillum volutans utilizada no teste de toxicidade é obtida a partir da American Type Culture Collection sob o código ATCC - 19554.

6. PROCEDIMENTO DO TESTE

O método de análise é baseado na metodologia de BOWDRIE e KRIEG (1974), modificada por DUTKA (1978).

6.1. Manutenção da cultura

As culturas de Spirillum volutans são submetidas em meio de cultivo apropriado com repiques a cada 2-3 dias . O procedimento para o repique consiste em remover, com uma pipeta Pasteur, o anel de crescimento (2-5mm abaixo da superfície do tubo) e transferí-lo para um novo tubo de meio de cultura. O inóculo deve ser colocado no fundo do tubo, tomando-se o cuidado de não introduzir bolhas de ar no meio de cultura. As culturas de manutenção são incubadas a 23ºC por 2-3 dias e as culturas-teste a 28ºC por 24 horas.

Verificar mensalmente a pureza da cultura de S. volutans, inoculando 1ml da mesma em uma placa de "Plate Count Agar" (técnica de "pour plate") e incubando a 35ºC durante 48 horas . O crescimento de qualquer colônia indica contaminação da cultura.

6.2. Teste de viabilidade

Para observar a viabilidade das culturas de manutenção

preparar uma lâmina com uma gota da cultura e uma gota de água destilada estéril e fazer leitura em microscópio de campo escuro. Uma cultura viável deve conter poucas bactérias mortas com a maioria apresentando o padrão típico de motilidade dessas bactérias. Este teste deve ser feito 2 vezes ao mês pelo menos.

6.3. Grupos controlados

Controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada ensaio para assegurar a viabilidade da cepa e sua sensibilidade frente a uma substância química reconhecidamente tóxica. O controle positivo deve apresentar 100% de inativação celular no intervalo de tempo de 30-60 minutos. O controle negativo deve apresentar pouca ou nenhuma perda da motilidade típica durante as 2 horas de teste.

6.4. Teste das substâncias químicas ou amostras aquosas ambientais

Solvente:

As substâncias químicas e/ou amostras em teste e o controle positivo padrão devem ser dissolvidos em água destilada estéril.

As substâncias químicas não solúveis em água devem ser dissolvidas em solventes adequados e previamente testados quanto à toxicidade frente à cepa de Spirillum volutans.

6.5. Concentração de exposição

As substâncias químicas puras e as amostras aquosas ambientais devem ser testadas em várias concentrações frente à cepa de Spirillum volutans para se determinar a concentração mínima efetiva do produto tóxico que causa a perda da motilidade típica e/ou imobilização total de 90% das bactérias em um determinado intervalo de tempo (MEC_{90} em 30').

As amostras aquosas ambientais são inicialmente testadas puras e a partir dos resultados obtidos são realizadas as diluições necessárias para obtenção do MEC_{90} em 30'.

6.6. Execução do teste

Adicionar 0,9 ml da amostra pura ou da diluição da amos-

tra a 0,1 ml da cultura de 24 h de Spirillum volutans e preparar imediatamente uma lâmina com uma gota da amostra.

Fazer a seguir leitura em microscópio de campo escuro, sendo essa leitura no tempo zero (t_0) e anotar em protocolo apropriado a porcentagem de células encontradas em cada um dos três "endpoints".

Fazer novas lâminas nos intervalos de tempo 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, repetindo as leituras em microscópio de campo escuro.

O teste deve ser feito em paralelo com o controle positivo e negativo. O controle positivo, contendo 0,9 ml de uma solução de cloreto de mercúrio a 10 ppm de Hg^{2+} mais 0,1 ml da cultura de S. volutans deverá apresentar 100% de inativação celular no intervalo de tempo de 30-60 minutos.

O controle negativo contendo 0,9 ml de água destilada estéril mais 0,1 ml da cultura de S. volutans deverá apresentar pouca ou nenhuma perda da motilidade típica durante as 2 horas de teste.

Determinar para um intervalo de tempo pré-fixado (30') a concentração efetiva mínima capaz de imobilizar e/ou alterar o movimento reverso típico em 90% das bactérias. Produtos de baixa toxicidade podem requerer um intervalo de tempo maior (60, 90 ou 120') para otenção de MEC_{90}.

Quando o teste requer maior sensibilidade é possível escolher uma porcentagem de perda inferior à 90% ou aumentar o tempo de contato para 2, 4, 6, 18 ou 24 h.

7. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Sistema de "Endpoints"

Os resultados dos testes de toxicidade aguda são dados em porcentagem de perda da motilidade reversa típica considerando-se os 3 "endpoints": motilidade "forward", motilidade vibratória ou de "spin" e inativação bacteriana.

Por ser muito difícil estarem todas as células em uma das 3 categorias a um mesmo tempo, o resultado positivo é obtido quando a adição dos 3 "endpoints" for maior ou igual a 90%.

Utilizando-se os 3 "endpoints" na determinação do efeito tóxico é importante lembrarmos que sempre existe uma pequena porcentagem de células mortas em uma cultura normal e conseqüentemente no controle negativo. Por isto, na determinação da toxicidade devemos excluir a porcentagem de inativação celular do controle negativo.

7.2. Cálculo do resultado

O resultado é expresso em concentração efetiva mínima do produto tóxico necessária para eliminar o movimento típico em 90% das bactérias presentes após 30 minutos de contato à temperatura ambiente (MEC_{90}). Quando as amostras requerem um intervalo maior de 30' para obtenção de MEC_{90}, esse tempo deve ser especificado (MEC_{90}, 60', 90' ou 120').

Desde que a medida da toxicidade é inversamente proporcionando aos valores do MEC_{90} (quanto menor o MEC_{90}, maior a toxicidade), os resultados podem ser transformados em unidade tóxica (U.T.), o que nos dará uma relação direta da medida da toxicidade (quanto maior a U.T. maior será a toxicidade).

A unidade tóxica (U.T.) é calculada da seguinte forma:

$$U.T. = \frac{100}{MEC_{90}}$$

8. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados positivos dos testes de toxicidade aguda com Spirillum volutans indicam a presença de substâncias tóxicas capazes de alterar a motilidade típica dessas bactérias. Resultados negativos indicam que nas condições do ensaio não foi observado efeito tóxico agudo frente a cepa de Spirillum volutans.

Todas as avaliações e interpretações dos resultados apresentados no laudo final devem basear-se unicamente na presença ou ausência de efeito tóxico agudo sobre a bactéria teste.

9. CLASSIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

O grau de toxicidade da amostra é classificado de acordo com o valor de MEC_{90} obtido. Com exceção dos casos em que concentrações conhecidas de substâncias químicas são testadas (individualmente ou em mistura), a concentração da amostra é expressa em porcentagem, sendo os resultados de MEC_{90} fornecidos em termos de porcentagem da amostra original. As amostras são assim classificadas:

MEC_{90} (% da amostra original)	Classificação da amostra
25	muito tóxica
25-50	tóxica
51-75	moderadamente tóxica
75	levemente tóxica

10. LAUDO TÉCNICO

O laudo sobre o ensaio deve incluir as seguintes informações:

1. concentração da amostra ou substância química empregada;
2. pH da amostra;
3. controle positivo e negativo utilizados;
4. metodologia empregada;
5. concentração efetiva mínima do produto tóxico que causa a perda da motilidade típica e/ou imobilização total de 90% das bactérias (Spirillum volutans). Valor da unidade tóxica correspondente (U.T.);
6. classificação dos graus de toxicidade;
7. interpretação dos resultados obtidos.

11. LITERATURA BÁSICA

As referências fornecidas a seguir podem colaborar no desenvolvimento e elaboração de protocolos e fornecer informações sobre e ensaio descrito, entretanto elas não devem ser consideradas as únicas fontes de informações para realização do ensaio.

11.1. BOWDRIE, J.H. & KRIEG, N.R. Water quality monitoring:bacteria as indicators. Virginia Water Resources Research Center, Bulletin 69, 1974.

11.2. CARAWAY, B.H. & KRIEG, N.R. Uncoordination and recoordination in Spirillum volutans. Can. J. Microbiol., 18: 1749-1759, 1972.

11.3. DUTKA, B.J. Methods for Microbiological Analyses of Waters, Wastewater and Sediments. Department of Fisheries and the Environment, Inland Waters Directorate, Canada Center for Inland Waters, Burlington, 1978.

11.4. DUTKA, B.J. & KWAW, K.K. Application of four bacterial screening procedures to assess in the toxicity of chemicals in mixtures. Environmental Pollution, 29: 125-134, 1982.

11.5. GOATCHER, L.J. et alii. Evaluations and refinement of the Spirillum volutans test for use in toxicity screening In: Toxicity screenig procedures using bacterial systems. LIU, D. & DUTKA, B.J. (eds). Marcel Dekker Inc. N.York, 1984.

11.6. RITTENBERG, B.T. & RITTENBERG, S.C. The growth of Spirillum volutans Ehrenberg in mixed and pure cultures. Arch. Mikrobiol., 42 (2): 138-153, 1962.

11.7. WELLS, J.S. et alii. Cultivation of Spirillum volutans in a bacteria-free environment. Journal of Bacteriology, 90 (3),1965.

D.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA MICROCRUSTÁCEOS

D.2.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA PARA *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea)

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade aguda de agentes químicos para *Daphnia similis*.

2. FUNDAMENTO

Este método consiste na exposição de indivíduos jovens de *Daphnia similis* a várias concentrações do agente químico, por um período de 48 horas, nas condições prescritas.
Tal procedimento permite determinar a concentração efetiva inicial média CE_{50}, 48h, da substância-teste.

3. DEFINIÇÃO

3.1. Concentração efetiva inicial média - CE_{50},48h

Concentração nominal do agente químico no início do teste, que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos em 48 horas de exposição, nas condições de teste.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e equipamentos

Todo material que entrará em contato com a substância-teste deverá ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.
Como recipientes para teste podem ser utilizados tubos de ensaio aferidos para 10ml, cuidadosamente lavados e enxaguados.

4.1.1. - Medidor de pH
4.1.2. - Medidor de oxigênio dissolvido na água
4.1.3. - Agitador de tubos de ensaio
4.1.4. - Câmara incubadora com temperatura controlada para 20ºC
4.1.6. - Titulador para determinação da dureza total da água

4.2. Soluções e Reagentes

4.2.1. Água de diluição

Para o preparo de água reconstituída deve-se utilizar reagentes de grau analítico. A água usada para o preparo do meio sintético deve ser originária de um destilador de vidro ou água desionizada de pureza equivalente, com condutividade igual ou menor que 10uS/cm.

A água de diluição reconstituída é água mole (APHA, 1980), devendo possuir pH= 7,4 $\pm$ 0,2 , dureza total de 40 a 48 mg/L em $CaCO_3$ e condutividade em torno de 160uS/cm.

Para o preparo da água de diluição são utilizadas duas soluções, abaixo especificadas, nas seguintes proporções:

Solução 1.....20ml
Solução 2.....10ml
Água desionizada ou destilada.....970ml

As soluções 1 e 2 são preparadas da seguinte maneira:

Solução 1

Sulfato de cálcio ($CaSO_4.2H_2O$).....1,50g
Água desionizada ou destilada.....1000ml

Solução 2

Cloreto de potássio (KCl).....0,2g
Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$).....4,80g

Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)...6,10g
Água desionizada ou destilada.....1000ml

Após o preparo da água mole, introduz-se aeração durante pelo menos 24 horas, para homogeneização e para que seja atingida saturação máxima de oxigênio. Se o pH estiver abaixo de 7,2 ou acima de 7,6 deverá ser ajustado com o acréscimo de ácido clorídrico (HCl) 1N ou hidróxido de sódio (NaOH) 1N. A água não deve ser aerada após o ajuste de pH.

4.2.2. Soluções-estoque

As soluções-estoque devem ser preparadas no momento da realização do teste, dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente químico, a ser testado, em um volume definido de água de diluição. Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas ou dispersadas por intermédio de solventes que apresentam baixa toxicidade a Daphnia, desde que a concentração final destes não ultrapasse 0,1ml/L ou 0,1g/L na solução-teste. No caso de emprego de solventes deverá ser preparado, por ocasião do bioensaio, além de um controle com água de diluição, um outro com a concentração máxima de solvente utilizada.

Quando da utilização de solventes torna-se importante a análise química da solução-estoque.

4.2.3. Soluções-teste

Estas soluções devem ser preparadas através de misturas da solução-estoque em água de diluição, em diferentes proporções relativas. Nas soluções-teste são colocados os organismos a serem estudados.

4.3. Organismos-teste

Para a realização do teste devem ser utilizados organismos com 06 a 24 horas de idade, obtidos de culturas mantidas

em condições controladas (Anexo I). Para obtenção dos mesmos pode-se adotar o seguinte procedimento:

a) Um dia antes de iniciar o teste, um lote de fêmeas ovígeras é separado das culturas, utilizando-se para isso uma pipeta Pasteur com ponta arredondada, de diâmetro adequado. As fêmeas separadas são colocadas em um recipiente de vidro limpo, contendo 2 litros de água de diluição. Anota-se então o horário de início desta nova cultura e alimenta-se com um volume tal de suspensão algácea que cada organismo disponha de 5×10^6 células (Anexo II). O recipiente deve ser coberto com uma tampa de vidro para evitar possíveis contaminações pelo ar. No dia seguinte (menos de 24 horas após o início desta cultura), as fêmeas adultas são retiradas com pipeta Pasteur e recolocadas nas culturas originais. As jovens ali eclodidas poderão, então, ser utilizadas no teste.

b) Outro modo para separar as jovens é com o uso de peneiras. No caso de ensaios com Daphnia similis pode-se utilizar jovens que atravessam uma rede com malha de 500 um e que ficam retidas em uma rede de malha de 360 um. No caso de testes com outras espécies de Dapnhia o uso desta técnica fica condicionado a um estudo prévio sobre as dimensões adequadas das malhas das redes (ISO, 1976).

5. PROCEDIMENTO

Em tubos de ensaio aferidos para 10 ml, colocam-se volumes conhecidos de soluções-estoque e completa-se o volume para 8 ml com água de diluição para obter as concentrações-teste desejadas. O conteúdo do tubo é homogeneizado em agitador. Adiciona-se a cada tubo 2 ml de água de diluição contendo 5 organismos, completando-se, com isso, o volume final para 10 ml. Para cada teste prepara-se um controle somente com água de diluição e com o mesmo número de organismos durante o período de teste, de 48 horas. Os tubos são mantidos em estantes à temperatura de 20 $\pm$ 2ºC, em ambiente escuro. Ao término do teste verifica-se quantos organismos móveis restam em cada tubo e quantos se encontram imóveis. Aqueles que não são capazes de nadar por um intervalo de 15 segundos, após agitação suave do tubo, são considerados imóveis. Qualquer modificação no comportamento dos organismos-teste deve ser registrada.

5.1. Teste Preliminar

Este teste permite determinar a faixa de concentrações a ser utilizada no teste definitivo. Para este propósito utilizam-se 2 réplicas com 5 organismos em cada, preparando-se diferentes concentrações a partir das soluções-estoque. Para o preparo das soluções-teste deve-se utilizar intervalos de concentrações em escala logarítmica como, por exemplo, 32,0; 10,0; 3,2; 1,0; 0,32; e 0,10 mg/L, além de um controle.

Se houver dados insuficientes para estabelecer a faixa de concentrações necessárias para o teste definitivo, repete-se o teste preliminar, com inclusão de concentrações intermediárias ou ampliando a faixa de concentrações.

5.2. Teste Definitivo

Através da faixa estabelecida no teste preliminar prepara-se uma série de concentrações intermediárias, cada qual com 4 réplicas, em progressão geométrica de razão 1,3, por exemplo. Assim ter-se-á, para cada concentração, um total de 20 organismos, distribuídos em número de 5 em cada uma de 4 réplicas contendo 10ml de solução-teste. O teste é incubado a 20 $\pm$ 2ºC, em ambiente escuro, por um período de 48 horas e no término desse período registra-se o número de organismos móveis e imóveis em cada tubo.

Após a observação e registro do número de organismos móveis, faz-se a leitura do pH, oxigênio dissolvido e se possível a análise química das soluções-teste.

Todos os dados físico-químicos e biológicos devem ser anotados em uma ficha controle (Anexo III).

Com os dados de imobilidade obtidos no teste definitivo determina-se a $CE(I)_{50}$-48 horas e seu intervalo de confiança, através do método estatístico de LITCHFIELD & WILCOXON (1949) ou outros métodos similares citados na literatura.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Expressão dos Resultados

O resultado da $CE(I)_{50}$ deve ser acompanhado do intervalo

de confiança determinado estatisticamente. Os dados devem ser expressos em mg/L.

No caso da realização de análises químicas durante o período de teste, deve-se observar se o desvio padrão dos resultados obtidos em relação à concentração prevista não é maior do que 20%.

Se esta situação ocorrer, a concentração efetiva pode ser calculada em função dos resultados químicos e será expressa como CE_{50} 24 horas.

6.2. Relatório

Devem constar do relatório final os seguintes ítens:

a) Método utilizado,
b) Identificação da substância-teste;
c) Método de preparo da solução-estoque e solução-teste;
d) Dados biológicos incluindo idade e condições de cultura de Daphnia similis, e dados físico-químicos referentes ao teste;
e) Resultados de $CE(I)_{50}$ ou CE_{50}, 48 horas, com intervalo de confiança, análises químicas e método empregado nestas análises;
f) A concentração mínima que imobiliza 100% dos organismos e a máxima que não causa imobilidade;
g) Qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de teste;
h) Devem constar as modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste que podem influenciar os resultados.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

Consideram-se válidos os resultados que, no término do período de teste, atenderem os seguintes requisitos:

a) A porcentagem de organismos imóveis no controle não deve exceder 10%;
b) O teor de O_2 dissolvido deve ser 2mg/L;
c) No caso de Daphnia similis a CE_{50} 24 horas de $K_2Cr_2O_7$ deve estar entre 0,04 e 0,17 mg/L. Para outras espécies a faixa aceitável deve ser estabelecida;

d) A temperatura deve ser mantida a 20 ± 2ºC;

e) Organismos flutuantes no controle são considerados mortos, lembrando-se que não devem ocorrer mais de 10% de imobilidade.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 15º ED. NEW YORK, 1980.

8.2. CETESB. Água e Teste de Toxicidade Aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Norma técnica L5.018. CETESB, São Paulo. 1986. 27p.

8.3. ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Determination de l' inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus (Crustacés, Cladocére). Projeto de norma ISO/IC 147 - QUALITÉ DES EAUX. Paris, 1976.

8.4. LITCHFIELD, J.T & WILCOXON, F.A. A simplified method for evaluating dose effect experiments. J Pharm. Exp. Ther., 96: 99-113, 1949.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I

MÉTODO DE CULTURA DE Daphnia

Em cristalizadores de 4 litros colocam-se 3 litros de água mole, 40 organismos adultos e 40 de idade heterogênea. Em cada cristalizador devem ser colocados, também, 2 gastrópodos da espécies Limnea spp., Helissoma ssp., Physa spp. ou Biomphalaria spp.

A sala de manutenção da cultura de Daphnia deve ser limpa, isenta de substâncias ou vapores tóxicos e as culturas devem ser mantidas em temperatura de 20 ± 2ºC, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 (oito) horas de escuro, com intensidade luminosa de aproximadamente 1.000lux.

As culturas são alimentadas diariamente com uma suspensão de Chlorella vulgaris, de tal forma que o número de células de alga por Daphnia por dia seja de $5x10^6$ (Anexo II). Outras espécies de algas podem ser utilizadas como alimento a Daphnia.

Duas vezes por semana o volume de água de cada cultura é reduzido à metade por sifonamento, retirando-se, dessa maneira, os detritos depositados no fundo da cuba e o excesso de animais, mantendo-se assim a população em torno de 80 organismos de idade variada. Completa-se volume para 3 litros com água mole reconstituída. Uma vez por semana as culturas são transferidas para cristalizadores limpos.

Os frascos de cultura devem ser lavadas com água da torneira, passando-se gaze para a remoção de materiais aderidos nas paredes internas dos recipientes, enxaguando-se posteriormente com água destilada.

Sabe-se que em condições ambientais desfavoráveis podem surgir machos na cultura de Daphnia, a qual visualmente é composta apenas por fêmeas que se reproduzem partenogeneticamente.

Com o aparecimento de machos ocorre reprodução sexuada, resultando em efípios, que são ovos resistentes de coloração escura, visíveis na câmara de ovos das fêmeas adultas. Se dois ou mais efípios surgirem em uma cultura, a mesma deve ser descartada e nova cultura deve ser iniciada.

9.2. ANEXO II

MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE Chlorella vulgaris

Uma das maneiras de se cultivar algas em laboratórios como fonte de alimento para Daphnia é através da produção contínua de culturas unialgáceas em fermentadores (Fig. 1). Para tanto, o seguinte procedimento pode ser seguido:

a) Preparo do meio de cultura

Utiliza-se o meio LC-Oligo preparado como segue:

Solução 1

$Ca(NO_3).4H_2O$.....4g
Água bidesionizada.....100ml

Solução 2

KNO_3.....10g
Água bidesionizada.....100ml

Solução 3

$MgSO_4.7H_2O$.....3g
Água bidesionizada.....100ml

Solução 4

K_2HPO_4.....4g
Água bidesionizada.....100ml

Solução 5

$CuSO_4.5H_2O$.....30mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$.....60mg
$ZnSO_4.7H_2O$.....60mg
$CoCl_2.6H_2O$.....60mg
$Mn(NO_3)_2.4H_2O$.....60mg
$C_6H_8O_2.H_2O$.....60mg
H_3BO_3.....60mg
Água bidesionizada.....1000ml

Solução 6

$C_6H_5FeO_7.5H_2O$.....1,625g
$FeSO_4.7H_2O$.....0,625g
$FeCl_3.6H_2O$.....0,625g
Água bidesionizada.....1000ml

Solução 7

$NaHCO_3$.....15g
Água bidesionizada.....1000ml

Em 994ml de água bidesionizada adicionar:
Solução 1.....1ml
" 2.....1ml
" 3.....1ml
" 4.....1ml
" 5.....0,5ml
" 6.....0,5ml
" 7.....1ml.

Ajustar o pH desse meio com HCl ou NaOH para 7,1 ± 0,1, se necessário, e autoclavar a 121ºC por 15 min/litro.

b) Preparo do inóculo

Em condições assépticas (câmara de fluxo laminar) inocula-se células de Chlorella vulgaris, mantidas em meio de agar, em frascos erlenmeyer de 500ml contendo 100ml de meio L.C. Oligo esterilizado. Essa cultura deve ser incubada por 5 a 7 dias a 24 ± 2ºC, em agitação contínua de 145 rpm e iluminação contínua de intensidade 5000 lux.

Após esse período, a suspensão algácea deverá atingir de 6,0 a 20,0 x 10^6 células/ml. Utiliza-se esta cultura como inóculo para o fermentador. O fermentador inoculado é conectado ao suprimento de ar, devendo ser mantido em banho-maria a 20ºC sob iluminação constante de 2000 ou 3000 lux (Fig. 1).

c) Preparo de alimento para Daphnia spp

Após cerca de 4 a 5 dias verifica-se se a cultura algácea está em fase exponencial de crescimento. Nessas condições, retira-se o volume necessário do fermentador e centrifuga-se a 4000 rpm por 5 minutos, à temperatura de 15 a 20ºC,

descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se as algas em água mole.

Estima-se o número de células por ml de suspensão algácea, por meio de contagem ao microscópio óptico ou por leitura no espectrofotômetro.

A partir desse dado, calcula-se o volume a ser adicionado à cada cultura de Daphnia spp., de tal forma que sejam fornecidas 5×10^6 células por Daphnia por dia.

Detalhes dos procedimentos descritos nesse anexo encontram-se no Procedimento Operacional Padronizado nº 009-CETESB.

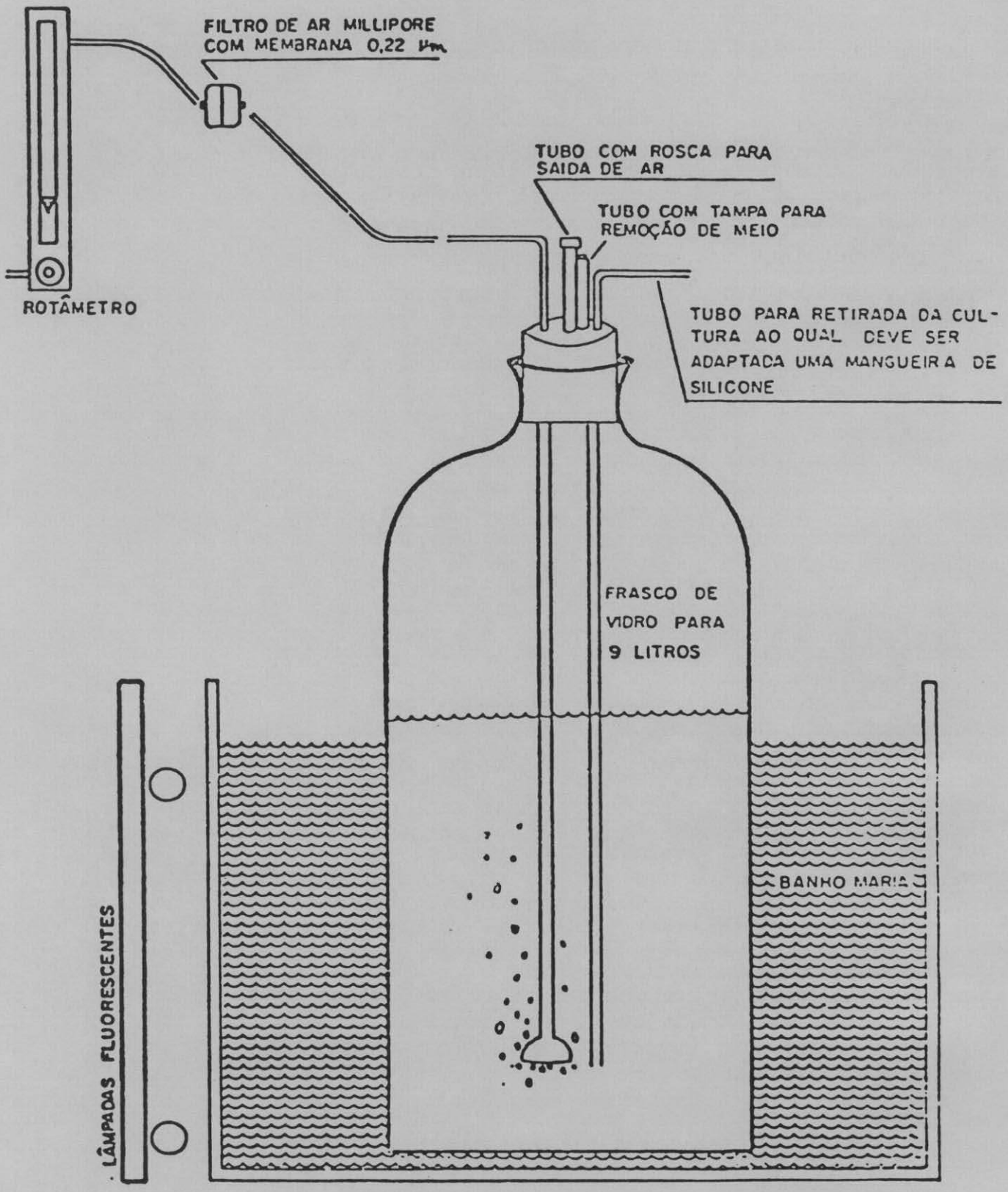


FIGURA 1 - Esquema para construção do Fermentador para cultivo de alga.

9.3 - A N E X O C

Ficha do teste estático definitivo com _____

Amostra _____

Dados físico-químicos da amostra: condutividade _____ Dureza (mg/L $CaCO_3$) _____ pH_____

Método utilizado para avaliação da toxicidade a curto prazo: _____

Início do teste: ____/____/____, às _____ horas. Término do teste: ____/____/____, às _____ horas.

Operador: _____. Água de diluição lote nº _____

R E S U L T A D O S

Concentração nominal	Nº de organismos móveis por tubo				Medidas finais		Nº de imóveis/ Nº total de organismos	% de imob. obtida	Análise estatística
	1	2	3	4	OD	pH			

Observações: _____

A N E X O C (VERSO)

FICHA CONTROLE DE TESTE

PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE

- Concentração da solução estoque _____ ml/L: _____ ml da solução de concentração _____ ml/L + _____ ml de água de diluição

- Concentração da solução estoque _____ ml/L: _____ ml da solução de concentração _____ ml/L + _____ ml de água de diluição

- Concentração da solução estoque _____ ml/L: _____ ml da solução de concentração _____ ml/L + _____ ml de água de diluição

- Concentração da solução estoque _____ ml/L: _____ ml da solução de concentração _____ ml/L + _____ ml de água de diluição

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE

Concentração da Solução - Teste (ml/L)	Volume da Solução-Estoque Adicionado (ml)				Volume de Água de Diluição (ml)
	Concentração da Solução-Estoque				
	ml/L	ml/L	ml/L	ml/L	

D.2.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA PARA Daphnia similis (Cladocera, Crustacea)

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade crônica de agentes químicos, durante a exposição de uma geração de Daphnia similis a diferentes concentrações da substância-teste.

2. FUNDAMENTO

Este método consiste na exposição de organismos jovens de Daphnia similis a várias concentrações do agente químico, por um período de 21 dias de exposição. Durante esse tempo avalia-se os efeitos da substância-teste sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos-teste.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Concentração de efeito não observado (CENO)

A maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em sete dias de exposição, nas condições de teste.

3.2. Concentração de efeito observado (CEO)

A menor concentração nominal do agente tóxico que causa efeito deletério, estatisticamente significativo, na sobrevivência e reprodução dos organismos em sete dias de exposição, nas condições de teste.

3.3. Valor Crônico (VC)

Média geométrica dos valores de CENO e CEO.

3.4. CE_{50}

Concentração do agente químico que causa um determinado efeito a 50% dos organismos-teste, em um tempo de exposição definido.

3.5. Número de jovens

Número total de jovens produzidos por fêmea adulta no período de 21 dias.

3.6. Comprimento do organismo

Comprimento total do organismo vivo, obtido através da medida entre o ápice da cabeça e a base do espinho abdominal e expresso em mm.

3.7. Efípio

Ovos resistentes, de coloração escura, visíveis na câmara de ovos de fêmeas adultas, resultantes da reprodução sexuada.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e equipamentos

4.1.1. - medidor de oxigênio dissolvido

4.1.2. - medidor de pH

4.1.3. - condutivímetro

Os materiais que entrarem em contato com as soluções-teste devem ser inertes e estar isentos de contaminantes.

4.2. Soluções e reagentes

4.2.1. - Água de diluição

A água natural ou reconstituída deve ser adequada à manutenção dos organismos e não deve afetar, durante o período do teste, o crescimento, reprodução e sobrevivência dos mesmos. A água deve ser aerada antes do seu uso e, quando necessário, filtrada para remoção de materiais em suspensão. Deve-se proceder periodicamente as medidas de pH, dureza, alcalinidade, carbono orgânico total, pesticidas, metais e outras análises para caracterização e controle de qualidade da água.

4.2.2. - Soluções-estoque

As soluções-estoque devem ser preparadas no momento da realização do teste, dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente químico em um volume definido de água de diluição. Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas ou dispersadas por intermédio de solventes que apresentem baixa toxicidade a Daphnia, desde que a concentração final destes não ultrapasse 0,1ml/L ou 0,1g/L na solução-teste. No caso do emprego de solventes deverá ser preparado, por ocasião do teste, além de um controle com água de diluição, um outro com a concentração máxima de solvente utilizada. Quando da utilização de solventes torna-se importante a análise química da solução-estoque.

4.2.3. - Soluções-teste

As soluções-teste podem ser obtidas a partir de soluções-estoque, que por sua vez são preparadas dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente químico num volume definido de água de diluição.

As concentrações devem ser preparadas tomando-se como base os resultados dos testes a curto prazo, 48 horas (CETESB, 1986).

A concentração mais alta a ser utilizada no teste deve ser a concentração mais baixa do teste a curto prazo, que produz efeito adverso nos organismos.

As soluções-teste devem ser preparadas no mesmo dia do início do teste.

Se a concentração do agente tóxico decrescer mais que 10% num período de 72 horas, o que pode ser atribuído à adsorção da substância às paredes do recipiente-teste, é necessário saturar os frascos com as soluções-teste antes do início do ensaio.

Se a concentração do agente tóxico na solução-teste decrescer mais que 30% em 72 horas, deve-se usar o procedimento com renovação contínua da solução (teste de fluxo contínuo).

5. PROCEDIMENTO

5.1. Descrição das condições do teste

5.1.1. - Os organismos devem ser manipulados com cuidado, para não terem seu comportamento e sensibilidade alterados e não sofrerem choques de temperatura. A temperatura não deve variar mais que 3ºC num período de 12 horas.

5.1.2. - A concentração de oxigênio dissolvido na água deve estar entre 60 a 100% de saturação e a concentração de amônia não ionizada deve ser inferior a 20ug/L.

5.1.3. - Uma variedade de alimentos tem sido adequada para manutenção de Daphnia, incluindo algas (Chlorella, Ankistrodesmus, Selenastrun, Chlamydomonas), leveduras e alimentos sintéticos de origem vegetal e animal. Quanto à qualidade e quantidade de alimento recomenda-se consultar o estudo realizado por GOULDEN & HENRY (1982). A concentração de alimento nas soluções-teste deve ser suficiente para manter o crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos e também não interferir na biodisponibilidade da substância-teste.

5.1.4. - O alimento é adicionado nas soluções-teste três vezes por semana, quando cada solução é renovada.

5.1.5. - Cultura e aclimatação de Daphnia

As culturas devem ser mantidas, pelo menos 21 dias antes do ínicio do experimento, nas mesmas condições de teste, com renovação da água de manutenção três vezes por semana. Este procedimento se faz necessário a fim de que seja comprovada a adequação das condições abióticas.

O teor de oxigênio dissolvido, temperatura, dureza da água, e outras condições devem ser as mesmas estabelecidas para o teste. Dez a doze dias antes do início do ensaio de ciclo de vida separam-se fêmeas adultas ovígeras da cultura e inícia-se uma nova cultura.

Jovens de menos de 24 horas de idade são obtidas dessa nova cultura e utilizadas no início do teste.

Para uma boa manutenção de Daphnia a cultura não deve conter mais de um organismo por 50ml de água.

5.1.6. - A temperatura média de água durante o período-teste, de 21 dias, deve permanecer entre 19 a 21ºC.

5.2. Execução

São utilizados 10 béqueres de 250ml para cada concentração, contendo 200ml de solução-teste.

As soluções-teste são preparadas a partir de soluções-estoque em diferentes proporções com a água de diluição. Nestas soluções é adicionado o alimento para Daphnia. As soluções devem ser preparadas no máximo até quatro horas antes do início do teste e são distribuídas nos béqueres. Posteriormente, os organismos são cuidadosamente adicionados ao acaso nos frascos teste.

Para cada concentração são colocados em sete béqueres, um organismo por béquer para obtenção dos dados de sobrevivência, crescimento e reprodução. Os três béqueres restantes conterão cinco organismos em cada, para registro dos dados de sobrevivência. Para cada teste é preparado o controle com água de diluição utilizando 10 réplicas.

Se for necessário o uso de solvente para diluir a substância-teste, deve ser preparada, além do controle, uma série de 10 réplicas com a maior concentração de solvente utilizada no experimento. Todos os béqueres são colocados ao acaso na incubadora e cobertos com uma placa de vidro. São preparadas pelo menos cinco concentrações-teste em série geométrica, com fator de 0,5.

Quando possível, maior número de concentrações podem ser utilizadas para assegurar a detecção das concentrações de efeito e de não-efeito.

A seleção das concentrações se baseia nos resultados obtidos no teste da toxicidade aguda (concentração mais baixa da substância-teste que causou um efeito).

Se este dado não for disponível utiliza-se, em geral, a concentração equivalente a 1/10 de CE_{50} como concentração mediana para a preparação das concentrações-teste.

O teste se inicia quando a Daphnia com menos de 24 horas de vida é adicionada na solução teste e termina no final do 21º dia de teste.

5.2.1. - Renovação das soluções teste e registro dos dados biológicos.

Se o teste se inicia numa 2ª feira as soluções devem ser renovadas nas próximas 4ªs., 6ªs e 2ªs feiras. Nos dias de renovação das soluções são registrados o número de organismos vivos e mortos de cada frasco.

Os organismos vivos são transferidos para frascos com soluções novas, com as mesmas concentrações-teste. É conveniente registrar o número de jovens nascidos dos sete béqueres após a transferência dos adultos.

Os béqueres com as soluções velhas são esvaziados, lavados adequadamente e enxaguados com água de diluição.

Nos 7º e 21º dias de teste os organismos dos sete béqueres, são contados e, com o auxílio de um retículo micrométrico ao microscópio, é medido o comprimento total de cada indivíduo. Devem ser

ainda anotados o dia da primeira reprodução, o número de natimortos e a incidência de desenvolvimento ou comportamento anormal dos organismos.

5.2.2. - Registro das condições abióticas

Para cada teste deve-se realizar o controle de qualidade da água de diluição: dureza, alcalinidade, pH, OD e condutividade são mensurados no começo e final do teste e uma vez por semana durante a renovação das soluções.

Se a concentração de OD nas soluções-teste cair para menos que 50% de saturação recomenda-se utilizar o sistema de fluxo contínuo.

Durante o período de 21 dias deve-se registrar a temperatura várias vêzes ao longo de cada dia ou as temperaturas máxima e mínima. O teste deve ser realizado a 20 $\pm$ 1ºC. A temperatura média deve estar entre 19 a 21ºC e a temperatura instantânea registrada a qualquer momento não deve sair da faixa de 17 a 23ºC.

A concentração nominal das soluções estoque deve ser verificada analiticamente.

As concentrações do agente químico em estudo nas soluções-teste devem ser determinadas analiticamente pelo menos uma vez por semana, em amostras às quais já foi adicionado o alimento. A diferença entre a concentração nominal e aquela determinada experimentalmente não deve ser superior a 30%.

Se isto ocorrer a causa deve ser identificada.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Vários métodos estatísticos são utilizados na interpretação dos dados obtidos no teste. Recomenda-se consultar o documento elaborado pela ASTM (1983) sobre o assunto.

Em geral, para determinar a menor concentração que afeta significativamente a sobrevivência, o crescimento ou a reprodução de Daphnia, é necessário que uma concentração-teste e todas as

mais elevadas a esta tenham exercido um efeito nas três variáveis acima mencionadas quando comparadas ao controle.
Os resultados devem ser expressos em valor crônico (VC), o qual será a média geométrica entre a maior concentração na qual não se observa efeito adverso (CENO) e a menor concentração que causa o efeito observado (CEO).

6.1. Relatório

Um relatório final dos resultados do teste deve conter informações quanto ao procedimento utilizado, identificando a metodologia empregada e qualificando os resultados obtidos.

O relatório deve conter:

- nome do teste e pesquisador, nome e local do laboratório e data de início e término do teste;
- descrição detalhada do material testado, incluíndo sua fonte, número do lote, composição, propriedades físico-químicas, identificação das concentrações, etc;
- descrição de como a água de diluição foi obtida ou preparada, suas características, registros e outras informações;
- informações detalhadas sobre o organismo testado, nome científico, fonte, idade e cultura utilizada;
- descrição do teste, recipientes, soluções, condições, luz, nº de organismos, etc;
- descrição detalhada quanto ao alimento (qualidade, quantidade);
- preparo das soluções-teste;
- temperatura teste: média e também faixa de temperatura durante o teste;
- métodos utilizados nas análises químicas;
- dados de sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos de controle e das demais soluções-teste;
- métodos estatísticos utilizados e resultados da aplicação dos mesmos;
- resumo dos efeitos gerais ou sinais observados nos organismos durante o período teste;
- resultados dos testes de toxicidade aguda;
- quaisquer modificações introduzidas no procedimento descrito neste método.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

7.1. Aceitabilidade do Teste

Um teste deve ser desprezado se ocorrer qualquer uma das seguintes situações:

- mais que 20% de mortalidade no controle;
- se no final de 21 dias, em cada controle, não houver produção, em média, de pelo menos 40 jovens;
- produção de efípios no controle;
- se a temperatura média não estiver entre 19 e 21ºC ou se for detectada, a qualquer momento, temperatura abaixo de 17ºC ou acima de 23ºC;
- se a concentração de OD, em média, for menor que 50% de saturação ou se, a qualquer momento, for detectada menos que 40% de saturação;
- se os resultados das análises químicas revelarem um desvio de concentração maior que 30% da concentração nominal.

7.2. Não é aceitável para teste a cultura que:

a) produzir efípio;
b) não produziu jovens até o 12º dia;
c) apresentar mais que 20% de mortalidade dos jovens durante uma semana antes do teste;
d) não produzir, em média, pelo menos três jovens por adulto por dia, num período de sete dias antes do teste.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. ASTM - Comittee E 47. Draft nº 4. Proposed Standard Practice for conducting Renewal life-cycle toxicity Tests with Daphnia magna (Strauss). 1983.

8.2. CETESB. Água. Teste de toxicidade aguda com Daphnia similis. Norma Técnica L5018. CETESB, São Paulo, 1986. 27p.

8.3. GOULDEN, C.E & HENRY, L.L. Nutrition of Daphnia used in Bioassay Studies. Final report of subcontract nº T 6418 (7197)-032 Contract nº 68-01.5043. Office of Pesticides and Toxic Substance.U.S. Environmental Protection Agency. May, 1982.

D.2.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA PARA Ceriodaphnia dubia (Cladocera, Crustacea)
Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade crônica de agentes químicos à Ceriodaphnia dubia.

2. FUNDAMENTO

Fêmeas de Ceriodaphnia dubia são expostas a várias concentrações da substância em estudo, por sete dias, em condições definidas de teste. Ao final desse período determina-se o número médio de jovens produzidos partenogeneticamente, por fêmea, e o número de fêmeas adultas sobreviventes. Os resultados incluem os efeitos sinérgicos, antagônicos e aditivos de todos os componentes físicos, químicos e biológicos que afetam adversamente as funções fisiológicas e bioquímicas dos organismos-teste.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Concentração de efeito não observado (CENO)
A maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos em 7 dias de exposição, nas condições de teste.

3.2. Concentração de efeito observado (CEO)
A menor concentração nominal do agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos em 7 dias de exposição, nas condições de teste.

3.3. Valor crônico (VC)
Média geométrica dos valores de CENO e CEO.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e Equipamentos

4.1.1. - medidor do oxigênio dissolvido (OD)
4.1.2. - medidor de pH
4.1.3. - condutivímetro
4.1.4. - aparelhagem para medir dureza da água
4.1.5. - câmaras de temperatura controlada

4.2. Soluções e Reagentes

4.2.1. - Água de diluição

A água natural ou reconstituída deve ser adequada à manutenção dos organismos e não deve afetar, durante o período-teste, o crescimento, a reprodução e a sobrevivência dos mesmos. A água deve ser aerada antes de seu uso e, quando necessário, filtrada para remoção de materiais em suspensão. Deve-se proceder periodicamente às medidas de pH, dureza, alcalinidade, carbono orgânico total, pesticidas, metais e outras análises para caracterização e controle de qualidade da água.

4.2.2. - Substância de referência

Cloreto de cádmio ou dodecil sulfato de sódio, de grau analítico.

4.2.3. - Solução-estoque

Esta solução deve ser preparada dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente químico num volume definido de água de diluição.

As soluções-estoque devem ser preparadas diariamente, com exceção dos casos em que o agente químico seja comprovadamente estável, sendo que em tais casos é recomendável o preparo a cada dois dias.

Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas ou dispersadas por intermédio de solventes com baixa toxicidade à Ceriodaphia spp. desde que a concentração final deste não ultrapasse 0,1ml/L ou 0,1g/L na solução-teste de concentração mais elevada no teste. No caso do emprego de solventes deve ser preparado, além do recipiente com água de diluição (controle), um outro recipiente (controle) com a concentração máxima do solvente utilizado no teste. Quando da utilização de solventes torna-se importante a análise química da solução-estoque.

4.2.4. - Solução-teste

Estas soluções serão preparadas através de misturas da solução-estoque em água de diluição de diferentes proporções relativas.

Nas soluções-teste serão colocados os organismos a serem estudados.

4.3. Organismo-teste

Ceriodaphnia dubia (Cladocera, Crustacea) de no máximo 8 (oito) horas de idade, obtidas por partenogênese e mantidas em condições controladas (Anexo I).

5. PROCEDIMENTO

5.1. Condições do teste

A qualidade e intensidade luminosas devem ser mantidas a níveis do ambiente, de aproximadamente 50 a 100 velas pé ou 10 a 100 lúmens, com um fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de escuro. É essencial que a temperatura das soluções de teste seja mantida a 25 $\pm$ 1ºC para obter três crias em sete dias.

O ambiente deve ser isento de vapores e poeiras tóxicas.

5.1.1. - Oxigênio dissolvido (OD)

O OD das soluções-teste deve ser mantido acima de 5mg/L, não sendo recomendada aeração durante o teste. Assim deve-se utilizar água saturada de oxigênio para o preparo das soluções.

5.1.2. - Alimentação

Os organismos nos frascos-teste são alimentados com uma dieta composta por bactérias, leveduras e extratos vegetais (Anexo I) na proporção de 0,1ml para 15ml de solução-teste, desde que a quantidade de sólidos totais em suspensão no alimento preparado seja 14mg/L.

5.1.3. - Renovação da solução-teste

A cada 2 dias e, se necessário, diariamente, usando uma pipeta de vidro com ponta arredondada, transfere-se cada organismo para 15ml de solução-teste recém-preparada já contendo o alimento. Os animais devem ser liberados abaixo da superfície da água para que não entre ar sob a sua carapaça.

5.1.4. - Determinações físico-químicas rotineiras

Pelo menos a temperatura, OD, pH, condutividade e dureza devem ser medidas, a cada troca de soluções, no controle e no tratamento contendo a maior concentração do material em teste.

5.2. Execução do teste

5.2.1. - Teste preliminar

A seleção das concentrações para teste deverá ser definida através de ensaios preliminares exploratórios. Utilizando-se a solução-estoque, deve-se preparar 5 soluções-teste com água de diluição. No preparo das soluções-teste utilizar

intervalos de concentração em escala logarítmica, por exemplo, 1000,0; 320,0; 100,0; 32,0 e 10,0mg/L. Além dessas soluções deve-se utilizar controle com água de diluição e no caso do uso de solventes um controle adicional. O teste preliminar deve ter duração de 48 horas.
Se houver dados insuficientes para estabelecer a faixa de concentrações necessárias para o teste definitivo, repetir o teste preliminar com a inclusão de concentrações intermediárias ou ampliando a faixa de concentrações.

5.2.2. - Teste definitivo

Com base no teste preliminar, são selecionadas 6 soluções-teste do agente tóxico, utilizando-se, também, neste caso, intervalos de concentração em escala logarítmica, porém incluindo-se soluções intermediárias que reduzirão a amplitude da faixa de concentrações.
Prepara-se uma quantidade de solução-teste para cada concentração do agente químico (e também do controle contendo o solvente, se for o caso) que seja suficiente para colocar 15ml em cada uma das 10 réplicas e restem 400ml para análise química.

a) Obtenção de neonatos para teste:
O teste requer neonatos com idade de, no máximo, 8 (oito) horas. Para obtê-los, fêmeas adultas são colocadas em béqueres de 30ml contendo 15ml de água mole, 4 a 5 dias antes do início do teste. Cerca de 8 (oito) horas antes do início do teste são removidos todos os jovens dos béqueres. Desta forma, quando o teste começar todos os jovens encontrados nos béqueres terão a idade de, no máximo, 8 (oito) horas.

b) Início do teste:

Imediatamente antes do início do teste a temperatura da amostra deve ser ajustada para 25 ± 1ºC e a amostra diluída em água de diluição à mesma temperatura, para preparo das diferentes concentrações.

Inicia-se o teste colocando um neonato, aleatoriamente, em cada béquer contendo 15ml da solução a ser testada, fazendo-se 10 réplicas em cada concentração. Os béqueres devem ser aleatoriamente dispostos em uma bandeja e sua posição deve ser mudada diariamente.

À exceção da dureza, os demais parâmetros devem ser medidos imediatamente antes e após a troca das soluções-teste, se possível na concentração mais elevada, em uma intermediária, na menor e no controle.

Se ocorrer uma mortalidade das fêmeas maior que 30%, medem-se os parâmetros físico-químicos citados em 5.1.1 e 5.1.4 nas concentrações em que isto ocorrer, para auxiliar na avaliação da causa da mortalidade.

c) Observação durante o teste:

Três crias são usualmente obtidas em um teste de 7 (sete) dias conduzido a 25ºC. A cada troca das soluções-teste conta-se e anota-se a sobrevivência do adulto e o número de jovens nascidos. Uma maneira fácil de contar as jovens é acrescentar 2 a 4 gotas de HCl 1N ao frasco contendo as jovens após a remoção das adultas.

Assim as jovens são mortas rapidamente e vão ao fundo. Quaisquer organismos já mortos no béquer devem ser contados antes do acréscimo do ácido. Para a contagem usa-se um microscópio estereoscópico. As jovens são descartadas após a contagem.

Se forem encontradas jovens em um béquer contendo uma adulta morta, assume-se que a morte ocorreu imediatamente antes da contagem. Os jovens vivos são computados na análise e a adulta é considerada viva na análise de sobrevivência.
Os resultados do teste são aceitos quando a letalidade no controle não exceder a 20% das fêmeas adultas.

d) Término do teste:
O teste deve findar exatamente 7 dias após o seu início, devido à rápida taxa de desenvolvimento de Ceriodaphnia. Um acréscimo de apenas algumas horas no período de teste englobaria uma parte importante do ciclo reprodutivo dos animais e poderia resultar em crias adicionais.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os dados são reunidos e tabelados. Anota-se o número de fêmeas sobreviventes e calcula-se o nº de jovens produzidos por fêmea adulta. A esses dados aplica-se o teste de Fisher e o teste de Dunnett, que inclui uma análise de variância (ANOVA) seguida de uma comparação da média do efeito observado em cada concentração do produto-teste com a média do controle.
São utilizados os dados combinados de reprodução e sobrevivência de Ceriodaphnia, que são expressos através da média do número de jovens produzidos por adulta para cada concentração da solução tóxica. No entanto, qualquer análise estatística deverá ser usada com o conhecimento das premissas ou suposições das quais o teste depende.
Recomenda-se consultar HORMING & WEBER, (1985). Os resultados devem ser expressos em valor crônico (VC), o qual será a média geométrica entre a maior concentração na qual não se observa efeito adverso (CENO) e a menor concentração que causa o efeito observado (CEO).

6.1. Relatório do Teste

Devem constar no relatório do teste as seguintes informações:

a) método utilizado;
b) identificação do agente tóxico;
c) procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
d) data da realização do teste (início e término);
e) dados biológicos e físico-químicos referentes ao teste;
f) resultado expresso em CENO, CEO ou VC e métodos estatísticos utilizados;
g) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições teste;
h) qualquer alteração dos procedimentos prescritos neste método.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

Periodicamente devem ser realizados testes com substâncias de referência, como o cloreto de cádmio ou dodecil sulfato de sódio, para avaliar a sensibilidade do lote de Ceriodaphnia jovens.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. CETESB. Água. Teste de toxicidade crônica com Ceriodaphnia dubia Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea). Norma Técnica L5.022. CETESB, São Paulo.

8.2. DUNNETT, C.W. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J.Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121, 1955.

8.3. HORNING II, W.B., & C.I. WEBER. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Environmental Monitoring and Support Laboratory. Cincinnati. U.S. EPA/600/4-85/014. 1985.

ANEXO I

Método de cultura

As culturas são mantidas nas mesmas condições controladas indicadas para o teste, sendo alimentadas diariamente com uma ração adequada, que pode ser preparada como segue:

a) Ração de truta fermentada: colocar 5g de ração de truta em 1,0L de água destilada, com aeração por baixo, de forma que a ração fique em suspensão, movendo-se constantemente na água. Manter assim por uma semana e a seguir filtrar em rede de plâncton com poros de 45um de diâmetro. A solução assim obtida pode ser congelada, em pequenas porções, para armazenamento e uso posterior.

b) Fermento: colocar 0,5g de fermento biológico seco em 100ml de água destilada, agitando até que dissolva.

c) Extratos vegetais: uma composição de folhas de cereais ou gramíneas desidratadas e trituradas, formando um pó fino, pode ser utilizada como fonte de fibras no alimento de Ceriodaphnia.

   Acrescenta-se 0,5g de pó em 100ml de água destilada e agita-se por 24 horas. Após esse período, filtra-se essa solução em rede de plâncton com poros de 45um de diâmetro.

   NOTA: Pode-se substituir esse componente do alimento por cultura de algas (Selenastrum, Ankistrodesmus) em fase exponencial de crescimento, devendo-se conservar a proporção de algas no alimento como um todo, considerando o peso seco das referidas algas.

Para preparo do alimento misturam-se partes iguais das três soluções obtidas da forma descrita acima.

Mantém-se uma Ceriodaphnia por béquer contendo 15ml de água mole e alimenta-se diariamente com 0,1ml do alimento preparado.

A cada dois dias (2ªs, 4ªs e 6ªs feiras) troca-se a água dos béqueres, descartando-se as jovens. A cada duas semanas é iniciada nova cultura com espécimes jovens.

O OD da água de manutenção deve ser medido semanalmente e os frascos de cultura devem ser cobertos, porém não tampadas hermeticamente, para permitir fornecimento de O_2 às culturas. Mudanças de pH não devem ultrapassar 0,5 unidade. Os organismos para teste

devem ser manuseados cuidadosamente e o mínimo possível, para que não sejam desnecessariamente estressados. A transferência de um frasco a outro deve ser feita com pipetas de ponta arredondada, cuidando-se para liberar os animais abaixo da superfície da água. Organismos machucados no manuseio devem ser descartados.
Deve ser observada a sobrevivência dos organismos em manutenção e os mesmos não devem ser usados em bioensaios se a sobrevivência entre duas trocas de água for menor que 80%.

D.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA PEIXES

D.3.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Data de revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade aguda de agentes químicos para espécies de peixes.

2. FUNDAMENTO

Este método consiste na exposição de peixes a várias concentrações do agente químico, em sistema de fluxo-contínuo, por um período de 96 horas de exposição, nas condições prescritas. Tal procedimento permite calcular a concentração letal inicial média $CL(I)_{50}$, 96h da substância-teste.

3. DEFINIÇÕES

Concentração letal inicial média - $CL(I)_{50}$, 96h

Concentração nominal do agente químico, no início do teste, que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos-teste em 96 horas de exposição.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e Equipamentos

4.1.1. - Medidor de oxigênio dissolvido em água

4.1.2. - Medidor de pH

4.1.3. - Condutivímetro

4.1.4. - Termômetro

4.1.5. - Balança analítica

4.1.6. - Titulador para determinação da dureza total da água

4.1.7. - Diluidores proporcionais (4 e 5) ou sistemas de dosagem (2)

4.1.8. - Bombas dosadoras

4.2. Vidraria

Todo material que entrar em contato com a substância-teste deverá ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.

As dimensões dos recipientes onde serão colocados os peixes estarão na dependência da massa dos organismos utilizados. Assim os recipientes devem comportar um volume de solução-teste que permita manter a relação de, no máximo, 1 grama de peixe por litro de solução.

4.3. Soluções de Reagentes

4.3.1. - Água de diluição

Para o preparo da água reconstituída deve-se utilizar reagentes de grau analítico. A água usada para o preparo do meio sintético deve ser originária de um destilador de vidro ou água desionizada de pureza equivalente, com condutividade igual ou menor que 10uS/cm.

A água de diluição reconstituída é a água mole devendo possuir pH = 7,4 $\pm$ 0,2, dureza total =40 a 48mg/L em $CaCO_3$ e condutividade ao redor de 170uS/cm. Os reagentes e as quantidades necessárias para o preparo da água estão discriminadas abaixo:

- dissolver 48,0mg de $NaHCO_3$; 30,0mg de $CaSO_4 . 2H_2O$; 614,0mg de $MgSO_4 . 7H_2O$ e 2,0mg de KCl em água destilada ou desionizada e diluir a 1.000ml.

Após a colocação dos sais, introduzir aeração artificial na água preparada, para homogeneização e para que o oxigênio atinja a saturação máxima. Se necessário ajustar o pH adicionando-se ácido clorídrico (HCl) 1N ou hidróxido de sódio (NaOH) 1N. Após o ajuste, a água não deve ser aerada.

4.3.2. - Solução-estoque

Esta solução deve ser preparada dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente químico num volume definido de água de diluição.

A solução-estoque deve ser preparada diariamente, com exceção dos casos em que o produto seja comprovadamente estável, sendo que em tais casos é recomendável o preparo a cada dois dias.

Agentes químicos com baixa solubilidade podem ser dissolvidos ou dispersados por intermédio de

solventes que apresentem baixa toxicidade a peixes, desde que a concentração final destes não ultrapasse 0,1ml/L ou 0,1g/L na solução-teste de concentração mais elevada no teste. No caso de emprego de solventes deverá ser preparado, além do tratamento com água de diluição (controle), um outro com a concentração máxima do solvente utilizado no teste. Quando da utilização de solvente, torna-se importante a análise química da solução-estoque.

4.3.3. - Soluções-teste

Estas soluções serão preparadas através da dissolução da solução-estoque em água de diluição, em diferentes proporções relativas. Nas soluções serão colocados os peixes a serem estudados.

4.4. Organismos-teste

As seguintes espécies de peixes podem ser utilizadas neste método:

- Preferencialmente espécies de peixes autoctónes pertencentes à família CHARACIDAE.
- Opcionalmente podem ser utilizadas: Pimephales promelas ou Brachydanio rerio (CYPRINIDAE) e Poecilia reticulata (POECILIIDAE).

Os organismos devem pertencer a lotes homogêneos e de mesma idade, devendo ser mantidos em aclimatação por uma semana antes do início do teste, nas mesmas condições de água e temperatura a serem utilizadas no experimento.

A alimentação deve ser interrompida 24 horas antes do início do teste. Os organismos devem estar livres de doenças ou malformações, não devendo receber tratamento contra doenças durante o teste ou nas duas semanas anteriores. O alimento básico para os peixes pode ser ração destinada a esse fim, desde que sua composição seja conhecida.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Descrição das condições experimentais

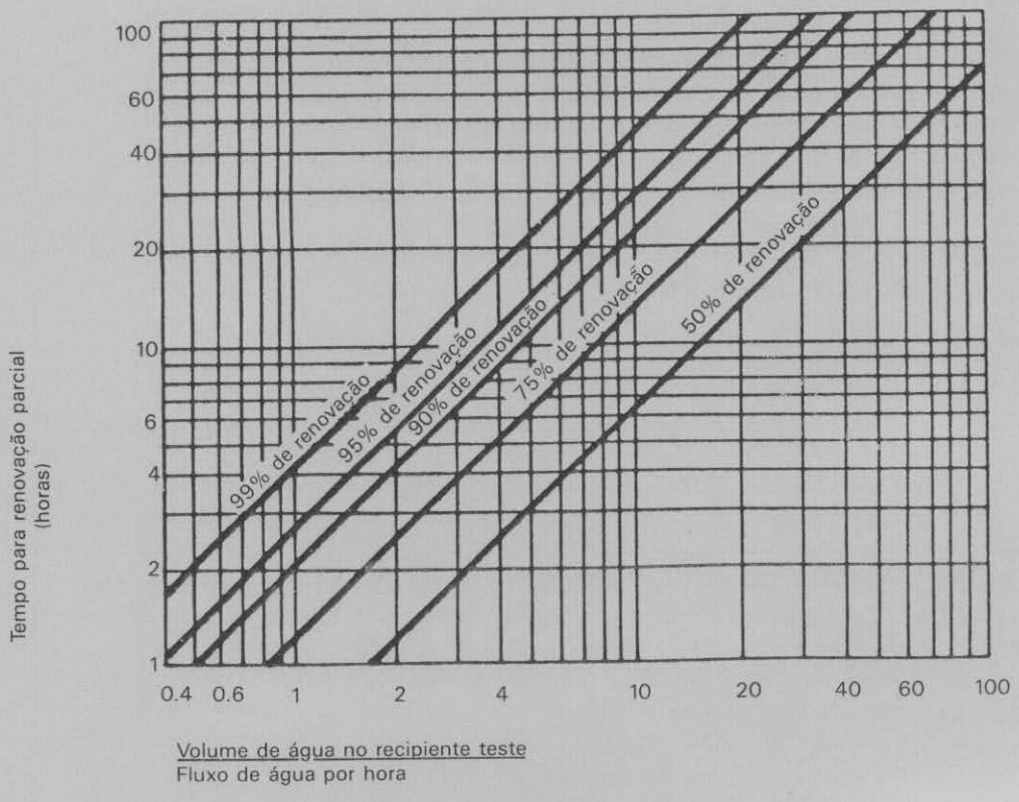
5.1.1. - A temperatura das soluções-teste deve ser mantida a 23± 1ºC.

5.1.2. - Durante o teste os peixes não devem ser alimentados.

5.1.3. - O preparo e o armazenamento das soluções, assim como a manutenção e os testes com peixes, devem ser realizados em atmosfera livre de vapores prejudiciais. Os peixes devem ser mantidos em locais isentos de barulho e de trânsito. A iluminação deve ser a normalmente usada em laboratório, com fotoperíodo diário de 11 horas.

5.1.4. - Os diluidores proporcionais ou sistemas de dosagem devem ser capazes de manter um volume de renovação da solução-teste dentro de um desvio máximo de 10%, nas diversas concentrações estudadas.

A renovação contínua das soluções-teste deve estar na dependência do tamanho do recipiente-teste. A taxa de renovação deve ser, no mínimo, de 90% à cada 24 horas. Para o cálculo da taxa de renovação de solução-teste recomenda-se utilizar o gráfico seguinte:



A taxa de renovação pode ser reduzida ou ampliada, desde que a solução descartada dos recipientes-teste permaneça com teores de oxigênio maiores que 40% de saturação.

5.1.5. - Na impossibilidade de utilização dos diluidores proporcionais ou sistemas de dosagem, para manutenção do fluxo-contínuo das soluções-teste, o sistema semi-estático é aceitável. Na utilização do sistema semi-estático todos os procedimentos descritos no presente método devem ser seguidos, à exceção da renovação das soluções-teste, a qual deve ocorrer a cada 24 horas.

5.2. Execução do Teste

5.2.1. - Teste preliminar

Utilizando-se a solução-estoque deve-se preparar cinco soluções-teste do agente tóxico a ser estudado, com água de diluição. No preparo das soluções-teste utilizar intervalos de concentração em escala logarítmica, por exemplo: 1.000,0; 320,0; 100,0; 32,0 e 10,0mg/L.

Além dessas soluções deve-se utilizar um recipiente-teste com água de diluição (controle) e, no caso do uso de solventes, será necessário um controle adicional.

Os recipientes-teste devem comportar um volume de solução-teste que permita manter a relação de, no máximo, 1 grama de peixe (em massa) por litro de água. Deverão ser utilizados cinco peixes por solução-teste estudada.

As soluções-teste devem ser mantidas à temperatura constante adequada à espécie-teste, não havendo necessidade de aeração artificial constante, salvo nos casos onde o oxigênio dissolvido apresentar valores abaixo de 40% de saturação.

O período de duração do teste preliminar deverá ser de 96 horas preferencialmente, sem a renova-

ção das soluções-teste, podendo ser desenvolvido no período mínimo de 48 horas.
Os peixes devem ser observados ao longo do teste; devendo ser registrados comportamentos anormais e mortes, sendo que os organismos mortos devem ser retirados.
Se houver dados insuficientes para estabelecer a faixa de concentrações necessárias para o teste definitivo, repetir o teste preliminar com a inclusão de concentrações intermediárias ou ampliando a faixa de concentração.

5.2.2 - Teste definitivo
Serão selecionados 5 ou 6 soluções-teste do agente químico em estudo, utilizando-se intervalos de concentrações em escala logarítmica, tais como, 100,0; 56,0; 32,0; 18,0 e 10,0mg/L. O controle será preparado com água de diluição e, no caso do uso de solventes, será necessário um controle adicional contendo água de diluição e o maior volume de solvente usado nas soluções-teste.
A seleção das soluções-teste será orientada pelo intervalo de concentrações, definido no teste preliminar, delimitado pela menor concentração na qual observou-se 100% de letalidade dos organismos e, pela concentração mais elevada na qual não se observou letalidade dos organismos.
Os recipientes-teste devem ser completados com a solução-teste e, quando a temperatura nas soluções estiver estabilizada, inicia-se a colocação dos peixes. Em cada recipiente serão colocados 10 peixes os quais devem ser distribuídos, ao acaso, dentro dos diferentes recipientes-teste. Para capturas dos peixes podem ser usadas puças de "Nylon" ou qualquer outro material inerte. Os peixes que acidentalmente caírem fora dos recipientes devem ser descartados.

Iniciar a operação do diluidor proporcional ou sistema de dosagem.

Devem ser anotados diariamente, para cada solução-teste, o número de peixes mortos, o pH, a condutividade, a temperatura e o oxigênio dissolvido. Qualquer comportamento anormal dos peixes devem ser anotado. Os peixes mortos dever ser removidos dos recipentes-teste tão logo esse fato seja notado.

Os organismos mortos dever ser pesados e medidos após sua remoção da solução, ou colocados em solução de formol neutralizado à 4% para obtenção dos referidos dados biométricos.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADO

6.1. O cálculo da $CL(I)_{50}$ e seu intervalo de confiança (P=0,05) devem ser obtidos conforme métodos estatísticos já desenvolvidos (8.6 a 8.9) para este fim. Esses valores devem ser expressos em miligramas por litro (mg/L).

Quando as médias dos resultados das análises químicas das soluções-teste, realizadas ao longo de teste, não diferem em mais de 20% das concentrações iniciais, a concentração letal a 50% dos organismos pode ser designada como CE_{50} ao invés de $CL(I)_{50}$.

6.2. Do relatório do teste devem constatar:

a) a especificação do agente químico teste e se as concentrações utilizadas referem-se ao produto puro ou ao material em formulação, e ainda, todas informações para identificação do mesmo;

b) data de início e término do teste;

c) o método de preparo da água de diluição, solução-estoque e soluções-teste, incluindo a descrição detalhada do equipamento utilizado para a renovação das substâncias-teste, ou referências bibliográficas relativas;

d) todos os dados biológicos e fisíco-químicos pertencentes ao teste, inclusive detalhes de condições de acli-

matação dos organismos e relação entre o peso dos indivíduos (expressa em gramas de peixes) e volume das soluções-teste;

e) a menor concentração da substância-teste na qual foi observada 100% de letalidade e a maior concentração na qual não ocorreu letalidade, para os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas;

f) a ilustração gráfica da relação concentração-resposta;

g) qualquer reação anormal dos peixes sob as condições do teste e qualquer efeito externo produzido pelo agente tóxico estudado; e

h) qualquer alteração deste método deve ser assinalada.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

7.1. Dos Organismos-teste

7.1.1. - Caso forem utilizados diferentes lotes de organismos, obtidos de fontes externas, para cada teste efetuado deve ser realizado um teste de toxicidade aguda, com 24 horas de duração, utilizando uma substância de referência.

7.1.2. - Organismos-teste mantidos em laboratório, por longos períodos, devem ser submetidos, ao menos uma vez ao mês, a teste de toxicidade aguda, com 24 horas de duração, utilizando uma substância de referência. O valor da $CL(I)_{50}$, 24h obtida, deve estar compreendido num intervalo de $\pm$ 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie e substância.

7.1.3. - A letalidade e/ou proporção de peixes com comportamento anormal no lote de peixes a serem submetidos ao teste, não deve ser maior do que 5% nas 48 horas precedentes ao início do teste.

7.2. Do teste

A concentração de oxigênio dissolvido nas soluções-teste deve ser pelo menos 40% do valor da saturação da água.
A letalidade e/ou proporção de peixes com comportamento anormal, no controle, não deve exceder 10%.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. DRAFT INTERNACIONAL STANDARD ISO/DIS 7346/1.2.3. Water quality. Determination of acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (Brachydanio rerio (HAMILTON-BUCHANAN) Teleostei Cyprinidae). 1982.

8.2. CETESB. Água - Teste de toxicidade aguda com peixes. Partes I/II/III. Norma Técnica L5.019. Cetesb, São Paulo, 1987.

8.3. APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. 15ª Ed. NEW YORK, 19890. p.615-743.

8.4. BENOIT, D.A; MATSON, V.R.; OLSON, D.L. A Continuous flow mini - diluter system for toxicity testing. Water Res., 16: 457-646, 1982.

8.5. MOUNT D.I. & BRUNGS, W.A. A simplified Dosing Apparatus for fish toxicology studies. Water Res., 1: 21-29, 1967.

8.6. STEPHAN, C.E. Measurements of calculating an LC 50. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. ASTM. S.T., 1977. p. 634.

8.7. HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimeed Spearman - Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassys. Environ. Sci. Technol., 7: 714-719, 1977. (CORRECTION 12(4): 417, 1978).

8.8. FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. Griffin Ltd. Wycombe, U.K., 1978.

8.9. LITCHFIELD, J.T. & WILCOXON, F.A. A simplified method for evaluating dose effect experiments. J.Pharm Exp. Ther., 96: 99-113, 1949.

D.3.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA PARA PEIXES

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade crônica de agentes químicos durante os estágios larvais de peixes.

2. FUNDAMENTO

Este método consiste na exposição de larvas de peixes recém-eclodidas à várias concentrações do agente tóxico, em sistema de fluxo-contínuo, por um período de 7 dias de exposição.
No final deste período avaliam-se os efeitos deletérios da substância-teste à sobrevivência e/ou crescimento dos organismos-teste.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Concentração de Efeito Não Observado (CENO)
Maior concentração do agente químico que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo, para a sobrevivência e/ou crescimento de peixes em 30 dias de exposição.

3.2. Concentração de Efeito Observado (CEO)
Menor concentração do agente químico que causa efeito deletério, estatisticamente significativo, para a sobrevivência e/ou crescimento de peixes em 30 dias de exposição.

3.3. Valor Crônico (VC)
Média Geométrica dos valores de CENO e CEO.

3.4. Concentração Letal Inicial Média - ($CL(I)_{50}$, 24h)
Concentração nominal do produto, no início do teste, que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos-teste em 24 horas de exposição.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e Equipamentos

4.1.1. - Medidor de oxigênio dissolvido em água

4.1.2. - Medidor de pH

4.1.3. - Condutivímetro

4.1.4. - Termômetro

4.1.5. - Balança Analítica

4.1.6. - Titulador para determinação da dureza total em água

4.1.7. - Diluidores proporcionais (6 e 7) ou sistemas de dosagem (5)

4.1.8. - Bombas dosadores

4.2. Vidraria

Todo material que entrar em contato com o agente químico deve ser quimicamente inerte e, preferencialmente, de vidro.

Os recipientes-teste, onde serão colocadas as larvas de peixes, devem ser aquários retangulares de vidro com capacidade, no mínimo, para 500ml de solução-teste.

4.3. Soluções e Reagentes

4.3.1. - Água de diluição

A água utilizada nos ensaios deve ser, preferencialmente, de recursos hídricos de boa qualidade, de rede pública de abastecimento (com a devida remoção do cloro residual), ou pode ser reconstituída, preparada em laboratório pela adição de sais em água destilada ou desionizada (condutividade menor que 10,0uS/cm

4.3.2.-Solução-estoque

Esta solução deve ser preparada dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente químico num volume definido de água de diluição.

A solução-estoque deve ser preparada diariamente, com exceção dos casos em que o produto-teste seja comprovadamente estável, sendo que em tais

casos é recomendável o preparo a cada dois dias. Produtos com baixa solubilidade podem ser dissolvidos ou dispersados por intermédio de solventes com baixa toxicidade a peixes, desde que a concentração final destes não ultrapasse 0,1ml/L ou 0,1g/L na solução-teste de concentração mais elevada no teste. No caso do emprego de solventes deve ser preparado, além do recipiente com água de diluição (controle), um outro recipiente controle com a concentração máxima de solvente utilizado no teste. Quando da utilização de solventes torna-se importante a análise química da solução-estoque.

4.3.3. - Solução-teste

Estas soluções serão preparadas através da dissolução da solução-estoque em água de diluição em diferentes proporções relativas. Nas soluções-teste serão colocados os peixes a serem estudados.

4.4. Organismos-teste

Até a padronização de métodos específicos para a avaliação da toxicidade crônica às espécies de peixes brasileiros, as espécies alóctones Pimephales promelas e Brachydanio rerio, podem ser utilizadas.

Os peixes reprodutores devem ser aclimatados às condições do teste por 15 dias, no mínimo, antes do início do teste de toxicidade.

5. PROCEDIMENTO

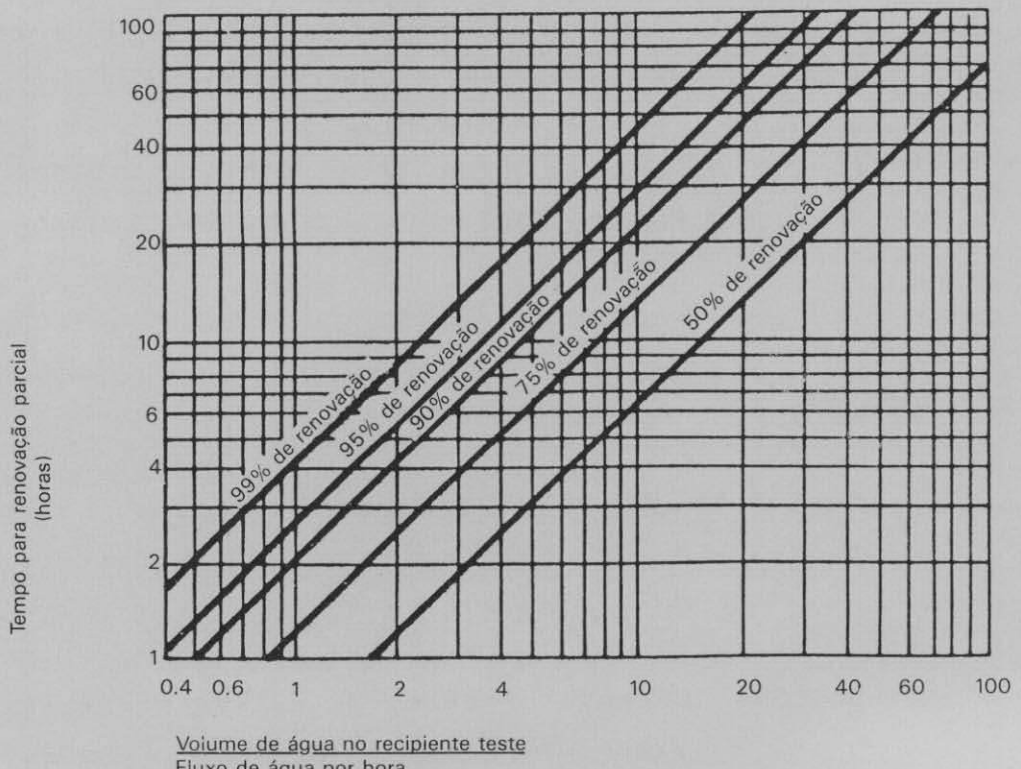
5.1. Descrição das condições experimentais

5.1.1. - A temperatura das soluções-teste deve ser mantida a 25 ± 2ºC.

5.1.2. - Durante o teste, as larvas de peixe recém-eclodidas devem ser alimentadas com náuplio de Artemia salina ao menos uma vez ao dia.

5.1.3. - O preparo e o armazenamento das soluções, assim como a manutenção e os testes com peixes, devem ser realizados em atmosfera livre de vapores prejudiciais.
Os peixes devem ser mantidos em locais isentos de barulho e de trânsito contínuo. A iluminação deve ser a normalmente usada em laboratório, com fotoperíodo diário de 11 horas.

5.1.4. - Os diluidores proporcionais ou os sistemas de dosagem devem ser capazes de manter um volume de renovação da solução teste dentro de um desvio máximo de 10%, entre as diversas concentrações estudadas.
O volume de renovação contínua da solução-teste está na dependência do tamanho do recipiente-teste. A taxa de renovação deve ser, no mínimo, de 90% a cada 24 horas. Para o cálculo da taxa de renovação de solução-teste recomenda-se utilizar o gráfico seguinte:



A taxa de renovação pode ser reduzida ou ampliada desde que a solução descartada dos recipientes-teste permaneça com teores de oxigênio maiores do que 40% de saturação.

5.1.5. - Na impossibilidade de utilização dos diluidores proporcionais ou sistemas de dosagem para manutenção do fluxo-contínuo das soluções-teste, o sistema semi-estático é aceitável. Na utilização do sistema semi-estático todos os procedimentos descritos no presente método devem ser seguidos, à exceção da renovação das soluções-teste, a qual deve ocorrer a cada 24 horas.

5.2. Execução do teste

5.2.1. - Teste preliminar

O teste preliminar indicará a faixa de concentração a ser utilizada no teste definitivo. O referido teste deverá ser o de toxicidade aguda (8.5) sem renovação das soluções-estoque, com duração mínima de 48 horas, utilizando-se larvas de peixes recém-eclodidas.

5.2.2. - Teste definitivo

Serão selecionadas 5 ou 6 soluções-teste do agente tóxico. A seleção das soluções-teste deve ser baseada na menor concentração que causa letalidade aos organismos em testes de toxicidade aguda. A partir dessa concentração são estabelecidas concentrações decrescentes com fatores de diluição maiores ou iguais a 0,5. Devem ser incluídos um controle com água de diluição e, em caso da utilização de solventes, um controle adicional contendo água de diluição e o maior volume de solvente utilizado nas soluções-teste. Devem ser utilizadas ao menos duas réplicas por concentração.

O teste deve iniciar com a colocação, de no mínimo, 10 larvas, recém-eclodidas, de peixes nas réplicas de cada solução-teste, perfazendo um total de 20 organismos por concentração estudada. Os organismos devem possuir menos que 24 horas de idade.

As larvas devem ser distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos e deve-se iniciar a operação dos diluidores ou sistemas de dosagem.

Deve ser anotada, diariamente, a sobrevivência de larvas sendo que os organismos mortos devem ser retirados dos aquários.

O período de duração do teste deve ser de 7 dias, sendo que os peixes sobreviventes, após este período, devem ser anotados e pesados.

As variáveis fisico-químicas, tais como pH, condutividade, temperatura, oxigênio dissolvido e, eventualmente, análises químicas do agente químico em estudo, devem ser medidas diariamente.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Pelo presente método, os efeitos deletérios para a sobrevivência e/ou crescimento (peso) dos organismos são medidos.

A CENO e a CEO devem ser obtidas pela verificação da diferença significativa (P=0,05) dos efeitos deletérios aos organismos entre as concentrações testadas e o controle. Para o cálculo da diferença significativa são indicados métodos estatísticos utilizados para esta finalidade (8.a.10).

O resultado do teste deve ser expresso em Valor Crônico (VC), na unidade miligrama por litro (mg/L).

6.2. Do relatório do teste devem constar:

a) a especificação da substância-teste e se as concentrações utilizadas referem-se ao agente químico puro (princípio ativo) ou ao material em formulação, e ain-

da, todas as informações para identificação do produto testado;

b) a água de diluição utilizada e o modo de preparo da solução-estoque e solução-teste, incluindo a descrição detalhada do equipamento utilizado para a renovação das substâncias-teste, ou referências bibliógraficas relativas;

c) todos os dados biológicos e físico-químicos pertencentes ao teste, inclusive detalhes de condições de aclimatação dos organismos e espécies utilizadas;

d) o resultado do teste expresso em CENO, CEO e VC (em miligramas por litro) do agente químico. Os métodos de cálculo dos resultados e das análises químicas devem ser citados;

e) data do início e término;

f) qualquer alteração deste método deve ser assinalada.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

7.1. Dos organismos-teste

7.1.1. - Caso forem utilizados diferentes lotes de organismos, obtidos de fontes externas, para cada teste de toxicidade crônica efetuado deve ser realizado um teste toxicidade aguda (3.5), com 24 horas de duração, utilizando-se uma substância de referência.

7.1.2. - Organismos-teste cultivados em laboratório devem ser submetidos, ao menos uma vez ao mês, a teste de toxicidade aguda (3.5) com 24 horas de duração, utilizando uma substância de referência. O valor de $CL(I)_{50}$, 24 horas obtida deve estar compreendido num intervalo de $\pm$ 2 desvios-padrão, em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie e substância.

7.2. Do teste

Para validade dos resultados não deve haver efeitos dele-

térios à mais do que 20% dos organismos do controle. A saturação de oxigênio nas soluções-teste deve ser superior à 40%.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. A.S.T.M. COMMITTEE E47. Proposed standard pratice for conducting toxicity tests with early life stages of fishes. Draft nº 4, 1982.

8.2. O.E.C.D. Guideline for testing of chemicals - Fish, early life-stage toxicity test. (S/D).

8.3. A.P.H.A. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15ª Ed. New York, 1980. p.615-743.

8.4. U.S.E.P.A. Environmental Protection Agency. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Efluents and Receiving water to freshwater Organisms. EPA/600/4-85/014, 1985.

8.5. CETESB. Água - Teste de Toxicidade aguda com peixes Partes I/II/III. Norma Técnica L5.019. Cetesb, São Paulo, 1987.

8.6. BENOIT, D.A.; MATTSON, V.R.; OLSON, D.L. A continous Flow mini diluter system for toxicity testing. Water Res., 16: 457-464, 1982.

8.7. MOUNT, D.I. & BRUNGS, W.A. A simplified dosing apparatus for fish toxicology studies. Water Res., 1: 21-29, 1967.

8.8. DUNNET, C.W. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50: 1096-1121, 1955.

8.9. FINNEY, D.J. Probit Analysis. 3rd. Ed. Cambridge Press, New York, 1971. 668 p.

8.10 STEEL, R.G.D. A multiple comparison rank sun test: treatment versus control. Biometrics, 15: 560-572, 1959.

D.3.3. AVALIAÇÃO DA BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar o grau de bioconcentração de agentes químicos em peixes.

2. FUNDAMENTO

Este procedimento consiste na exposição de espécies de peixes autóctones a diferentes concentrações da substância-teste durante um certo período de tempo. O sistema de exposição pode ser estático (sem renovação do meio), semi-estático (renovação periódica do meio) ou de fluxo contínuo, dependendo das características químicas da substância-teste em estudo.

A intervalos regulares amostras de água e de organismos devem ser coletados para acompanhar a assimilação da substância pelo organismo-teste até a sua acumulção máxima, que é atingida no estado de equilíbrio. Após esta fase, os organismos devem ser transferidos para uma água de boa qualidade, isenta de produto teste, para avaliação do grau de depuração de substância-teste bioacumulada.

A partir destes dados é calculado o fator de bioconcentração no estado de equilíbrio e as constantes de assimilação e depuração do agente químico em estudo.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Bioconcentração

Aumento da concentração do agente químico no organismo vivo em relação à concentração do agente químico na água.

3.2. Assimilação

Processo de absorção do agente químico pelo organismo-teste.

3.3. Depuração

Processo de eliminação do agente químico do organismo-teste para o meio.

3.4. Fator de Bioconcentração (FBc)

Razão entre a concentração de substância-teste no organismo (Cp) e a concentração da mesma na água (Ca).

3.5. Estado de Equilíbrio

Condição na qual a concentração da substância no organismo-teste é constante em relação ao tempo de exposição.

4. INFORMAÇÕES PRÉVIAS

Antes de se iniciar um teste, as seguintes informações devem ser obtidas sobre o agente químico em estudo:

- Solubilidade na água
- Estabilidade e reatividade na água
- CL_{50}, 96h para a mesma espécie de organismo-teste
- Método analítico para detecção da substância-teste na água e nos tecidos do organismo-teste.

Além dessas, as seguintes informações podem ser importantes:

- Solubilidade em outros solventes que não a água
- Volatilidade
- Coeficiente de partição octanol/água, pressão de vapor
- Pureza/composição da substância-teste.

5. MATERIAL NECESSÁRIO

5.1. Aparelhos e Equipamentos

- medidor de pH
- medidor do oxigênio dissolvido
- balança analítica
- sistema de ar comprimido
- sistema de ar condicionado/ou banho-Maria
- termômetro

- titulador para determinação da dureza total da água
- condutivímetro
- diluidores proporcionais (BENOIT et alii, 1980: NOUNT & BRUNGS, 1967) ou sistemas de dosagem (CETESB, 1987).

5.2. Vidraria

Aquários de vidro - O tamanho dos aquários dependerá da massa dos organismos utilizados no teste. Assim, os recipientes devem comportar um volume de solução-teste que permita manter relação de, no máximo, 1 grama de peixe por litro de solução.

NOTA: Todo o material que entrar em contato com a substância-teste deve ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro, aço inox ou plástico do tipo polietileno.

5.3. Soluções e Reagentes

5.3.1. - Água de Diluição

A água natural ou reconstituída deve ser adequada à manutenção dos organismos e não deve afetar os mesmos durante o período de teste. A água deve ser aerada antes de seu uso e, quando necessário, filtrada para remoção de materiais em suspensão. Deve-se proceder periodicamente às medidas de pH, dureza, alcalinidade, carbono orgânico total, praguicidas, metais e outras análises para caracterização e controle de qualidade da água.

Se a água de diluição é preparada a partir da água desclorada, deve ser demonstrado que amostras recentes da água de diluição mantêm a sobrevivência dos organismos durante o período de teste.

5.3.2. - Solução-estoque

Deve ser preparada no momento da realização do teste, dissolvendo-se uma quantidade adequada da substância-teste em um volume definido de água de diluição. Se a substância apresentar baixa solubilidade em água, podem ser utilizados sol-

ventes orgânicos, desde que estes não apresentem toxicidade a peixes. Não deve ser utilizado mais do que 0,1ml do solvente orgânico por litro de meio. No caso de emprego de solventes, deverá ser preparado também um controle com água de diluição e com a concentração máxima do solvente utilizado.

5.3.3. - Soluções-teste

Devem ser preparadas através da dissolução da solução-estoque em água de diluição em diferentes proporções relativas. Nestas soluções serão colocados os organismos-teste.

5.3.4. - Organismo-teste

É indicado o uso de espécies de peixes autóctones preferencialmente da família Characidae, por ser esta representativa de ambientes aquáticos encontrados no Brasil. Este método se aplica a outras espécies de peixes de águas continentais e marinhas.

Os procedimentos para coleta, manutenção, tratamento de doenças e aclimatação, bem como a qualidade dos organismos antes e durante o teste podem ser os descritos em USEPA (1975) e CETESB (1986).

6. PROCEDIMENTO

Os testes podem ser realizados em sistema estático (sem renovação do meio), semi-estático (renovação periódica do meio) ou de fluxo contínuo. A escolha do sistema de exposição está relacionada, principalmente, com a solubilidade da substância-teste em água. Assim, recomenda-se que os testes sejam realizados em:

Sistema estático - quando a substância-teste for solúvel em água.

Sistema semi-estático - quando a substância-teste apresentar solubilidade inferior a 200mg/L.

Sistema de fluxo contínuo - quando a substância teste apresentar solubilidade inferior a 1mg/L.

6.1. Descrição das condições experimentais

6.1.1. - O preparo e o armazenamento das soluções, assim como a manutenção e os testes com peixes, devem ser realizados em atmosfera livre de vapores prejudiciais.
Os peixes devem ser mantidos em locais isentos de barulho e de trânsito. A iluminação deve ser a normalmente usada em laboratório, com fotoperíodo diário de 11 horas.

6.1.2. - Durante o teste os peixes devem ser alimentados normalmente com alimento seco.

6.1.3. - A temperatura da solução-teste deve ser mantida constante.

6.2. Execução do teste (geral)

Os testes são realizados em aquários de vidro, aos quais são adicionadas as soluções-teste em quantidades conhecidas da solução-estoque e água de diluição. A temperatura da água deve ser adequada para a espécie testada.
O peso total dos organismos, colocados no recipiente-teste, deve ser, no máximo, de 1 grama de peixe por litro de solução.
As concentrações testadas devem ser baixas o suficiente para evitar efeitos adversos para os organismos-teste, como, por exemplo: 1/100 ou 1/1000 da CL_{50} para a mesma espécie de organismo, e suficientemente altas para permitir a análise química das amostras de água até o final do teste. Devem diferir entre si de um fator de 10. Além disso, as concentrações testadas não devem exceder a solubilidade da substância-teste na água.
Para cada teste deve-se preparar um controle, adicionando-se apenas água de diluição e organismos-teste. No caso de se realizar o teste em condições estáticas, deve-se

preparar um controle para cada concentração testada adicionando-se apenas a solução-teste. O primeiro controle, denominado biológico, permite verificar se os organismos, durante o período de exposição, permanecem em boas condições e o segundo permite avaliar a perda da substância, que não deve ser significativa no decorrer do teste.

A duração do teste está relacionada com as propriedades físico-químicas da substância-teste. De uma maneira geral, compostos altamente lipossolúveis requerem um tempo de exposição maior para atingir o estado de equilíbrio, quando comparados a compostos com baixa lipossolubilidade.

Quando o teste é realizado em sistema estático, o período de teste deve ser de, no máximo, oito dias. O teste deve ser interrompido mesmo que o estado de equilíbrio não tenha sido atingido. Nestes casos, o fator de bioconcentração pode ser calculado em função da concentração presente na água e no peixe após oito dias de exposição, apesar de que o FBc será sempre maior do que o assim calculado.

As soluções-teste não devem ser aeradas e a renovação destas deve ser de, no mínimo, 90% a cada 24h ou devem ser totalmente trocadas a cada 48h, no caso de se utilizar sistema de exposição de fluxo contínuo ou semi-estático, respectivamente.

De cada recipiente são retiradas, a intervalos regulares, amostras de água e peixe, no decorrer do teste, e estas devem ser analisadas o mais breve possível após a coleta, para se evitar a degradação ou perda de material-teste.

Se as amostras não puderem ser analisadas imediatamente, em alguns casos, pode-se extrair a substância-teste através do uso de um solvente e estocar o material até que este possa ser analisado.

Devem ser coletadas para cada teste pelo menos 7 amostras na fase de assimilação e estado de equilíbrio e pelo menos 5 amostras na fase de depuração. Estas devem ser espaçadas ao longo do período de duração do teste. É necessário também coletar uma amostra no início do teste.

Paralelamente, devem ser realizadas medidas de pH, teor de oxigênio dissolvido e temperatura das soluções de cada recipiente-teste.

As amostras de água devem ser coletadas através de sifo-

namento, com uma pipeta, a partir do ponto mais central do recipiente-teste.

Com relação à remoção dos organismos-teste para análise química, estes devem ser capturados de maneira a se provocar o mínimo de distúrbio possível para os outros organismos e devem ser sacrificados com uma punção no cérebro, com uma agulha de dissecação, ou através da secção da coluna vertebral na região opercular.

Os organismos devem ser pesados individualmente. Após a pesagem, o lote de peixes pode ser analisado em porções (amostra composta), individualmente ou apenas órgãos específicos, em quantidade suficiente para se proceder à análise química da amostra.

É indicada a determinação da porcentagem de lipídios em relação ao peso total do tecido para evitar a variação dos resultados entre amostras.

As análises químicas devem ser realizadas segundo os métodos padronizados específicos para cada substância-teste, seja tanto na água quanto nos organismos.

No caso da substância-teste formar metabólitos, deve-se realizar testes de bioconcentração para estes metabólitos.

7. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

O fator de bioconcentração é calculado através da fórmula abaixo indicada:

$$FBc = \frac{\text{Concentração do agente químico no organismo teste}}{\text{Concentração do agente químico na água}}$$

8. RELATÓRIO

Devem constar do relatório as seguintes informações:

- Método utilizado
- Descrição dos métodos químicos analíticos (água e tecido)
- Nome do laboratório executante das análises, assim como dos operadores

- Data de início e término do teste
- Descrição detalhada do agente químico testado, inclusive origem, número do lote, composição, propriedades físico-químicas, uso de solventes, identificação das concentrações teste, e outros
- Água de diluição utilizada (características)
- Organismo-teste
- Sistema utilizado, caso necessário descrição do aparelho e sistema de distribuição
- Métodos estatísticos
- Gráficos mostrando a acumulação e depuração do produto-teste, assim como o fator de bioconcentração
- Qualquer anormalidade observada durante o período de teste ou qualquer modificação na metodologia empregada.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

9.1. Validade dos resultados

Para que os resultados sejam considerados válidos é necessário que:

- A porcentagem de mortalidade dos peixes no controle seja menor ou igual a 10%.
- A temperatura e o oxigênio dissolvido da água não devem variar mais de 1ºC e 3mg/L, respectivamente

9.2. Sensibilidade

A sensibilidade dos procedimentos propostos é essencialmente determinada pela sensibilidade do método analítico utilizado para detectar a substância estudada.

10. LITERATURA BÁSICA

10.1. BENOIT, D.A.; MATSON, V.R.; OLSON, D.L. A continuous flow mini-dilutes System Toxicity. Water Res., 16: 457-464, 1982.

10.2. CETESB. Água. Teste de Toxicidade Aguda com peixes. Parte III. Norma Técnica L5.019 CETESB, São Paulo, 1987.

10.3. NOUNT, D.I. & BRUNGS, W.A.A. A simplified dosing apparatus for fish toxicology studies. Water Res., 1: 21-29, 1967.

10.4. OECD. Bioaccumulation: Static fish test (Guidelines for testing of chemicals 305D). 1981 a. 11p.

10.5. OECD. Bioaccumulation: Semi static fish test (Guidelines for testing of chemicals 305B). 1981 b. 11p.

10.6. OECD. Bioaccumulation: Flow-through fish test (Guideline for testing of chemicals 305F). 1981 c. 15p.

10.7. USEPA. Methods for Acute Toxicity tests with fish, macro-invertebrates and amphibions. EPA 600/3 - 75 - 006. 1985.

D.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA ALGAS

D.4.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA Chlorella vulgaris (alga clorofícea)

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade de agentes químicos sobre o crescimento de uma cultura monoespecífica de alga.

2. FUNDAMENTO

2.1. Este método consiste na exposição de uma cultura de Chlorella vulgaris a várias concentrações do agente químico, por um período de exposição de 96 horas, nas condições prescritas no método. Tal procedimento permite determinar a concentração efetiva inicial média - $CE(I)_{50}$, 96h da substância teste.

O método é executado em duas etapas:

a) teste preliminar, para estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo;

b) teste definitivo, para determinar a $CE(I)_{50}$, 96h.

3. DEFINIÇÕES

$CE(I)_{50}$, 96h: concentração efetiva inicial do agente químico que causa inibição de 50% da biomassa algácea em relação ao controle, em 96 horas de exposição, nas condições de teste.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e Equipamentos

4.1.1. - Mesa agitadora com iluminação de lâmpadas fluorescentes

4.1.2. - Microscópio óptico

4.1.3. - Centrífuga

4.1.4. - Câmaras para contagem celular

4.1.5. - Medidor de pH

Obs: Os materiais que entrarem em contato com a solução-teste devem ser quimicamente inertes, preferencialmente de vidro.
Como recipientes para teste podem ser utilizados frascos erlenmeyers de 500ml, cuidadosamente lavados e enxaguados.

4.2. Soluções

4.2.1. - Soluções-estoque

4.2.1.1. - A substância-teste deve ser pesada em frascos de vidro, dissolvida em água destilada ou desionizada e transferida para balão volumétrico. De acordo com as concentrações definidas para cada teste, várias soluções-estoque podem ser preparadas.

4.2.1.2. - Soluções-estoque com concentrações abaixo de 100mg/L devem ser preparadas por diluição em série, a partir de 100 ou 1000mg/L de solução-estoque.

4.2.1.3. - Recomenda-se a esterilização das soluções-estoque, através de autoclavagem ou filtração em membrana esterilizada, desde que estes procedimentos comprovadamente não alterem a substância-teste. Caso exista a possibilidade de alteração, recomenda-se preparar as soluções-estoque diluindo-se a substância-teste em água destilada ou desionizada esterilizada.

4.2.1.4. - Antes da realização do teste deve-se verificar se a substância-teste, nas maiores concentrações de exposição, altera o pH do meio de cultura. Se o pH estiver fora dos limites de 6,8 a 7,3, o pH da solução-estoque deve ser ajustado para 7,0 ± 0,1, utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 0,1 N.

4.2.2. - Soluções-teste

As soluções-teste são preparadas diretamente nos frascos erlenmeyers de 500ml.

4.2.2.1. - Alíquotas de 90ml de meio L.C.Oligo devem ser adicionadas em todos os frascos-teste. Estes devem ser fechados adequadamente e autoclavados a 121ºC por 15 minutos.

4.2.2.2. - Volumes definidos das soluções-estoque e água destilada ou desionizada devem ser adicionados nos frascos-teste, com pipetas esterilizadas, obtendo-se as concentrações escolhidas para o teste (Tabela 1). O volume final em todos os frascos deve ser o mesmo e deve estar entre 90 e 110ml.

TABELA 1 - Exemplo de preparo das soluções-teste

Concentração (mg/L)	Concentração da solução-estoque (mg/L)	Volume da solução estoque adicionada (ml)	Volume de água desionizada adicionada (ml)	Volume total de solução-estoque + água desionizada * (ml)
3,2	100	3,2	3,0	6,2
5,6	100	5,6	0,5	6,1
10,0	1000	1,0	5,0	6,0
18,0	1000	1,8	4,0	5,8
32,0	1000	3,2	3,0	6,2
56,0	1000	5,6	0,5	6,1
controle (meio L.C.Oligo)	-	-	6,0	6,0

* O volume total adicionado pode diferir até 10% entre as concentrações-teste.

4.3. Organismo-teste

O organismo-teste utilizado neste método é Chlorella vulgaris, espécie de alga verde mantida em meio L.C.Oligo, em culturas axênicas e condições controladas de temperatura e luminosidade.

4.4. Preparo da vidraria

Toda a vidraria utilizada no teste deve ser preparada da seguinte forma:

- lavar com detergente neutro ou carbonato de sódio
- enxaguar com água de torneira
- deixar em ácido clorídrico 10% por 24 horas.
- enxaguar com água de torneira e água destilada
- secar a vidraria limpa em estufa a 105ºC
- fechar os frascos erlenmeyers com tampas apropriadas, cobrir com papel de alumínio e autoclavar a 121ºC por 15 minutos.

Para lavagem de material contaminado com praguicidas deve-se utilizar o seguinte procedimento:

- enxaguar em água de torneira
- enxaguar em solução sulfocrômica
- enxaguar em água destilada
- enxaguar duas vezes com acetona
- enxaguar duas vezes com n-hexano
- enxaguar em água destilada por 5 vezes.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Descrição das condições experimentais

5.1.1. - A incubação dos frascos-teste deve ser realizada sob condições padronizadas de:

a) temperatura: 24 $\pm$ 2ºC
b) iluminação contínua: 5000 $\pm$ 10% lux
c) velocidade de agitação: 100 a 175 rpm
d) período teste: 96 horas.

5.1.2. - Meio de cultura

O meio de cultura utilizado no teste é o meio L.C.Oligo, cujo preparo está descrito no Anexo I.

5.1.3. - Preparo do inóculo de algas

Dois a três dias antes do início do teste, a cultura de alga mantida em agar (ver Anexo II) deve ser inoculada em 100ml de meio de cultura L.C.Oligo líquido esterelizado, utilizando-se uma alça de platina. Esta nova cultura deve ser mantida em incubação na mesa agitadora nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e agitação utilizadas no teste. No dia do teste, a nova cultura, que deverá estar na fase exponencial de crescimento, será utilizada como inóculo e deverá ser preparada da seguinte forma:

5.1.3.1. - Centrifugar a cultura em frascos de centrífuga esterilizados, durante 10 a 15 minutos a 1.500 rpm e descartar o sobrenadante.

5.1.3.2. - Ressuspender o sedimentado em 15 a 20ml de solução esterelizada de $NaHCO_3$ (15mg/L) e repetir o mesmo procedimento por mais duas vezes.

5.1.3.3. - A suspensão de células resultante deve ser amostrada para contagem da densidade de células de algas, utilizando-se câmaras para contagem celular e microscópio óptico, e o volume de inóculo a ser adicionado nos frascos-teste deve ser calculado, de maneira a resultar em uma concentração inicial de 10^4 ou 10^5 células/ml em cada frasco. O volume a ser adicionado deve estar entre 0,1 a 1,0ml.

Todo o procedimento de preparo do

inóculo deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, de maneira a evitar contaminação da cultura algácea.

5.1.4. - Preparo da amostra

Antes do preparo da amostra é importante ter conhecimento sobre as características físicas, químicas e toxicológicas do agente químico a ser testado, com o propósito de tomar os cuidados necessários no manuseio do mesmo.

O preparo das soluções e todas as etapas de teste devem ser realizadas em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas e à temperatura ambiente (23 ± 2ºC).

5.1.5. - Seleção das concentrações de exposição

Recomenda-se utilizar intervalos logarítmicos na escolha das concentrações a serem usadas no teste.

Cada intervalo de concentração pode ser adaptado de maneira a se obter a faixa de concentrações-teste requerida, através da mudança da vírgula decimal (Tabela 2).

TABELA 2 - Intervalos de Concentrações em escala logarítmica

Concentrações de exposição (mg/L)	Intervalo Logarítmico		
	0,5	0,25	0,125
	0,01	0,01	0,01
	0,032	0,018	0,013
	0,010	0,032	0,018
	0,32	0,056	0,024
		0,10	0,032
		0,32	0,042
		0,56	0,056
			0,075
			0,10

5.2. Execução do teste

5.2.1. - Teste Preliminar

O procedimento a ser seguido para o teste preliminar deve ser o mesmo descrito para o teste definitivo (ver 5.2.2), sendo que o intervalo entre as concentrações deve ser mais amplo e com duas réplicas para cada concentração.

5.2.2. - Teste Definitivo

Devem ser selecionadas 5 ou 6 concentrações do agente químico a ser testado, preparadas de acordo com 4.2.1 e 4.2.2 (ver Tabela 2), além do controle. A seleção dessas concentrações deve ser orientada pelo intervalo de concentração definido no teste preliminar, delimitado pela maior concentração que não causou inibição de crescimento (concentração não efetiva) e a menor concentração que promoveu inibição total ou parcial do crescimento algáceo. Recomenda-se a utilização de 3 réplicas para cada concentração.

5.2.2.1. - Inoculação das soluções-teste

Antes de receber o inóculo de algas, os frascos-teste devem ser agitados para homogeneização das soluções-teste. Após a adição do inóculo, os frascos devem ser novamente agitados. Alíquotas devem ser então retiradas de cada frasco para determinação do número inicial de células.

5.2.2.2. - Distribuição dos frascos ao acaso na mesa agitadora

Após a amostragem inicial, os frascos devem ser distribuídos ao acaso na mesa agitadora e a posição dos mesmos deve ser mudada todos os dias, de modo a minimizar possíveis diferenças espaciais da luminosidade e temperatura no crescimento algáceo.

5.2.2.3. - Determinação do crescimento algáceo

Diariamente devem ser colhidos 2 a 3ml de cada frasco-teste para determinação do crescimento algáceo. A medida do crescimento pode ser realizada através dos seguintes métodos:

a) contagem celular (ao microscópio óptico ou com contador eletrônico de partículas);
b) conteúdo de clorofila (fluorimetria ou espectrofotometria);
c) turbidez (absorbância luminosa a 750nm).

No caso de ser utilizada a contagem celular ao microscópio óptico, as amostras devem ser preservadas em lugol para posterior determinação do crescimento.

Qualquer que seja o método escolhido, recomenda-se a realização de curvas de regressão para estabelecimento da relação entre a unidade de leitura e o número de células/ml ou massa seca (g). Deve ser verificado, ao microscópio óptico, se ocorreram anormalidades no tamanho ou formato das células.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Cálculo da CE_{50} ou $CE(I)_{50}$

As biomassas iniciais (tempo 0) devem ser subtraídas das obtidas após 96 horas de exposição, obtendo-se, assim, a biomassa produzida em 96 horas. A biomassa média obtida em cada concentração após o período de exposição deve ser expressa como porcentagem em relação ao controle. Essas porcentagens serão utilizadas para o cálculo da CE_{50}, através da análise de regressão linear.

6.2. Expressão dos resultados

A $CE(I)_{50}$ e o intervalo de confiança correspondente devem ser expressos em mg/L. Quando os resultados das análises químicas das soluções-teste no término do teste não diferirem em mais de 20% das concentrações iniciais, a concentração efetiva a 50% dos organismos pode ser designada como CE_{50}, ao invés de $CE(I)_{50}$.

6.3. Relatório

Devem constar no relatório de teste as seguintes informações:

a) método utilizado;
b) identificação do agente químico;
c) procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
d) dados físico-químicos referentes ao teste;
e) resultados do teste expresso em $CE(I)_{50}$ ou CE_{50}, 96h, com intervalo de confiança a nível de 95%, e método estatístico utilizado;
f) a concentração mínima do agente tóxico que promove a inibição total do crescimento algáceo e a máxima que não inibe esse crescimento;
g) qualquer anormalidade observada na cultura de algas durante o teste;
h) modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

As culturas monoespecíficas de Chlorella vulgaris utilizadas nos testes devem ser axênicas, ou seja, isentas de contaminação microbiana.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. CETESB. Análise estatística dos resultados de testes de toxicidade aguda. Norma técnica L5.0,017. Cetesb, São Paulo. 1986. 29p.

8.2. CETESB. Água. Teste de toxicidade com Chlorella vulgaris. Norma Técnica L5.020. Cetesb, São Paulo, 1986. 15p.

8.3. LEE, C.M. Practical Aspects of Aquatic Toxicology-Workshop sobre desenvolvimento de técnicas em toxicidade aquática. São Paulo, CETESB, 20/09 a 08.10.82.

8.4. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 2-Effects on Biotic Systems - Test 201 - "Alga, Growth Inhibition Test". 1981.

8.5. AFNOR. Association Française de Normalisation. Norme. experimentale T90-304. Essais des eaux. Determination de l'inhibition de Scenedesmus subspicatus par une substance. 1980.

8.6. HORNING. W.B. & C.I. WEBER. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of efluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-85/014. Cincinnati, Ohio, 1985.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I - Preparo do Meio de Cultura L.C.OLIGO (AFNOR, 1980)

1. Soluções

Todas as soluções utilizadas na meio (Tabela 3) devem ser preparadas com reagentes de boa qualidade (P.A.) e com água destilada ou desionizada, com condutividade igual ou menor que 10us/cm e isenta de contaminantes.

TABELA 3 - Soluções-estoque do meio L.C.Oligo

Nº da solução	Substância química	Massa (g)	Volume final da solução (ml)
1	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	4	100
2	KNO_3	10	100
3	$MgSO_4.7H_2O$	3	100
4	K_2HPO_4	4	100
5	$CuSO_4.5H_2O$	0,030	1000
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0,060	
	$ZnSO_4.7H_2O$	0,060	
	$Mn(NO_3)_2.4H_2O$	0,060	
	$C_6H_8O_2.H_2O$	0,060	
	H_3BO_3	0,060	
6	$C_6H_5FeO_7.5H_2O$	1,625	1000
	$FeSO_4.7H_2O$	0,625	
	$FeCl_3.6H_2O$	0,625	
7	$NaHCO_3$	15	1000

2. Preparo do meio

Em balão volumétrico de 1 000ml, colocar 500ml de água destilada ou deionizada e adicionar na seguinte ordem:

a) 1ml das soluções 1, 2, 3 e 4;

b) 0,5ml das soluções 5 e 6;

c) 1ml da solução 7.

Completar para 1000ml com água e agitar durante 1 hora para estabilizar a solução. O pH do meio deve estar na faixa de 7,1 $\pm$ 0,1.

Se necessário, o pH do meio pode ser ajustado com soluções de NaOH ou HCl 1N.

O meio deve ser colocado em recipientes de borossilicato e autoclavado a 121ºC por 20 minutos.

9.2. Anexo II - Manutenção de Cultura de Algas

1. Meio de agar para manutenção das algas

As culturas de algas podem ser mantidas em meio de ágar inclinado com peptona protease, em condições controladas de temperatura (4ºC) e luminosidade (150 lux).

Para o preparo do meio sólido, o seguinte procedimento deve ser seguido:

1.1. Em um litro de água destilada ou desionizada adicionar 10g de agar e deixar hidratar por 30 minutos.

1.2. O agar hidratado é aquecido em banho-Maria, com agitações constantes, até que esteja totalmente dissolvido.

1.3. Após a dissolução total do agar, adicionar os seguintes sais nutrientes: 0,2g de KNO_3; 0,02g de K_2HPO_4 e 0,02g de $MgSO_4.7H_2O$.

Quando o agar estiver quase frio, e ainda líquido, adicionar 1g de peptona protease.

1.4. Colocar o meio nos frascos, em quantidade suficiente para preparar os meios inclinados e deixar esfriar sem tampar.

1.5. Em seguida os frascos devem ser tampados, autoclavados por 15 minutos a 121ºC e colocados em ângulo de 45º para a obtenção do meio inclinado.

2. Repique da cultura de algas

A cultura de algas escolhida é repicada de uma garrafa de agar inclinado para outra a cada 4 a 5 meses. Deve-se evitar repiques sucessivos e muito freqüentes para reduzir o risco de desvio genético e perda da condição axênica da cultura.
As culturas novas são incubadas a 24 ± 2ºC sob luminosidade de 2 100 ± 10% lux, até que um bom crescimento algáceo seja obtido. As culturas são, então, colocadas nas condições descritas no item 1.

D.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA ORGANISMOS DO SOLO

D.5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA ORGANISMOS DO SOLO: MINHOCA *Eisenia fetida*

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade de agentes químicos diversos, excluindo substâncias voláteis, à minhoca *Eisenia fetida*.

2. FUNDAMENTO

Este método consiste na exposição de minhocas adultas de espécie *Eisenia fetida* a várias concentrações do agente químico, por um período de 14 dias, nas condições prescritas.
Tal procedimento permite calcular a concentração letal inicial média $CL(I)_{50}$, 14 dias, do produto-teste.

3. DEFINIÇÕES

Concentração letal inicial média - $CL(I)_{50}$, 14 dias:
Concentração nominal do agente químico, no início do teste que causa letalidade a 50% dos organismos-teste em 14 dias de exposição.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e Equipamentos

4.1.1. - Estufa com termostato (103 ± 2ºC)
4.1.2. - Psicotermógrafo
4.1.3. - Balanças analítica e semi-analítica

4.2. Vidrarias

4.2.1. - Cristalizadores de vidro de 2 litros
4.2.2. - Bolas de vidro de 1,5 a 2,0cm de diâmetro

4.3. Solução padrão

Esta solução deve ser preparada dissolvendo-se uma quantidade conhecida de cloroacetamida ($ClCH_2$ $CONH_2$), de qualidade analítica reconhecida, num volume definido de água destilada.
A solução padrão deve ser preparada antes do início de cada teste.

4.4. Organismos-teste

Para realização do teste devem ser utilizadas minhocas adultas da espécie Eisenia fetida, de ao menos 2 meses de idade, possuidoras de clitelo e cujo peso úmido esteja entre 300 e 600mg. Os animais utilizados para o teste devem ser tratados e selecionados de maneira a constituir uma população relativamente homogênea quanto ao tamanho e peso.
Dados sobre a criação da citada minhoca encontram-se no Anexo deste método.
Antes do teste, os animais devem ser lavados sob um jato de água corrente, enxutos com cuidado em papel de filtro e colocados durante 24 horas na sílica umidificada (4.5) à temperatura do teste.

4.5. Substrato do teste

Sílica amorfa (sílica gel em pó, impalpável) seca na estufa a 120ºC durante 24 horas.

5. PROCEDIMENTO

Para o caso de uma substância hidrossolúvel, imediatamente antes do começo do teste, dissolver em 215ml de água destilada a quantidade de substância-teste necessária para obter a concentração desejada. Em cada recipiente (4.2.1), previamente enxaguado 3 vezes com água destilada e seco, colocar 1425g de bolas de vidro (4.2.2), 90g de sílica (4.5) e a solução da subs-

tância-teste dissolvida em água destilada. Homogeneizar cuidadosamente com a espátula e em seguida colocar cuidadosamente com uma espátula na superfície desse substrato 10 animais preparados como indicado no item 4.4. Depois cobrir os recipientes com plástico escuro finalmente perfurado. Em sequida os reecipientes de teste deve ser colocados em prateleiras num local com temperatura estável a 20 ± 2ºC, no escuro. Para medir a temperatura e a umidade utilizar um psicotermógrafo. Para cada teste prepara-se um controle somente com água destilada (215 ml) e com o mesmo número de animais durante o período do teste de 14 dias.

No caso de uma substância não hidrossolúvel, dissolver em um solvente volátil (por exemplo, acetona ou hexano) a quantidade de sustância-teste necessária para obter a concentração desejada. No recipiente do teste (4.2.1), previamente enxaguado três vezes com água destilada e seco, colocar 90g de sílica (4.5) e a solução da substância com o solvente. Homogeneizar cuidadosamente e evaporar o solvente colocando o recipiente sob um "Hotte Aspirante". Adicionar em seguida 215 ml de água destilada e 1425g de bolas de vidro (4.2.2). Homogeneizar cuidadosamente e proceder como o descrito para a substância hidrossolúvel.

No caso de uma substância insolúvel em um solvente volátil, preparar uma mistura de 10g de sílica (4.5) e da quantidade de substância-teste necessária para obter a concentração desejada. No recipiente de teste (4.2.1) colocar esta mistura: 1425g de bolas de vidro (4.2.2), 215 ml de água destilada e 80g de sílica (4.5). Homogeneizar cuidadosamente e seguir como o descrito para substância hidrossolúvel.

5.1. Padronização

Efetuar a padronização com cloroacetamida com 5 concentrações a partir da solução padrão (4.3). Proceder como o descrito no item 5 para substância hidrossolúvel.

A $CL(I)_{50}$, 14 dias, para cloroacetamida deve estar entre 35 e 160 mg/kg.

5.2. Teste preliminar

Efetuar o teste preliminar com 5 concentrações da subs-

tância a ser testada (por exemplo 0,001; 0,01; 0,1; 10; 100mg/kg). Realizar o teste como o indicado no item 5, utilizando duas réplicas por concentração. Após 14 dias contar em cada recipiente os animais vivos e os mortos (considera-se morto o animal que não apresenta nenhuma reação à uma picada de agulha aplicada sobre sua parte anterior). Calcular para cada recipiente a porcentagem de mortalidade.

Anotar os sinais observados nos animais. Se houver dados insuficientes para estabelecer a faixa de concentração necessária para o teste definitivo, repetir o teste preliminar com a inclusão de concentrações intermediárias ou ampliando a faixa de concentrações.

5.3. Teste Definitivo

A partir dos resultados obtidos no teste preliminar, fazer o teste definitivo utilizando 5 concentrações da substância-teste distribuídas em progressão geométrica entre a mais alta concentração que não produz uma mortalidade total e a menor que causa 100% de letalidade. Proceder simultaneamente com duas repetições por concentração da substância-teste; três concentrações da referência (controle) e ainda um teste sem a substância-teste (branco). No caso do teste necessitar de utilização de um solvente (ver item 5) tratar os recipientes do branco com a menor quantidade de solvente sem a substância-teste.

No decorrer do teste e após 14 dias proceder como indicado no item 5.2. Para cada concentração determinar a porcentagem de mortalidade obtida no teste definitivo.

6. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Fazer um diagrama Gauss-logarítmico colocando em ordenadas as porcentagens de mortalidade e em abcissas as concentrações correspondentes da substância-teste.

Traçar a reta de regressão a partir de ao menos 3 (três) pontos para aqueles de porcentagens de mortalidade entre 10 e 90%, calculando, então, a $CL(I)_{50}$, 14 dias da substância-teste. O método de LITCHFIELD e WILCOXON (ref. 9.1) pode ser utilizado para determinar o limite de confiança a 95%. No caso de duas concentraçõs consecutivas, na razão de 1,8, darem

respectivamente 0 e 100% de mortalidade, elas indicam o intervalo onde se situa a $CL(I)_{50}$, 14 dias.
Indicar, em miligramas por kilograma de sílica seca, a $CL(I)_{50}$, 14 dias (ou no caso de dificuldade para apreciação da mortalidade dos animais após 14 dias, fazer um teste com uma duração de exposição mais prolongada, por exemplo 21 dias). Indicar ainda a maior concentração testada que causou 0% de mortalidade e a menor concentração testada que causou 100% de mortalidade.

7. CONTROLE DE QUALIDADE

Os resultados são considerados válidos se:

7.1. A porcentagem de mortalidade observada no teste branco for no máximo igual a 10%.

7.2. A $CL(I)_{50}$, 14 dias, para cloroacetamida estiver entre 35 e 160 mg/kg.

8. APRESENTAÇÃO (Relatório-Laudo)

O relatório do teste deve conter, além dos resultados expressos no item 6, as seguintes indicações:

- A descrição completa do material biológico utilizado (espécie, idade, peso, condições de criação);
- As referências da substância-teste;
- O modo de preparação do substrato e a indicação do solvente utilizado no caso de uma substância não-hidrossolúvel;
- Os resultados obtidos com a substância de referência (padrão);
- As condições do ambiente de teste;
- A reta de regressão traçada a partir do teste definitivo;
- Todos os detalhes operacionais não previstos pelo método e todos os incidentes susceptíveis de terem interferência nos resultados; e
- Qualquer modificação na metodologia do teste.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.1 - LITCHFIELD, J.T. & J WILCOXON,F.A simplifiel method of evaluating dose - effect experiment. J.Pharmocol. Exper. Therap., 76: 99 - 113, 1949.

9.2 - BOUCHE,M,B. Lombriciens de France, Ecologie et Systématique. Publication du Institut National de la Recherche Agronomique, 1972. 671p.

9.3 - EDUARDS, C.A. & LOFTY,J. Biology of earthurrorms. London, Chapman and Hall, 1977. 331p.

9.4 - JEANSON, C.Y. Essai de pédazoologie experimentale: morphologie d"un sol artificiel structuré par des lombricidés. Mémories du Muséum National d' Histoire Naturelli. A.Zoologie, 46 (3):212 - 357, 1968. Editions du Muséum - Paris.

9.5 - AFNOR. Association Française de Normalization. Determination de la Toxité d'une substence vis-a-vis des ombriciens (espécies - Eisenia fetida) - méthode "artisol" - Norma experimentale: X 31 - 250. Paris 1984.5p.

ANEXO

As minhocas Eisenia fetida podem ser criadas nas seguintes condições:

- Local com temperatura estável de 23 ± 1ºC;
- Luminosidade natural atenuada;
- Caixas de criação de polietileno de 100 litros;
- Meio de criação constituído 50/50 (V/V) de terra vegetal esterelizada a 120ºC e esterco fresco de cavalo (o pH ficará, então, ao redor de sete não sendo necessário adicionar carbonato de cálcio). Adiciona-se água desclorada para manutenção da umidade. Recobrir o meio com palha ou papelão para minimizar a perda de umidade;
- Alimentação suplementar contínua com um pouco de farelo de trigo.

PARTE E

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO E DE TRANSPORTE

E.1. TESTES DE BIODEGRADABILIDADE

E.1.1. TESTES DE BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA

E.1.1. TESTES DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS

Neste documento são apresentados cinco testes para a avaliação da biodegradabilidade de substâncias orgânicas, sendo que se exige a obtenção de resultados positivos em apenas um deles para fins de aprovação da substância quanto àquele parâmetro.
Portanto, o interessado escolherá, dentre os cinco testes, o que melhor se adaptar às suas condições técnico-laboratoriais e que for aplicável à substância a ser testada.
Ressalte-se que a indicação destes testes não exclui outros internacionalmente aceitos por instituições como a U.S. Environmental Protection Agency (EPA), International Standardization Organization (ISO), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).
Independentemente do teste realizado, exige-se que o interessado no registro de um produto apresente os resultados brutos obtidos no teste, bem como informações detalhadas sobre as técnicas utilizadas no mesmo, conforme está sendo solicitado nos cinco testes ora apresentados. Desta forma, a indicação e a apresentação detalhada destes testes visa dar suporte às entidades e às empresas brasileiras quanto à realização de testes de biodegradabilidade, quando as mesmas não estiverem familiarizadas com os métodos padronizados internacionalmente.
Para as instituições e empresas que forem realizar tais testes, são feitas as seguintes considerações:

1 - Para as substâncias hidrossolúveis e não voláteis, qualquer um dos 5 testes é aplicável. Entretanto os Testes E.1.1.1 e E.1.1.5 são os de maior confiabilidade, de maior facilidade de interpretação e que apresentam resultados inquestionáveis. Portanto, sempre que for possível, deverá ser empregado um desses dois testes. (O teste E.1.1.1 exige hidrossolubilidade mínima de 100 mg DQO/L, sendo esta a sua limitação; o teste E.1.1.5 aceita hidrossolubilidade a partir de 5 mgCOD/L, mas exige a disponibilidade de um "TOC-Analyser", sendo esta a sua limitação).

2 - Para as substâncias pouco hidrossolúveis e para as não hidrossolúveis, apenas os testes E.1.1.2, E.1.1.3 e E.1.1.4 são aplicáveis. Destes, o E.1.1.4 é o menos recomendável devido à baixa confiabilidade ainda existente. A escolha entre os testes E.1.1.2 e E.1.1.3 dependerá das condições laboratoriais disponíveis.

3 - Para substâncias voláteis, somente os testes E.1.1.3 e E.1.1.4 são aplicáveis. O teste E.1.1.3 é o mais recomendável.

4 - Quanto ao teste E.1.1.4, somente deverá ser empregado quando não for possível o uso de qualquer um dos outros. Mesmo assim, somente deverá ser utilizado pelas instituições que já detiverem o seu completo domínio teórico e prático.

E.1.1.1. TESTE DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA PELA MEDIDA DO DECAIMENTO DA DQO-SOLÚVEL

Data da revisão: 01/88

1 - OBJETIVO

Avaliar a biodegradabilidade imediata (3.1.) de substâncias orgânicas hidrossolúveis e não-voláteis, sob as condições do teste, com metodologia analítica que permita a determinação da biodegradação total (3.2.)

2 - FUNDAMENTO

Uma determinada substância orgânica é submetida, como única fonte de carbono e de energia, à metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, numa solução nutriente mineral definida. O grau de decaimento da concentração de matéria orgância solúvel, medida como Demanda Química de Oxigênio, DQO (3.3.), e determinado de maneira adequada, informará se a substância é biodegradável ou bioresistente, num dado período de tempo. A determinação do decaimento da DQO-solúvel (3.3.), neste tipo de teste, permite a avaliação da biodegradação total (3.2).
São realizados ensaios controles de modo a excluir decaimentos de DQO devidos à volatilização/adsorção (4.4.5) e de modo a detectar efeitos tóxicos da substância testada sobre os microrganismos (4.4.7).

3 - DEFINIÇÕES

3.1. Biodegradabilidade imediata

É a propriedade de uma substância orgânica para ser metabolizada, isto é, destruída por microrganismos naturais do meio ambiente, avaliada num teste simples, sob condições as mais similares possíveis às do meio ambiente, e que limitem as oportunidades de ocorrer seleção e adaptação microbiana. Assume-se que as substâncias que

apresentarem resultados positivos frente a este teste serão degradadas de maneira mais rápida e mais completa no meio ambiente natural.

3.2. Biodegradação total

É a completa conversão, pela ação microbiana, de uma substância orgânica em sais minerais, CO_2, H_2O, biomassa e metabólitos normais de microrganismos.

3.3. DQO-Solúvel

A Demanda Química de Oxigênio, DQO, é um parâmetro químico analítico que permite a determinação da matéria orgânica em um meio aquoso, através de sua completa oxidação pelo dicromato de potássio em meio ácido, sob condições enérgicas de temperatura e na presença de catalisadores (9.2;9.3;9.4).
A DQO-solúvel refere-se à determinação das substâncias orgânicas solúveis no meio aquoso, para o que o líquido a ser analisado é ultrafiltrado ou centrifugado adequadamente de modo a livrá-lo de partículas orgânicas em suspensão (em particular, de células bacterianas).

3.4. Biodegradação para efeito deste teste

É definida como a porcentagem de remoção, pela ação de microrganismos num determinado período de tempo, da concentração da DQO-solúvel relativa à substância ensaiada (6.2).

4. MATERIAIS NECESSÁRIOS

4.1. Aparelhos e equipamentos

4.1.1. Sistema completo para a determinação de DQO, seja pelo método convencional (9.2;9.4) ou pelo método da ampola (9.3;9.4).

4.1.2. Sistema para incubação sob agitação, que acomode erlenmeyeres de 2 litros, com controle de temperatura ou colocado em câmara termostatizada (20-25ºC), ou linha de ar comprimido filtrado.

4.1.3. Sistema para ultrafiltração com membrana de 0,22 um de diâmetro de poro ou centrífuga para 40.000 m/s (4000g), refrigerada ou mantida em câmara refrigerada.

4.2. Vidraria

Toda vidraria deverá ser lavada adequadamente conforme 5.1.

4.2.1. Erlenmeyeres de 2 litros, boca estreita, ou frascos de 7 a 10 litros, de vidro ou de material sintético que não libere DQO nem substâncias tóxicas para as soluções de incubação.

4.2.2. Demais vidrarias normais de laboratório.

4.3. Água

Água destilada ou desionizada, isenta de substâncias tóxicas (em particular o cobre) e que não apresente valor de DQO superior a 10% daquele que será introduzido pela substância-teste. Cada bateria de teste deverá ser feita com um mesmo lote de água.

4.4. Soluções

4.4.1. Solução-nutriente

É preparada somente no dia inicial dos testes, adicionando-se, para cada 1 litro final de solução a ser usado, 2,0 ml (dois mililitros) de cada uma das soluções-estoque descritas no tópico 4.4.2 (soluções 4.4.2.1 a 4.4.2.6), sempre com água (4.3).

4.4.2. Soluções-estoque

São preparadas utilizando-se água (4.3) e reagentes de grau analítico de boa procedência e conservados em refrigerador.

4.4.2.1. Solução de fosfato e amônio

KH_2PO_4..... 8,50 g
K_2HPO_4.....21,75 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$.....33,40 g
NH_4Cl.....20,00 g
Dissolver em água (4.3) e completar para 1 litro.

Obs.: O pH deve ser de 7,2.

4.4.2.2. Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) a 22,5 g/litro, em água (4.3).

4.4.2.3. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 27,5 g/litro em água (4.3).

4.4.2.4. Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$) a 0,25 g/litro em água (4.3).

4.4.2.5. Solução de elementos-traço

$MnSO_4.4H_2O$.....39,9 mg
H_3BO_3.....57,2 mg
$ZnSO_4.7H_2O$.....42,8 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$.....34,7 mg
$FeCl_3$.....100,0 mg
Dissolver em água (4.3) e completar para 1 litro.

Obs.: esterilizar a 120 ºC, 2 atm., por 20 minutos.

4.4.2.6. Solução fonte de vitaminas

Solução de extrato de levedura a 15 mg/100 ml em água (4.3).

4.4.3. Soluções de padrões biodegradáveis

Fazer ensaio com pelo menos uma das seguintes substâncias consideradas como padrões quanto à biodegradabilidade:

1) Glicose ($C_6H_{12}O_6$, peso molecular 180; 0,400gC/g; DO_t de 1,07 mgO_2/mg).
2) Anilina, recém-destilada (C_6H_7N; peso molecular 93,1; 0,773 gC/g; DO_t (NO_3) de 3,09 mgO_2/mg).
3) Benzoato de sódio ($C_7H_7O_2Na$: peso molecular de 122,1; DO_t de 1,96 mgO_2/mg).

Obs.: DO_t = demanda teórica de oxigênio.

4.4.3.1. Soluções concentradas de padrões biodegradáveis.

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).
Preparar soluções a 1,0 g/L em solução nutriente (4.4.1) e determinar a DQO-solúvel das mesmas.

4.4.3.2. Soluções diluídas de padrões biodegradáveis, para os ensaios

No instante inicial dos ensaios (5;2), preparar soluções a 200 mgDQO/L, diluindo quantitativamente a solução 4.4.3.1 em solução nutriente (4.4.1).

4.4.4. Soluções de substâncias a serem testadas

4.4.4.1. Soluções concentradas de substâncias-teste

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).
Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1,0 g/L, em solução nutriente (4.4.1) e determinar a DQO-solúvel das mesmas.

Para substâncias-teste menos solúveis, preparar soluções o mais concentradas possível, sempre em solução nutriente (4.4.1).

4.4.4.2. Soluções diluídas de substâncias-teste

No instante inicial dos ensaios (5.2) preparar soluções a 200 mgDQO/L, diluindo quantitativamente as soluções 4.4.4.1 em solução-nutriente (4.4.1).

4.4.5. Soluções para ensaios estéreis, para controle de volatilização e/ou adsorção das substâncias-teste

Para o controle da possibilidade de perdas da substância ensaiada por processos outros que não o da biodegradação, serão feitos ensaios com as substâncias-teste dissolvidas em água (4.3), isto é, sem a presença dos nutrientes.
Além disto os ensaios não serão inoculados e serão mantidos estéreis pela adição de cloreto mercúrico.

4.4.5.1. Solução concentrada de substância-teste em água

Será preparada somente no dia do uso (não estocar).
Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1 g/L, em água (4.3), e determinar a DQO-solúvel das mesmas.

4.4.5.2. Solução diluída, para os ensaios estéreis

No instante inicial dos ensaios (5.2) preparar soluções de cada substância-teste a 200 mgDQO/L, pela diluição quantitativa da solução 4.4.5.1 em água (4.3), não adicionar nutrientes. Adicionar 5 ml/L de solução esterilizadora (4.4.6). Não inocular quando dos ensaios (5.4).

Obs.: Ter cuidados especiais ao trabalhar com esta solução, devido à presença do cloreto de mercúrio.

4.4.6. Solução esterilizadora

Cloreto mercúrico ($HgCl_2$) a 1% em água (4.3).

Obs.: Ter cuidados especiais com a preparação, estocagem e manuseio desta solução e de suas derivações, por tratar-se de material tóxico.

4.4.7. Solução para ensaio de inibição para as substâncias-teste

De forma a verificar se a substância-teste tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos do inóculo, no instante inicial dos ensaios (5.2) preparar soluções mistas, diluindo quantitativamente as soluções 4.4.3.1 (padrão biodegradável) e 4.4.4.1 (substância-teste) a 200 mg DQO/L, cada (portanto 400 mgDQO/L, totais), em solução nutriente (4.4.1).

4.5. Inóculo

Para a inoculação dos frascos de ensaio (5.4) pode-se utilizar qualquer uma das três fontes de microrganismos descritas em seguida, ou uma mistura das mesmas.

Obs.: É imprescindível que as amostras de inóculo apresentem contagens de microrganismos de, no mínimo 100.000 colônias por mililitro, em agar padrão.

4.5.1. Esgoto doméstico ou efluente de estação de tratamento de esgotos domésticos

Coletar cerca de 500ml de esgoto, ou de efluente, passar por papel de filtro grosso (para retirar partículas grosseiras), desprezando os primeiros 200 ml filtrados. Conservar o restante do filtrado sob aerobiose até o início dos ansaios, o que não deve exceder a 6 horas.

4.5.2. Microrganismos de solo

Pesar 100 g de solo fértil (com baixo teor de argila e de matéria orgânica), suspender em 1 litro de solução nutriente (4.4.1) e deixar em repouso por 30 minutos, para a decantação. Filtrar o sobrenadante através de papel de filtro grosso e desprezar os primeiros 200 ml filtrados. Manter o restante do filtrado sob aerobiose até o início dos ensaios, o que não deve exceder a 6 horas.

4.5.3. Microrganismos de águas superficiais naturais

Utilizar, de preferência, amostras compostas. Para tanto, escolher um local apropriado do rio, lago ou represa, do qual se queira testar a água quanto ao seu potencial de biodegradar a substância-teste e coletar cerca de 500ml de amostra, de 30 em 30 minutos, por, no mínimo, 2 horas e misturá-las, mantendo sempre sob aerobiose. Em seguida, proceder conforme descrito para as amostras de esgoto (4.5.1).

5. PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

5.1. Preparação da vidraria

Toda a vidraria será lavada com solução sulfocrômica recém-preparada, enxaguada exaustivamente, e relavada com solução de ácido clorídrico em etanol (100 ml HCl 5 N + 900 ml de etanol). Enxaguar exaustivamente com água comum e com água destilada (4.3) de forma a livrá-la de traços de DQO-solúvel e de materiais tóxicos.

5.2. Preparação das soluções para os ensaios

Preparar o volume necessário de solução-nutriente (4.4.1) para a realização de toda a bateria de teste (5.3) e 2 litros de cada uma das soluções descritas nos tópicos 4.4.3.2, 4.4.4.2, 4.4.5.2 e 4.4.7, caso for utilizado o método da ampola (9.3, 9.4) para a determinação da DQO. (Quando o método convencional, 9.2, 9.4, for ser utilizado, deve-se preparar 10 litros de cada uma daquelas soluções, utilizando-se 5 litros em cada frasco de 7 a 10 litros de capacidade).

5.3. Preparação dos frascos para os ensaios

Os ensaios serão feitos em duplicata para cada substância a ser testada, bem como para os padrões, para os controles estéreis, para os ensaios de inibição e para os ensaios em branco.

Para tanto, cada solução descrita, incluindo a solução-nutriente (4.4.1) sem nenhuma adição (ensaio em branco), será distribuída em 2 erlenmeyeres de 2 litros, colocando-se 900 ml em cada frasco (ou 5 litros em frascos de 7 a 10 litros, quando a DQO for ser analisada pelo método convencional), preparando-se a seguinte bateria de teste:

Frascos

1. (a,b) Brancos (Solução nutriente, 4.4.1, sem adição).

2. (a,b) Padrão biodegradável a 200 mgDQO/L. (Solução 4.4.3.2). Inocular (5.4).

3. (a,b) Substância-teste 1 a 200 mgDQO/L. (Solução 4.4.4.2). Inocular (5.4).

4. (a,b) Controle estéril da substância-teste 1 a 200 mgDQO/L. (Solução 4.4.5). Não inocular (5.4).

5. (a,b) Ensaio de inibição para a substância teste 1 a 200 mgDQO/L. (Solução 4.4.7). Inocular (5.4).

(... e assim por diante, para outras substâncias-teste).

5.4. Inoculação

Homogeneizar bem a fonte de inóculo (4.5) e adicionar 1 ml da mesma para cada 1 litro de solução em teste, excetuando-se os frascos de controles estéreis (frasco 4, no exemplo).

5.5. Controle da evaporação por gravimetria

No dia inicial de cada bateria de testes, fazer as coletas iniciais de amostras (5.7) e, então, pesar cada frasco, com precisão de 1,0 g, anotando o peso em uma tabela de controle.

A partir da segunda coleta de amostras, cada frasco será pesado, antes da retirada das amostras, e a diferença de peso será corrigida com água (4.3). Homogeneizar bem, então, e fazer as coletas de amostras. Tornar a pesar cada frasco e anotar, cuidadosamente, o novo peso na tabela de controle.

5.6. Incubação dos frascos

Cobrir a boca dos frascos com folha de alumínio, de maneira frouxa, mas de forma a impedir a entrada de materiais particulados do ar. (Os frascos não devem ser tapados com algodão, pois este pode se constituir em fonte espúria de DQO para os ensaios; por outro lado não é exigida proteção contra contaminações microbianas). Incubá-los em agitador rotatório (100-150 rpm), (ou sob aeração por ar comprimido, 50-100 ml/min.), à temperatura de 20 a 25ºC, na ausência de luz. O ar ambiente (ou ar comprimido) não poderá conter vapores tóxicos ou que contribuam com DQO-solúvel para as soluções nutrientes.

5.7. Coleta e preservação de amostras e análise de DQO-solúvel

Obs.: Para os frascos-controle estéreis (pelo fato de conterem $HgCl_2$). fazer coleta apenas nos dias: 0 (inicial), 14 e 28. Processar essas amostras da mesma forma usada para as demais, mas com maiores precauções, e rotulá-las com a observação: CUIDADO: TÓXICO.

Diariamente, ou de 2 em 2 dias, para cada frasco, a partir do instante inicial dos testes até 28 dias totais de incubação (5.8), e observando a correção da evaporação (5.5), coletar o menor volume possível para o processamento das amostras, centrifugar a, no mínimo, 40.000 m/s(4.000g), sob controle de temperatura (máxima 15ºC), por 20 minutos (ou filtrar em membrana de 0,22um). Decantar, cuidadosamente, o sobrenadante (o qual não poderá ter materiais particulados de qualquer natureza), ou transferir o filtrado para um recipiente adequado e devidamente rotulado e, imediatamente, congelá-lo, mantendo-o assim até à determinação da DQO.
A coleção de amostras, para cada bateria de teste, deverá ser mantida congelada e as análises de DQO deverão

ser feitas todas de uma única vez, ao final do teste. Caso não seja possível manter as amostras congeladas, as análises de DQO deverão ser realizadas imediatamente após a centrifugação.

Obs.: Para as análises de DQO poderá ser usado como branco a solução nutriente (4.4.1).

5.8. Tempo de duração das incubações

O tempo máximo de incubação é de 28 dias, quando, para efeito de validade, os testes serão encerrados.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Resultados brutos

Os resultados (mgDQO/L) das análises de cada amostra, de cada frasco, e para cada bateria de testes, serão cuidadosamente anotados em formulários apropriados, os quais conterão, além de todos os dados relativos aos testes executados, o nome e endereço da entidade executora e os nomes, números de registros em conselhos profissionais e assinaturas do analista de laboratório e de seu superior hierárquico imediato. Cópias destes dados brutos serão, necessariamente, anexadas a todas as documentações que visarem registro de produtos, pois os mesmos ficarão sujeitos à comparação com ensaios realizados, sob as mesmas condições, por laboratórios oficiais de referência.

6.2. Cálculos das porcentagens de degradação

Calcular a porcentagem de degradação obtida para cada

frasco ensaiado, utilizando a fórmula:

$$\%Dt = 100 \times (Ci - Cf)/Ci$$

onde:

%Dt = % de degradação no instante t (dias)

Ci = Concentração inicial = Co - Bo

Cf = Concentração final = Ct - Bt

e

Co = Concentração de DQO (mg/L) do frasco com substância-teste, ou padrão, no instante inicial do teste.

Ct = Concentração de DQO (mg/L) do frasco com substância padrão ou teste, no instante t (dias).

Bo = Concentração de DQO (mg/L) do ensaio em branco no instante inicial do teste.

Bt = Concentração de DQO (mg/L) do ensaio em branco no instante t (dias).

6.4. Gráficos

Lançar as porcentagens de degradação encontradas, em função do tempo (dias) de incubação, para cada ensaio e para as médias das duplicatas e anexar tais gráficos aos documentos dos processos.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Testes com resultados altos de decaimento de DQO

Estes testes serão considerados válidos e, portanto, as substâncias ensaiadas serão consideradas FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS, se:

a) Nos ensaios com os controles estéreis para a substância-teste (frasco 4) não ocorrerem perdas de DQO superiores a 30% no mesmo intervalo de tempo em que for verificado 70% de decaimento da DQO dos ensaios normais (frasco 3).
Caso contrário, assume-se que estão ocorrendo perdas de DQO por processos outros que não os de biodegradação e deverão ser providenciados testes sob condições que permitam ensaios de substâncias voláteis e/ou pouco hidrossolúveis, como os testes em frascos fechados, teste E.1.1.3 ou teste E.1.1.4, desta série.

b) Nos ensaios normais com a substância-teste (frasco 3) for atingido um mínimo de 70% de decaimento da DQO-solúvel num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem verificados 10% de remoção da DQO, restringindo-se o tempo total de teste a 28 dias (5.8).

7.2. Interpretação dos testes com resultados baixos de decaimento de DQO

7.2.1. Os testes serão considerados válidos e, portanto, a substância-teste será considerada biorresistente, se:

a) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis (frasco 2) for atingido um mínimo de 70% de decaimento da DQO, num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem alcançados 10% de degradação, restringindo-se a duração total do teste a 28 dias.

b) Os ensaios de inibição (frasco 5) apresentarem um mínimo de 70% de decaimento da DQO relativa ao padrão biodegradável adicionado (isto é, 35% da DQO total relativa às duas substâncias adicionadas), num intervalo de 10 dias, conforme descrito para o tópico 7.2.1.a.

7.2.2. Os testes **NÃO** serão considerados válidos para se concluir sobre a biodegradabilidade da substância-teste se:

a) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis (frasco 2) não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a.
Neste caso deve-se considerar que o inóculo utilizado não estava ativo e a bateria de testes tem que ser refeita utilizando-se novos inóculos.

b) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a., mas nos ensaios de inibição (frasco 5) não forem satisfeitas as do tópico 7.2.1.b. Neste caso deve ser assumido que a substância testada tem efeitos inibidores sobre os microrganismos nas concentrações utilizadas e que será necessário um outro tipo de teste, o qual permita ensaios com concentrações mais baixas, como os testes E.1.1.2; E.1.1.3; E.1.1.4 ou E.1.1.5 desta série.

8. CLASSIFICAÇÃO

8.1. Substâncias "Facilmente biodegradáveis"

A substância-teste que apresentar um mínimo de 70% de degradação, obedecidos os critérios de interpretação (7), será classificada como FACILMENTE BIODEGRADÁVEL e receberá o índice mais favorável para a tabela de classificação ecotoxicológica a ser adotada. Além disto, ficará excluída da necessidade de ser submetida a outros

testes de biodegradabilidade, para efeito desta classificação.

8.2. Substâncias não aprovadas neste teste

As substâncias que não atingirem o mínimo de 70% de degradação, obedecidos os critérios de interpretação (7), serão classificadas com NÃO FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS e receberão o índice mais desfavorável quanto à biodegradabilidade/persistência da tabela de classificação ecotoxicológica.

A restrição de uso e de descarte ficará na dependência dos índices obtidos pela substância testada quanto aos demais parâmetros exigidos para a classificação ecotoxicológica.

9. LITERATURA BÁSICA

9.1. CASTRO, N.; BAUCH, T.; ANAMI, D. Biodegradabilidade de alguns componentes de óleos de corte para a metalurgia. Trabalho apresentado no 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Manaus-AM, ABES/CETESB, 1979.

9.2. CETESB. CIA. TECNOLOGIA SANEAMENTO AMBIENTAL
Demanda química de oxigênio (DQO). Método da oxidação por dicromato de potássio em meio ácido sulfúrico. Norma Técnica L5.121. CETESB, São Paulo.

9.3. CETESB. CIA. TECNOLOGIA SANEAMENTO AMBIENTAL
Determinação da demanda química de oxigênio pelo método colorimétrico. Norma Técnica L5.721. CETESB, São Paulo, 1985.

9.4. APHA.AMER. PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (USA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th. ed. APHA, Washington, DC, 1985.p.537-538.

E.1.1.2. TESTE DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA PELA MEDIDA DO DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO EM SISTEMA ABERTO

Data da revisão: 01/88

1. OBJETIVO

Avaliar a biodegradabilidade imediata (3.1) de substâncias orgânicas hidrossolúveis ou pouco hidrossolúvel porém não-voláteis sob as condições do teste, com metodologia analítica que permita a determinação da biodegradação total (3.2.).

2. FUNDAMENTO

Uma determinada substância orgânica é submetida, como única fonte de carbono e de energia, a metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, numa solução nutriente mineral definida. A porcentagem de desprendimento de dióxido de carbono (CO_2), em relação ao total de CO_2 teoricamente esperado para a completa oxidação do conteúdo de carbono da substância em teste (CO_2 - teórico), medida de maneira adequada, informará se a mesma é biodegradável ou biorresistente, num período de tempo. A determinação da porcentagem de CO_2 desprendido, em função do CO_2 teórico (CO_2-t) neste tipo de teste, permite a avaliação da biodegradação total (3.2).

São realizados ensaios-controle, de modo a detectar possíveis efeitos tóxicos da substância-teste sobre os microrganismos do inóculo (4.4.5).

Como o acompanhamento analítico não requer retiradas de amostras da solução de ensaio, são possíveis testes com substâncias pouco hidrossolúveis.

3. DEFINIÇÕES

3.1 Biodegradação imediata

É a propriedade de uma substância orgânica para ser metabolizada, isto é, destruída por uma cultura mista de mi-

crorganismos oriundos do meio ambiente, num teste simples, sob condições as mais similares possíveis às da natureza, e que limitem as oportunidades de ocorrer seleção e adaptação microbiana. Assume-se que as substâncias que apresentarem resultados positivos frente a este teste serão degradadas de maneira mais rápida e mais completa no meio ambiente natural.

3.2 Biodegradação total

É a completa conversão, pela ação microbiana, de uma substância orgânica em sais minerais, CO_2, H_2O, biomassa e metabólitos normais dos microrganismos.

3.3 Biodegradação para efeito deste teste

É definida como a porcentagem de CO_2 desprendido, pela ação microbiana em um determinado tempo, em relação ao total de CO_2 teoricamente esperado (CO_2-t) para a oxidação completa da quantidade de substância ensaiada (6.3.2).

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e equipamentos

4.1.1. Sistema de ar comprimido

4.1.2. Câmara de incubação com controle de temperatura entre 20 e 25ºC.

4.1.3. Equipamentos para titulometria ácido-base.

4.1.4. Centrífuga para 40.000 m/s (4.000 g).

4.2. Vidraria

Toda a vidraria deverá ser lavada adequadamente, conforme o tópico 5.1.

4.2.1. Frascos de vidro, âmbar, de 4 a 5 litros de capacidade (para os ensaios de biodegradação).

4.2.2. Frascos plásticos, de 1 litro (com 700 ml de NaOH 10 M, para purificação do ar comprimido quanto ao CO_2).

4.2.3. Frascos lavadores de gás, de 125 ml, com 100ml de $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M), para a absorção quantitativa de CO_2 desprendido dos frascos de incubação.

4.2.4. Demais vidrarias normais de laboratório.

4.3. Água

Água destilada ou desionizada, isenta de substâncias tóxicas (em particular o cobre), e com baixo conteúdo em carbono orgânico dissolvido (menor do que 10% daquele a ser introduzido pela substância-teste).

4.4. Soluções

4.4.1. Solução-nutriente

É preparada somente no dia inicial de cada teste, adicionando-se, para cada 1 litro final de solução a ser usado, 1,0 ml (um mililitro) de cada uma das soluções-estoque descritas no tópico 4.4.2 (soluções 4.4.2.1 a 4.4.2.6), completando-se o volume sempre com água (4.3).

4.4.2. Soluções-estoque

Preparar com reagentes de grau analítico, de boa procedência, e estocar em refrigerador.

4.4.2.1. Solução de fosfato e amônio

KH_2PO_4.....8,50 g
K_2HPO_4.....21,75 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$.....33,40 g
NH_4Cl.....20,00 g
Dissolver em água (4.3) e completar para 1,00 litro.

Obs: O pH deve ser de 7,2.

4.4.2.2. Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) a 22,5 g/L, em água (4.3).

4.4.2.3. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 27,5 g/L, em água (4.3).

4.4.2.4. Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$) a 0,25 g/L, em água (4.3).

4.4.2.5. Solução de elementos traço

$MnSO_4.4H_2O$.....39,9 mg
H_3BO_3.....57,2 mg
$ZnSO_4.7H_2O$.....42,8 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$.....34,7 mg
$FeCl_3$.EDTA.....100,0 mg
Dissolver em água (4.3) e completar para 1,00 litro.

Obs: Esterilizar a 120 C, 2 atm., por 20 minutos.

4.4.2.6. Solução fonte de vitamina

Solução de extrato de levedura a 150 mg/litro em água (4.3).

4.4.3. Soluções de padrões biodegradáveis

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).

Fazer ensaio com pelo menos uma das seguintes substâncias consideradas padrões quanto à biodegradabilidade:

1) Glicose ($C_6H_{12}O_6$, peso molecular 180; 0,400gC/g; CO_2-teórico de 1,466 mg/mg).
2) Anilina (C_6H_7N, peso molecular 93,1; 0,773gC/g; CO_2-teórico de 2,838 mg/mg).
3) Benzoato de sódio ($C_7H_5O_2Na$, peso molecular 122,1; 0,688 gC/g; CO_2-teórico de 2,138 mg/mg).

No dia do uso, preparar soluções a 1,0 gC/L (isto é, 1,0 g de carbono por litro ou 3,666 gCO_2-t/L), em solução nutriente (4.4.1) e , no instante inicial dos ensaios de desprendimento de CO_2 (5.5), pipetar os volumes necessários para propiciar as concentrações indicadas para os mesmos (geralmente de 20 mgC/L ou 73,32 mg-CO_2-t/L).

4.4.4 Soluções de substâncias a serem testadas:

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).
Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1,0 gC/L em solução nutriente (4.4.1).
No instante inicial dos ensaios de desprendimento de CO_2 (5.5), pipetar os volumes adequados de cada substância para se atingir as concentrações indicadas para os mesmos (geralmente 20 mg/L, ou 73,32 gCO_2-t/L).
As substâncias pouco hidrossolúveis e sólidas deverão ser pesadas com precisão mínima de 0,1 mg e as líquidas pipetadas com precisão de 0,1 microlitro, sendo adicionadas diretamente as soluções de ensaio (5.5).

Obs.: Portanto, é fundamental o conhecimento da fórmula química de cada substância a ser testada para que seja possível o cálculo do seu conteúdo em carbono (gC/g Substância) e do total de CO_2 teoricamente produzível (mg-CO_2/mg substância). Caso não se disponha dessa informação, pode-se lançar mão de dados relativos à Demanda Química de Oxigênio (DQO) ou do Carbono Orgânico Total (COT) e inferir a produção de CO_2 esperada para a substância-teste. Nestes casos referir nos resultados a CO_2-DQO ou CO_2-COT, respectivamente.

4.4.5 Soluções para os ensaios de inibição

De forma a verificar se uma substância tem efeitos tóxico sobre os microrganismos, preparar soluções mistas conténdo sempre um dos padrões biodegradáveis mais a substância-teste, a 1,0 gC/L cada uma (portanto 2gC/L ou 7,332 gCO_2-t/L, totais), sempre em solução nutriente (4.4.1).

4.4.6 Hidróxido de sódio (NaOH) a 10 M (400 g/l), para a purificação do ar comprimido quanto ao CO_2.

4.4.7 Hidróxido de bário, $Ba(OH)_2.8H_2O$, a 0,025 N (0,0125M).

Dissolver 4,0 g de $Ba(OH)_2$ por litro de água (4.3) e filtrar de forma a livrar a solução de precipitados de carbonos de bário.

Aconselha-se preparar, para a realização de uma bateria de testes, 5 litros desta solução, a qual terá que ser estocada sob vedação apropriada, de forma

a evitar a absorção de CO_2 do ar.

Obs.: Não é necessária a padronização desta solução, pois para os cálculos do CO_2 desprendido será levado em conta apenas a diferença de equivalentes de HCl consumidos entre as titulações dos ensaios em branco e as dos ensaios com substâncias (6.1).

4.4.8. Solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,050 N, padronizada pela titulação contra padrão primário de base.

4.4.9. Fenolftaleína a 0,04% em etanol 70%.

4.5. Inóculo

Para a inoculação dos frascos de ensaio (5.3) pode-se utilizar qualquer uma das três fontes de microrganismos descritas em seguida, ou uma mistura das mesmas.

Obs.: É imprescindível que as amostras de inóculo apresentem contagens de microrganismos de, no mínimo, 100.000 colônias por mililitro, em agar padrão.

4.5.1. Microrganismos de esgoto doméstico

Coletar cerca de 1 litro de esgoto doméstico e passar por papel de filtro grosso (para retirar partículas grosseiras) e manter sob aerobiose, por um máximo de 6 horas, até à centrifugação, a qual deve ser feita somente instantes antes da inoculação (5.3).

Verificar quantos serão os frascos experimentais a serem inoculados (5.5) e separar 60ml para a inoculação de cada um deles. Centrifugar o volume total por 20 minutos a, no mínimo, 40.000 m/seg (4.000 g). Desprezar o (s) sobrenadante (s) e proceder com o(s) precipitado (s) de microrganismos conforme descrito no tópico relativo à inoculação (5.3).

4.5.2 Microrganismo de lodo ativado

Coletar cerca de 1 litro de lodo ativado (isto é, da mistura completa do tanque de aeração) de uma estação de tratamento de esgotos operando com esgoto essencialmente doméstico (ou de um sistema em escala de laboratório que simule tal estação). Manter sob aerobiase, por no máximo 6 horas, até à centrifugação, a qual deve ser feita instantes antes da inoculação (5.3).

Homogeneizar por 2-3 minutos num liquidificador, à rotação máxima (para a ruptura dos flocos de lodo e liberação dos microrganismos). Deixar em repouso por 15-30 minutos e transferir o sobrenadante para outro recipiente, evitando a passagem de sedimentos e filtrando através de papel de filtro grosso.

Verificar quantos serão os frascos a serem inoculados (5.5) e separar 30 ml para a inoculação de cada um deles. Centrifugar o volume total por 20 minutos a, no mínimo, 40.000 m/seg (4.000g) e desprezar o (s) sobrenadante (s).

Proceder, então com o (s) precipitado (s) de microrganismos conforme o tópico relativo à inoculação (5.3).

4.5.3. Microrganismos de solo

Pesar 100g de solo fértil (com baixo teor de argila e de matéria orgânica) e suspender em 1 litro de solução nutriente (4.4.1). Homogeneizar bem e deixar em repouso por 30 minutos para a decantação. Passar o sobrenadante através de papel de filtro grosso, desprezando os primeiros 200ml. Manter o restante do filtrado sob aerobiose, procedendo, daqui por diante, conforme descrito para as amostras de esgoto doméstico (4.5.1).

5. PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

5.1. Preparação da vidraria

Toda a vidraria será lavada com solução sulfocrômica recém-preparada, enxaguada exaustivamente, e relavada com solução de ácido clorídrico em etanol (100ml de HCl 5 N + 900ml de etanol). Enxaguar exaustivamente com água comum e com água destilada (4.3) de forma a livrá-la de traços de carbono orgânico solúvel e de materiais tóxicos.

5.2. Distribuição da solução nutriente nos frascos experimentais

Primeiramente verificar quantos frascos serão utilizados na bateria de testes (5.5) e preparar o volume necessário de solução nutriente (4.4.1), distribuindo 3 litros em cada frasco experimental, incluindo os ensaios em branco.

5.3. Inoculação

Ressuspender o(s) precipitado(s) de microrganismos relativos aos inóculos preparados (4.5), em um volume de solução nutriente (4.4.1) que corresponda a 10ml para cada frasco a ser utilizado. Homogeneizar bem e, mantendo a homogeneização, pipetar 10ml desse inóculo em cada frasco experimental.

5.4. Pré-aeração para a depleção de CO_2 devido à metabolização das substâncias porventura adsorvidas aos microrganismos dos inóculos

5.4.1. Montagem do sistema de purificação do ar quanto ao CO_2

Montar um sistema de purificação de ar com 6 frascos plásticos (não podem ser de vidro, devido ao ataque do NaOH concentrado), de 1 litro de capacidade, contendo cada um 700ml de NaOH a 10 M (4.4.6). Estes frascos são interligados, em linha, através de tubos plásticos apropriados. A extremidade inicial é ligada a um frasco cheio de lã de vidro, seca (para filtragem), o qual é ligado à fonte de ar comprimido.
A outra extremidade é ligada a um sistema de distribuição do ar, com tantas saídas quantos forem os frascos de ensaio a serem aerados (5.5). (Figura 1).

5.4.2. Pré-aeração dos frascos de ensaio

Conectar cada frasco de ensaio ao sistema de ar purificado e, mantendo as saídas de ar dos mesmos livres para o ambiente, isto é, desconectadas do sistema de absorção de CO_2 (5.6), aerá-los (a 50-100ml/min) por 24 horas, numa câmara a 20-25ºC, de forma a permitir a metabolização das substâncias orgânicas porventura adsorvidas às células microbianas usadas como inóculo.

5.5. Iniciação dos testes de desprendimento de CO_2

Após as 24 horas de pré-aeração das soluções nutrientes inoculadas, fazer as adições de substâncias-padrão biodegradáveis (4.4.3), de substâncias teste (4.4.4) e solução para os ensaios de

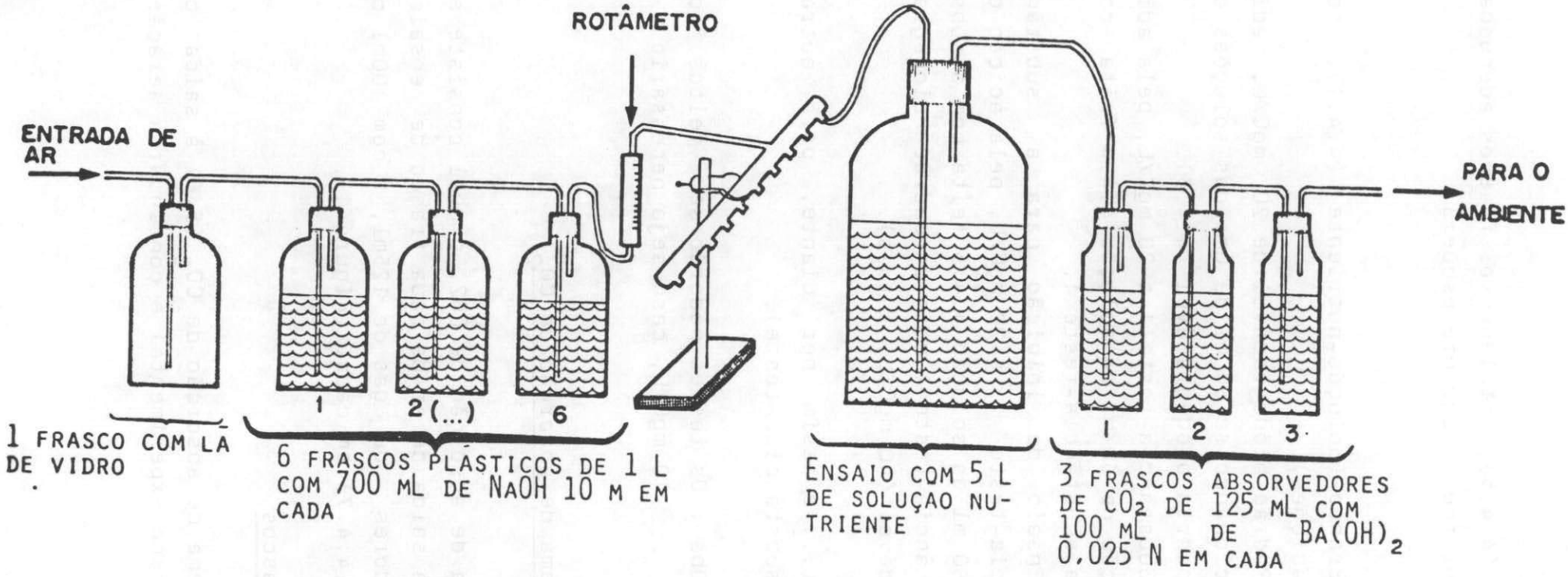


FIGURA 1 - SISTEMA PARA OS ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE PELA MEDIDA DO DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO EM SISTEMA ABERTO

inibição (4.4.5), rotulando os frascos adequadamente, conforme o seguinte esquema:

Frascos

1. (a,b) Branco (Solução-nutriente (4.4.1), sem adições).
2. (a,b) Padrão biodegradável de 20 mgC/L, adicionando-se 60 ml de uma das soluções de padrão biodegradável (4.4.3).
3. (a,b) Substância-teste 1 a 20 mgC/L, pela adição de 60 ml da solução 4.4.4 feita com a substância-teste 1.
4. (a,b) Ensaio de inibição para a substância-teste 1, a 20 mgC/L, pela adição de 60 ml da solução 4.4.5 feita com a substância-teste 1 mais um padrão biodegradável (40 mgC/L, totais).

(... e assim por diante, para outras substâncias-teste).

Obs.: Os testes poderão ser feitos com 10 mgC/L, caso seja necessário.

5.6. Montagem do sistema de absorção de CO_2

Montar um sistema de absorção de CO2, o qual consiste em ligar em linha, à saida de ar de cada frasco de ensaio, 3 frascos lavadores de gás de 125ml, com 100ml de $Ba(OH)_2$ 0,025 N (4.4.7) em cada. (Figura 1).

5.7. Incubação dos frascos

Conectar um sistema de absorção de CO_2 (5.6) à saída de ar de cada frasco experimental e continuar a aeração,

com ar livre de CO_2 (5.4.1), a 50-100 ml/min., na câmara a 20-25ºC.

5.8. Retirada dos frascos absorvedores de CO_2 para as titulações

Nos primeiros 10 dias de incubação, fazer a retirada diária ou de 2 em 2 dias, do frasco absorvedor de CO_2 contígüo ao frasco de ensaio e mover os outros dois frascos absorvedores de CO_2 uma posição, de forma que o segundo frasco passe para a primeira posição, o terceiro para a segunda e colocar, na terceira posição, um novo frasco absorvedor de CO_2 com 100ml de $Ba(OH)_2$ 0,025 N (4.4.7).
A partir do décimo dia de incubação tal retirada pode ser feita de 5 em 5 dias, até o final do ensaio aos 28 dias de teste, ou mesmo antes, desde que seja estabelecido um platô nítido de término de desprendimento de CO_2 indicando o final da metabolização.

5.9. Titulações com HCl 0,050 N

Imediatamente após a retirada de cada frasco absorvedor de CO_2 (5.8), o seu conteúdo é titulado com HCl 0,050 N (4.4.8), usando-se fenolftaleína (4.4.9) como indicador. Anotar cuidadosamente os volumes de HCl 0,050 N gastos para as titulações dos frascos absorvedores de CO_2 relativos aos: a) ensaios em branco, b) ensaios com os padrões biodegradáveis, c) ensaios com as substâncias-teste e d) ensaios de inibição.

5.10 Tempo de duração do teste

O tempo máximo de incubação, para efeito deste teste, é de 28 dias.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Determinação da quantidade de CO_2 desprendido para as substâncias ensaiadas

Primeiramente determina-se a diferença de volumes de HCl gastos entre as titulações dos brancos e as dos ensaios com substâncias (5.9).

Uma vez que, 1,0 mg de carbono orgânico oxidado durante o ensaio produz 3,666 mg de CO_2 (o que corresponde a 0,0833 mmoles de CO_2), e como 1,0 mmole desse gás reage com 2,0 mmoles de OH^- do Ba $(OH)_2$ usado para a sua absorção, 0,0833 mmoles de CO_2 consumirão 0,1666 mmoles de HCl, na titulação. Daí, quando é utilizado HCl 0,050 N, como neste teste, cada 1,00ml gasto na titulação, corresponderá a 1,10 mg de CO_2 absorvido.

Dessa forma, basta multiplicar a diferença de volume de HCl 0,050 N consumido entre as titulações dos ensaios em branco e as dos ensaios com substâncias, por 1,10mg, para se obter o total do CO_2 desprendido:

$$mgCO_2 = ml \text{ de HCl (diferença)} \times 1{,}10 \text{ mg/ml}$$

6.2. Anotação dos resultados brutos

Os resultados das titulações (mg de CO_2) relativas a cada frasco, para cada bateria de testes, serão cuidadosamente anotados em formulários apropriados, os quais deverão conter, além de todos os dados relativos à substância ensaiada e ao tipo de teste feito, os nomes, números de registro em conselhos profissionais e assinatura do analista e de seu superior hierárquico imediato, e o nome e endereço da entidade que realizou o teste. Cópias desses dados brutos serão, necessariamente, anexadas a todas as documentações que visarem processos para registros de produtos, pois os mesmos ficarão sujeitos à comparação com ensaios realizados, sob as mesmas condições, por laboratórios oficiais de referência.

6.3. Resultados derivados

6.3.1. Totalização das quantidades de CO_2 desprendido ao longo do ensaio

Os resultados (mg de $CO)_2$ obtidos em cada titulação (6.1) serão somados aos das titulações subsequentes, do mesmo ensaio, de modo a totalizar o CO_2 desprendido ao longo do tempo de incubação.

Estes dados também serão anotados conforme descrito para o tópico 6.1.

6.3.2. Cálculo da porcentagem de CO_2 desprendido em relação à quantidade teoricamente esperada para cada substância ensaiada

Conhecida a quantidade de CO_2 de fato desprendida para cada substância ensaiada (6.3.1), a qual é determinada quando for atingido um platô inquestionável quanto ao término do desprendimento de CO_2, calcular a porcentagem que essa quantidade significa em relação à quantidade de CO_2 teoricamente esperada (4.4.4) pela seguinte fórmula:

$$\%CO_2\text{-}t = (Cd/Ct) \times 100$$

onde:

$\%CO_2$-t = porcentagem de degradação da substância ensaiada, num determinado tempo de incubação (dias) (3.3).

Cd = quantidade totalizada (6.3.1) de CO_2 (mg) desprendido num determinado tempo de incubação (dias), para a substância ensaiada;

Ct = mg de CO_2 teoricamente esperados (4.4.4) para a oxidação completa da quantidade de substância ensaiada.

6.4. Gráficos

Lançar os resultados das porcentagens de degradação (%CO2) em função do tempo de incubação (dias), construindo gráficos para cada ensaio unitário realizado e para a média das duplicatas e anexar cópias de tais gráficos aos documentos dos processos.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Interpretação dos testes com resultados altos de desprendimento de CO_2

As substâncias-teste serão classificadas, quanto à biodegradabilidade, de acordo com a porcentagem do CO_2-t desprendido (6.3.2), atingida dentro do período máximo de 28 dias de incubação (5.10), mas exige-se sempre que seja atingido um mínimo de 70% (setenta por cento) de desprendimento do CO_2-t, como média para os dois frascos ensaiados para cada substância, num intervalo máximo de 10 dias contados a partir daquele em que forem atingidos 10% (dez por cento) de degradação.

7.2. Interpretação dos testes com resultados baixos de desprendimento de CO_2

A validade dos testes com resultados baixos de desprendimento de CO_2 é avaliada em função dos ensaios com as substâncias-padrão de biodegradabilidade e dos ensaios de efeitos inibidores, com os seguintes critérios:

7.2.1. Os testes serão considerados válidos e, portanto, a substância-teste será considerada biorresistente, se:

a) Os ensaios com os padrões biodegradáveis (5.5, frasco 2) apresentarem um mínimo de 70% de desprendimento de CO_2-t num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem atingidos 10% de degradação, restringindo-se a duração total do teste a 28 dias.

b) Os ensaios de inibição (5.5, frasco 4) apresentarem um mínimo de 70% de desprendimento do CO_2-t relativo ao padrão biodegradável adicionado (isto é, 35% CO_2 -t total das duas substâncias), num intervalo de 10 dias, conforme descrito para o tópico 7.2.1.a.

7.2.2. Os testes com baixos resultados de desprendimento de CO_2 **NÃO** serão considerados válidos para se concluir sobre a biodegradabilidade da substância-teste se:

a) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a. Neste caso o inóculo utilizado não estava ativo e a bateria de testes tem que ser refeita utilizando-se novos inóculos.

b) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a, mas nos ensaios de inibição não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.b. Neste caso deve ser assumido que a substância testada tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos nas concentrações utilizadas e será necessário um outro tipo de teste que permita o uso de concentrações mais baixas, como o teste E.1.1.4 desta série (teste de decaimento do oxigênio dissolvido).

8. CLASSIFICAÇÃO

8.1. Substâncias "Facilmente biodegradáveis"

A substância-teste que apresentar um mínimo de 70% de degradação, obedecidos os critérios de interpretação (7), será classificada como FACILMENTE BIODEGRADÁVEL e receberá o índice mais favorável para a tabela de classificação ecotoxicológica a ser adotada. Além disto, ficará excluída da necessidade de ser submetida a outros testes de biodegradabilidade, para efeito desta classificação.

8.2. Substâncias não aprovadas neste teste

As substâncias que não atingirem o mínimo de 70% de desprendimento de CO_2 como média dos dois frascos experimentais e obedecidos os critérios de interpretação (7), serão classificadas como **NÃO** FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS e receberão o índice mais desfavorável quanto à biodegradabilidade/persistência da tabela de classificação ecotoxicológica. A restrição de uso e de descarte ficará na dependência dos índices obtidos pela substância testada quanto aos demais parâmetros exigidos para a classificação ecotoxicológica.

9. LITERATURA BÁSICA

9.1. STURM, R. N. Biodegradability of nonionic surfactantes: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J. Amer. Oil Chem. Soc., 50: 159-167, 1973.

9.2 LARSON, R. J. Estimation of biodegradation potencial of xenobiotic organic chemicals. Appl. Environ. Microbiol., 38: 1153-1161, 1979.

9.3. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. OECD test guideline 301 B. Decision of the concil C(81)30. OECD, Paris, 1981.

9.4. LEROY, O. Chemicals and the environment: the ECC opts for a preventive policy. Europian Study Service, Rixensart, Belgium, 1987. p.548-552.

E.1.1.3 TESTE DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA PELA MEDIDA DO DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO EM SISTEMA FECHADO (Teste Gledhill-modificado)

Data da revisão: 01/88

1. OBJETIVO

Avaliar a biodegradabilidade imediata (3.1) de substâncias orgânicas hidrossolúveis ou pouco hidrossolúveis, mesmo voláteis, com metodologia analítica que permita a determinação da biodegradação total (3.2).

2. FUNDAMENTO

Uma determinada substância orgânica é submetida, como única fonte de carbono e de energia, à metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, numa solução nutriente mineral definida, em um frasco fechado, mas com um volume de ar aprisionado suficiente para fornecer oxigênio para a completa metabolização da quantidade de substância em teste. A porcentagem de desprendimento de dióxido de carbono (CO_2), em relação ao total de CO_2 teoricamente esperado para a completa oxidação do conteúdo de carbono da substância em teste (CO_2-teórico), medida de maneira adequada informará se a substância é biodegradável ou biorresistente, num dado período de tempo. A determinação da porcentagem de CO_2 desprendido em relação ao CO_2 - teórico (CO_2 -t), neste tipo de teste, permite a avaliação da biodegradação total (3.2). São realizados controles para detectar possíveis efeitos tóxicos das substâncias testadas sobre os microrganismos do inóculo.
Como os ensaios são feitos em frascos fechados é possível a realização de testes com substâncias voláteis, e como o acompanhamento analítico não requer retiradas de amostras de solução de ensaio, são possíveis testes com substâncias pouco hidrossolúveis.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Biodegradação imediata

É a propriedade de uma substância orgânica para ser metabolizada, isto é, destruída por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, num teste simples, sob condições as mais similares possíveis às da natureza, e que limitem as oportunidades de ocorrer seleção e adaptação microbiana. Assume-se que as substâncias que apresentarem resultados positivos frente a este teste serão degradadas de maneira mais rápida e mais completa no meio ambiente natural.

3.2. Biodegradação total

É a completa conversão, pela ação microbiana, de uma substância orgânica em sais minerais, $CO_2 H_2O$, biomassa e metabólitos normais dos microrganismos.

3.3. Biodegradação - para efeito deste teste

É definida como a porcentagem de CO_2 desprendido, pela ação microbiana em um determinado tempo, em relação ao total de CO_2 teoricamente esperado (CO_2-t) para oxidação completa da quantidade de substância ensaiada (6.3.2).

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e equipamentos

4.1.1. Sistema conjunto para a incubação e para a absorção do CO_2 desprendido. (figura 2)

4.1.2. Câmara de incubação com controle e temperatura entre 20 e 25ºC.

4.1.3. Equipamentos para titulometria ácido-base.

4.1.4. Centrífuga para 40.000 m/s (4.000 g).

4.2. Vidraria

Toda a vidraria deverá ser lavada adequadamente (5.1)

4.2.1. Frascos erlenmeyer de 2L para montagem do sistema de incubação e de absorção de CO_2.

4.2.2. Demais vidrarias normais de laboratório.

4.3. Água

Água destilada ou desionizada, isenta de substâncias tóxicas (em particular o cobre), com baixo conteúdo em carbono orgânico dissolvido (menor do que 10% daquele a ser introduzido pela substância-teste).

4.4. Soluções

4.4.1. Solução nutriente

É preparada somente no dia inicial de cada teste, adicionando-se para cada 1 litro final de solução a ser usado, 1,0 ml (um mililitro) de cada uma das soluções-estoque descritas no tópico 4.4.2 (solução 4.4.2.1 a 4.4.2.6), completando-se os volumes sempre com água (4.3).

4.4.2. Soluções-estoque

São preparadas com água 4.3, com reagentes de grau analítico de boa procedência e estocadas em refrigerador.

4.4.2.1. Solução de fosfato e amônio

KH_2PO_4..... 8,50 g
K_2HPO_4.....21,75 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$.....33,40 g
NH_4Cl.....20,00 g

Dissolver em água (4.3) e completar para 1,00 litro.

Obs: O pH deve ser de 7,2.

4.4.2.2. Sulfato de magnésio ($MgSO_4 . 7H_2O$) a 22,5 g/L, em água (4.3).

4.4.2.3. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 27,5 g/L, em água (4.3).

4.4.2.4. Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$) a 0,25 g/L, em água (4.3).

4.4.2.5. Solução de elementos traço

$MnSO_4.4H_2O$..... 39,9 mg
H_3BO_3..... 57,2 mg
$ZnSO_4.7H_2O$..... 42,8 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$..... 34,7 mg
$FeCl_3$.EDTA.....100,0 mg

Dissolver em água (4.3) e completar para 1,0 litro.

Obs: Esterilizar a 120 ºC, 2 atm., por 20 minutos.

4.4.2.6. Solução fonte de vitaminas: solução de extrato de levedura a 150 mg/litro em água (4.3).

4.4.3. Soluções de padrões biodegradáveis

Serão preparadas no dia do uso. (Não estocar).
Fazer ensaio com pelo menos uma das seguintes substâncias consideradas padrões quanto à biodegradabilidade:

1) Glicose ($C_6H_{12}O_6$, peso molecular 180; 0,400gC/g; CO_2 teórico de 1,466 mg/mg).
2) Anilina recém-destilada (C_6H_7N, peso molecular 93,1; 0,773 gC/g; CO_2-teórico de 2,838 mg/mg).
3) Benzoato de sódio ($C_7H_5O_2Na$, peso molecular 122,1; 0,688 gC/g; CO_2-teórico de 2,138 mg/mg)

Preparar soluções a 1,0 gC/L (isto é 1,0 g de carbono por litro ou 3,666 gCO_2 - t/L) em solução nutriente (4.4.1) e, no início dos ensaios de desprendimento de CO_2 (5.5), pipetar os volumes necessários para propiciar as concentrações indicadas para os mesmos (geralmente de 20 mg C/L ou 72,32 mg CO_2-t/L).

4.4.4. Soluções de substâncias a serem testadas

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).

Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1,0 gC/L (3,666 gCO_2-t/L) em solução nutriente (4.4.1).

Para substâncias-teste menos solúveis, preparar soluções o mais concentradas possível, sempre em solução nutriente (4.4.1).

No instante inicial do ensaio de desprendimento de CO_2 (5.5), pipetar os volumes adequados de cada solução para se atingir as concentrações indicadas para os mesmos (geralmente de 20 mgC/L, ou 73,32 $mgCO_2$-t/L).

As substâncias pouco hidrossolúveis e sólidas deverão ser pesadas com precisão mínima de 0,1 mg, e as líquidas pipetadas com precisão de 0,1 microlitro, e adicionadas diretamente às soluções de ensaio (5.5).

Obs: Portanto, é fundamental o conhecimento da fórmula química de cada substância a ser testada, para que seja possível o cálculo do seu conteúdo em carbono (gC/g substância) e do total de CO_2 teoricamente produzível $mgCO_2$/mg substância). Caso não se disponha dessa informação, pode-se lançar mão de dados relativos à Demanda Química de Oxigênio (DQO) ou do Carbono Orgânico Total (COT) e inferir a

produção de CO_2 esperada para a substância-teste. Nestes casos referir, nos resultados, a CO_2-DQO ou CO_2-COT, respectivamente.

4.4.5. Soluções para os ensaios de inibição

De forma a verificar se uma substância-teste tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos, preparar soluções mistas contendo sempre um padrão biodegradável (4.4.3) mais a substância-teste, a 1,0 gC/L cada uma (portanto 2gC/L ou 7,333 gCO_2-t, totais), sempre em solução nutriente (4.4.1).

4.4.6. Hidróxido de sódio (NaOH) a 10 M (400 g/L), para ser usada na purificação do ar quanto ao CO_2 (5.5.).

4.4.7. Hidróxido de bário, $Ba(OH)_2.8H_2O$, a 0,2 N (0,1 M). Dissolver 32 g de $Ba(OH)_2$ em 1 litro de água (4.3), filtrar de forma a livrar a solução de precipitados de carbonato de bário e estocar sob vedação que evite a absorção de CO_2.
Obs: Não é necessária a padronização desta solução pois para os cálculos do CO_2 desprendido será levada em conta apenas a diferença de equivalentes de HCl consumidos entre as titulações dos ensaios em branco e as dos ensaios com substâncias (6.1).

4.4.8. Solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,100 N, padronizada pela titulação contra padrão primário de base.

4.4.9. Fenolftaleína a 0,04% em etanol 70%.

4.5. Inóculo

Para a inoculação dos frascos de ensaio (5.3) pode-se utilizar qualquer uma das três fontes de microrganismos descritas em seguida, ou uma mistura das mesmas.

Obs.: É imprescindível que as amostras de inóculo apresentem contagens de microrganismos de, no mínimo, 100.000 colônias por mililitro, em agar padrão.

4.5.1. Microrganismos de esgoto doméstico

Coletar cerca de 1 litro de esgoto doméstico e passar por papel de filtro grosso (para retirar partículas grosseiras) e manter sob aerobiose, por um máximo de 6 horas, até à centrifugação, a qual deve ser feita somente instantes antes da inoculação (5.3).
Verificar a quantidade de frascos experimentais a inocular (5.5) e separar 10 ml para a inoculação de cada um deles.
Centrifugar o volume total de inóculo por 20 minutos a, no mínimo, 40.000 m/seg (4.000g).
Desprezar o(s) sobrenadante(s) e proceder com o(s) precipitado(s) de microrganismos conforme descrito no tópico relativo à inoculação (5.3).

4.5.2. Microrganismos de lodo ativado

Coletar cerca de 1 litro de lodo ativado (isto é, da mistura completa do tanque de aeração) de uma estação de tratamento de esgotos operando essencialmente com efluentes domésticos (ou de um sistema em escala de laboratório que simule tal estação).
Manter sob aerobiose, por um máximo 6 horas, até à centrifugação, a qual deve ser feita instantes antes da inoculação (5.3).
Homogeneizar por 2-3 minutos num liquidificador, à rotação máxima, para a ruptura dos flocos de lodo

e liberação dos microrganismos. Deixar em repouso por 15-30 minutos e transferir o sobrenadante para outro recipiente, filtrando-o através de papel de filtro grosso e evitando a passagem de sedimentos. Verificar a quantidade de frascos a inocular (5.5) e separar 3 ml para a inoculação de cada um deles. Centrifugar o volume total por 20 minutos a, no mínimo, 40.000 m/seg (4.000g) e desprezar o(s) sobrenadante(s).

Proceder então, com o(s) precipitado(s) de microrganismos conforme o tópico relativo à inoculação (5.3).

4.5.3. Microrganismos de solo

Pesar 100g de solo fértil (com baixo teor de argila e de matéria orgânica) e suspender em 1 litro de solução nutriente (4.4.1). Homogeneizar bem e deixar em repouso por 30 minutos para a decantação. Passar o sobrenadante através de papel filtro grosso, desprezando os primeiros 200 ml. Manter o restante do filtrado sob aerobiose, procedendo, daqui por diante, conforme descrito para as amostras de esgoto doméstico (4.5.1).

5. PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

5.1. Preparação da vidraria

Toda a vidraria será lavada com solução sulfocrômica recém-preparada, enxaguada exaustivamente e relavada com solução de ácido clorídico em etanol (100 ml de HCl 5 N + 900 ml de etanol). Enxaguar exaustivamente com água comum e com água destilada (4.3) de forma a livrar a vidraria de traços de carbono orgânico solúvel e de materiais tóxicos.

5.2. Distribuição da solução nutriente nos frascos de testes

Primeiramente verificar quantos frascos serão utilizados na bateria de teste (5.5) e preparar o volume necessário de solução nutriente (4.4.1), distribuindo 1,0 L em cada frasco experimental, incluindo os ensaios em branco.

5.3. Inoculação

Ressuspender o(s) precipitado(s) de microrganismos relativos aos inóculos preparados (4.4) em um volume de solução nutriente (4.4.1) que corresponde a 10 ml para cada frasco a ser utilizado.
Homogeneizar bem e, mantendo a homogeneização, pipetar 10 ml desse inóculo em cada frasco experimental, excetuando os ensaios de inibição, os quais não serão inoculados (5.5, frascos 4 a,b).

5.4. Pré-incubação

Cobrir os frascos frouxamente com folha de alumínio e pré-incubá-los por 24 horas, a 100-150 rpm, a 20-25ºC, de forma a permitir a metabolização de substâncias orgânicas porventura adsorvidas aos microrganismos do inóculo.

5.5. Iniciação dos testes de desprendimento de CO_2

Após as 24 horas de pré-incubação das soluções nutrientes inoculadas, borbulhar cada frasco, por 15 minutos, com ar comprimido livre de CO_2 (pela passagem por NaOH 10 M) e fazer as adições de substâncias-padrão biodegradáveis (4.4.3), de substâncias-teste (4.4.4) e solução para os ensaios de inibição (4.4.5), rotulando os frascos adequadamente, conforme o seguinte esquema:

Frascos

1. (a,b) Branco (Solução-nutriente, 4.4.1, sem adições).

2. (a,b) Padrão biodegradável a 20 mgC/L, adicionando-se 20 ml de uma das soluções de padrões biodegradáveis (4.4.3).
3. (a,b) Substância-teste 1 a 20 mgC/L, pela adição de 20 ml da solução 4.4.4 feita com a substância-teste 1.
4. (a,b) Ensaio de inibição para a substância-teste 1, a 20 mgC/L, pela adição de 20 ml da solução 4.4.5 feita com a substância teste 1 mais um dos padrões biodegradáveis.

(... e assim por diante, para outras substâncias-teste).

5.6. Incubação dos frascos

Colocar um sistema de absorção de CO_2 em cada frasco experimental e incubá-los, a 100-150 rpm, numa câmara a 20-25ºC.

5.7. Retirada da solução absorvedora de CO_2 para as titulações

Nos primeiros 10 dias de incubação, fazer a retirada diária ou de 2 em 2 dias, da solução absorvedora de CO_2 usando uma seringa hipodérmica descartável. Após a retirada dos 10 ml de $Ba(OH)_2$, introduzir 10 ml de água (4.3) no recipiente de absorção de CO_2, homogeneizar bem por bombeamento com a seringa, retirar essa água de lavagem e juntá-la aos 10 ml de $Ba(OH)_2$ a serem titulados. Colocar uma nova partida de 10 ml de $Ba(OH)_2$ 0,2 N no recipiente de absorção de CO_2 e continuar a incubação.
A partir do décimo dia de incubação, tal retirada pode ser feita de 5 em 5 dias, até o final do ensaio aos 28 dias de teste, ou quando for estabelecido um platô nítido de parada de desprendimento de CO_2 indicando o fim da metabolização.

5.8. Titulações com HCl 0,100 N

Imediatamente após a retirada de cada solução absorvedora

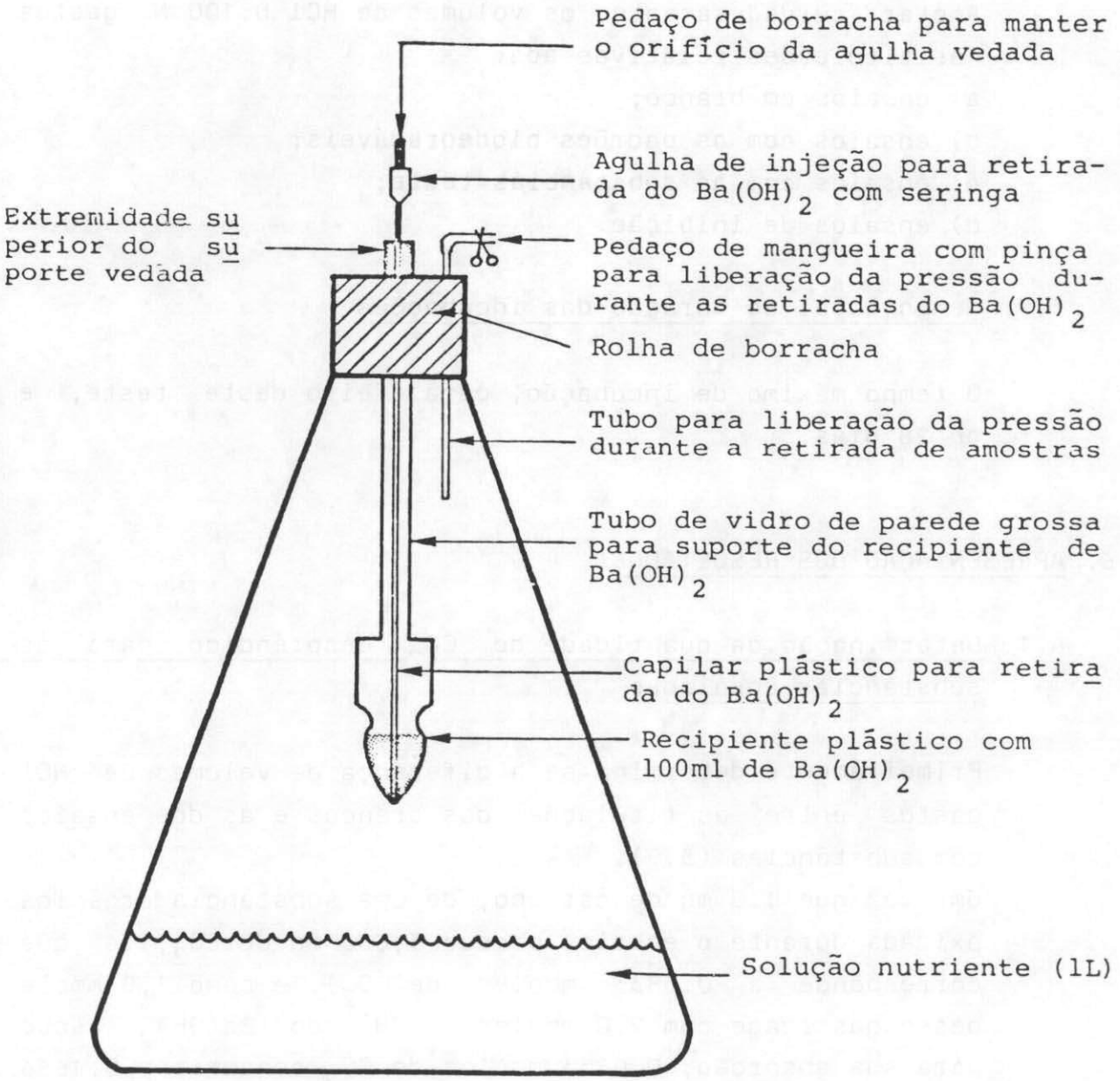


Figura 2 - Frasco para os ensaios de biodegradabilidade pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema fechado ("Teste Gledhill - modificado).

de CO_2 (5.7), a mesma é titulada com HCl 0,100 N (4.4.8), usando-se fenolftaleína (4.4.9) como indicador.
Anotar, cuidadosamente, os volumes de HCl 0,100 N gastos nas titulações relativas aos:

a) ensaios em branco;
b) ensaios com os padrões biodegradáveis;
c) ensaios com as substâncias-teste;
d) ensaios de inibição.

5.9. Tempo total de duração das incubações

O tempo máximo de incubação, para efeito deste teste, é de 28 dias.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Determinação da quantidade de CO_2 desprendido para as substâncias ensaiadas

Primeiramente determina-se a diferença de volumes de HCl gastos entre as titulações dos brancos e as dos ensaios com substâncias (5.9).
Uma vez que 1,0 mg de carbono, de uma substância orgânica oxidada durante o ensaio, produz 3,666 mg de CO_2, (o que corresponde a 0,0833 mmoles de CO_2), e como 1,0 mmole desse gás reage com 2,0 mmoles de OH^- do $Ba(OH)_2$ usado para sua absorção, 0,0833 mmoles de CO_2 consumiram 0,1666 mmoles de HCl, na titulação. Daí, quando é utilizado HCl 0,100 N, como neste teste, cada 1,00 ml gasto na titulação corresponderá a 2,20 mg de CO_2.
Dessa forma, basta multiplicar a diferença de volume de HCl 0,100 N, consumidos entre as titulações dos ensaios em branco e as dos ensaios com substâncias, por 2,20 mg, para se obter o total de CO_2 desprendido:

$$mgCO_2 = ml \text{ de } HCl \text{ (diferença)} \times 2{,}20 \text{ mg/ml}$$

frascos ensaiados, num intervalo máximo de 10 dias contados a partir daquele em que forem atingidos 10% de degradação.

7.2. Interpretação dos testes com resultados baixos de desprendimento de CO_2

A validade dos testes é avaliada em função dos ensaios com as substâncias-padrão de biodegradabilidade e dos ensaios de efeitos inibidores, com os seguintes critérios:

7.2.1. Os testes serão considerados válidos e, portanto, a substância-teste será considerada biorresistente se:

a) Os ensaios com os padrões biodegradáveis (5.5, frasco 2) apresentarem um mínimo de 70% de desprendimento de CO_2-teórico, num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem atingidos 10% de degradação, restringindo-se a duração total do teste a 28 dias.

b) Os ensaios de inibição (5.5, frasco 4) apresentarem um mínimo de 70% de desprendimento do CO_2-t relativo ao padrão biodegradável adicionado (isto é, 35% do CO_2-t total das duas substâncias adicionadas), num intervalo de 10 dias, conforme descrito para o tópico 7.2.1.a.

7.2.2. Os testes com baixos resultados de desprendimento de CO_2 não serão considerados válidos para se concluir sobre a biodegradabilidade da substância-teste se:

a) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a.

Neste caso o inóculo utilizado não estava ativo e a bateria de testes tem que ser refeita utilizando-se novos inóculos.

b) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a, mas nos ensaios de efeitos inibidores não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.b. Neste caso deve ser assumido que a substância testada tem efeitos inibidores sobre os microrganismos nas concentrações utilizadas e será necessário um outro tipo de teste que permita o uso de concentrações mais baixas, como o teste E.1.1.4 desta série (teste de consumo do oxigênio dissolvido).

8. CLASSIFICAÇÃO

8.1. Substâncias "facilmente biodegradáveis"

A substância-teste que apresentar um mínimo de 70% de degradação (6.3.2), obedecidos os critérios de interpretação (7), será classificada como FACILMENTE BIODEGRADÁVEL e receberá o índice mais favorável para a tabela de classificação ecotoxicológica a ser adotada.

Além disto, ficará excluída da necessidade de ser submetida a outros testes de biodegradabilidade, para efeito desta classificação.

8.2. Substâncias não aprovadas neste teste

As substâncias que não atigirem o mínimo de 70% de degradação (6.3.2), obedecidos os critérios de interpretação (7), serão classificadas como NÃO FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS e receberão o índice mais desfavorável quanto à biodegradabilidade/persistência da tabela de classifi-

6.2. Anotação dos resultados brutos

Os resultados (mg de CO_2) das titulações relativas a cada frasco, para cada bateria de testes, serão cuidadosamente anotados em formulários apropriados, os quais deverão conter, além de todos os dados relativos à substância ensaiada e ao teste feito, os nomes, números de registro em conselhos profissionais e assinaturas do analista e de seu superior hierárquico imediato, e o nome e endereço da entidade que realizou o teste. Cópias desses dados brutos serão, necessariamente, anexadas a todas as documentações que visarem processos para registros de produtos pois os mesmos ficarão sujeitos à comparação com ensaios realizados, sob as mesmas condições, por laboratórios oficiais de referência.

6.3. Resultados derivados

6.3.1. Totalização das quantidades de CO_2 desprendido ao longo do ensaio

Os resultados (mg de CO_2) obtidos em cada titulação (6.1) serão somados aos das titulações subsequentes, do mesmo ensaio, de modo a fazer-se a totalização do CO_2 desprendido ao longo do tempo de incubação.
Estes dados também serão anotados conforme descrito para o tópico 6.1.

6.3.2. Cálculo da porcentagem de CO_2 desprendido em relação à quantidade teoricamente esperada para cada substância ensaiada

Conhecida a quantidade de CO_2 de fato desprendida para cada substância ensaiada (6.3.1), à qual é determinada quando for atingido um platô inquestionável quanto ao término do desprendimento de

CO_2, calcular a porcentagem que essa quantidade significa em relação à quantidade de CO_2 teoricamente esperada (4.4.4), pela seguinte fórmula:

$$\%CO_2\text{-}t = (C_d/C_t) \times 100$$

onde:

$\%CO_2$-t = porcentagem de degradação da substância ensaiada, num determinado tempo de incubação (dias) (3.3).

C_d = quantidade totalizada (6.3.1) de CO_2 (mg) desprendido num determinado tempo de incubação (dias), para a substância ensaiada.

C_t = quantidade de CO_2 (mg) teoricamente esperada (4.4.4) para a oxidação completa da quantidade de substância ensaiada.

6.4. Gráficos

Lançar os resultados das porcentagens de degradação ($\%CO_2$) em função do tempo de incubação (dias), construindo gráficos para cada ensaio unitário realizado e para a média das duplicatas e anexar cópias de tais gráficos aos documentos dos processos.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Interpretação dos testes com resultados altos de desprendimento de CO_2

As substâncias-teste serão classificadas, quanto à biodegradabilidade, de acordo com a porcentagem do CO_2-t desprendido (6.3.2), atingida dentro do período máximo de 28 dias de incubação (5.9), mas exige-se sempre que seja atingido um mínimo de 70% (setenta por cento) de desprendimento do CO_2-teórico, como média para os dois

cação ecotoxicológica. A restrição de uso e de descarte ficará na dependência dos índices obtidos pela substância testada quanto aos demais parâmetros exigidos para a classificação ecotoxicológica.

9. LITERATURA BÁSICA

9.1. EPA.U.S. Environmental Protection Agency. Aerobic aquatic biodegradation. Federal Register (USA), 50 (188): 39277-39280, 1985.

9.2. GLEDHILL, W.E. Screening test for assessment of ultimate biodegradability: linear alkylbenzene sulfonate. Applied Microbiology, 30: 922-929, 1975.

E.1.1.4. TESTE DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA PELA MEDIDA DO CONSUMO DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO ("Teste do Frasco Fechado")
Data da revisão: 01/88

1. OBJETIVO

Avaliar a biodegradabilidade imediata (3.1) de substâncias orgânicas hidrossolúveis e pouco hidrossolúveis, mesmo voláteis, com metodologia analítica que permita a determinação da biodegradação total (3.2), em baixas concentrações (em geral 2 mg/L).

2. FUNDAMENTO

Uma determinada substância orgânica é submetida, como única fonte de carbono e de energia, à metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, numa solução nutriente mineral definida, saturada com oxigênio e preenchendo completamente um recipiente hermeticamente fechado. A porcentagem de consumo do oxigênio dissolvido (OD), em relação à demanda teórica de oxigênio (DO_t, 3.4) da substância ensaiada, medida de maneira adequada, informará se a substância é biodegradável ou biorresistente, num dado período de tempo. A metodologia analítica da determinação da porcentagem de consumo biológico da DO_t (3.4) permite a avaliação da biodegradação total (3.2).
São realizados ensaios-controle de modo a detectar possíveis efeitos tóxicos da substância testada sobre os microrganismos do inóculo (4.4.5).

3. DEFINIÇÕES

3.1. Biodegradabilidade imediata

É a propriedade de uma substância orgânica de ser metabolizada, isto é, destruída, por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, num teste simples, sob condições as mais similares possíveis às da natureza, e que limitem as oportunidades de ocorrer

seleção e adaptação microbiana. Assume-se que as substâncias que apresentarem resultados positivos frente a este teste serão degradadas de maneira mais rápida e mais completa no meio ambiente natural.

3.2. Biodegradação total

É a completa conversão, pela ação microbiana, de uma sustância orgânica em sais minerais, CO_2, H_2O, biomassa e metabólitos normais dos microrganismos.

3.3. Biodegradação para efeito deste teste

É definida como a porcentagem de consumo, pela ação de microrganismos num determinado período de tempo, da DO_t (3.4) da substância ensaiada (6.4).

3.4. Demanda teórica de oxigênio (DO_t)

É a quantidade de oxigênio teoricamente exigida para a completa oxidação de uma substância orgânica, calculada conforme o Anexo-1 deste teste.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Equipamentos

4.1.1. Câmara incubadora, ou banho de água termostatizado (20-25ºC).

4.1.2. Aparelho para medir oxigênio dissolvido (OD) eletrometricamente (9.2, 9.4) ou materiais para a sua determinação química (9.2, 9.3).

4.2. Vidraria

Toda a vidraria deverá ser lavada adequadamente (5.1).

4.2.1. Frascos de DBO, de 250 ou 300 ml, calibrados.

4.2.2. Frascos de vidro, de 3 a 10 litros de capacidade, graduados manualmente de 1 em 1 litro, para a preparação das soluções para os ensaios (5.2).

4.2.3. Demais vidrarias normais de laboratório.

4.3. Água

Água destilada, ou desionizada, isenta de substâncias tóxicas (em particular o cobre, o qual não poderá apresentar-se a mais do que 0,01 mg/L). O volume necessário para uma bateria de testes, em geral 50 litros, é mantido à temperatura o mais perto possível dos 20 ºC, e aerado violentamente, com ar comprimido livre de quaisquer substâncias, por um mínimo de 20 minutos. A concentração em oxigênio dissolvido é determinada e deve ser de aproximadamente 9 mg/L. Todas as transferências dessa água para os frascos devem ser feitas por sifonamento, de forma a evitar a formação de bolhas.

4.4. Soluções

4.4.1. Solução-nutriente

É preparada somente no dia inicial de cada teste adicionando-se para cada 1 litro final de solução a ser usado, 1,0 ml (um mililitro) de cada uma das soluções-estoque descritas no tópico 4.4.2 (soluções 4.4.2.1 a 4.4.2.4), completando-se os volumes sempre com água (4.3).

4.4.2. Soluções-estoque

São preparadas com água (4.3), com reagentes de grau analítico de boa procedência, e são conservadas em refrigerador.

4.4.2.1. Solução de fosfato e amônio

KH_2PO_4..... 8,50 g
K_2HPO_4.....21,75 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$.....33,40 g
NH_4Cl..... 1,70 g

Diluir em água (4.3) e completar 1,0 litro.
Obs.: O pH deve ser de 7,2.

4.4.2.2. Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) a 22,5 g/L, em água (4.3).

4.4.2.3. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 27,5 g/L, em água (4.3).

4.4.2.4. Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$) a 0,25 g/L, em água (4.3).

4.4.3. Soluções de padrões biodegradáveis

Fazer ensaio com, pelo menos, uma das seguintes substâncias consideradas padrões quanto à biodegradabilidade:

1) Glicose ($C_6H_{12}O_6$; peso molecular 180, 0,400 gC/g; DO_t de 1,07 mgO_2/mg; Anexo-1).
2) Anilina recém-destilada (C_6H_7N; peso molecular 93,1; o,773 gC/g; DO_t (NO_3) de 3,09 mgO_2/mg; Anexo-1).
3) Benzoato de sódio ($C_7H_7O_2Na$; peso molecular de 122,1; DO_t de 1,96 mgO_2/mg; Anexo-1).

Preparar soluções concentradas (1,0 g/L) em solução-nutriente (4.4.1) e no instante inicial dos ensaios (5.5), pipetar os volumes necessários para propiciar as concentrações indicadas para os mesmos.

Estas soluções serão preparadas somente no dia inicial dos testes (não estocar).

4.4.4. Soluções de substâncias a serem testadas

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).

Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1,0 g/L, em solução-nutriente (4.4.1).

Para substâncias-teste menos solúveis preparar as soluções mais concentradas possíveis sempre em solução nutriente (4.4.1).

No instante inicial do ensaio (5.5), pipetar os volumes adequados de cada solução para se atingir as concentrações indicadas para os mesmos.

5.2. Preparação das soluções para os ensaios

Primeiramente, verificar qual o volume total a ser gasto de cada solução a ser ensaiada e utilizar frascos adequados para a preparação de cada uma delas.
Pegar frascos (4.3.2) com capacidade para o volume de trabalho necessário e, cuidadosamente, sifonar água aerada (4.3) para cada um deles, preenchendo cerca de 2/3 (dois terços) daquele volume e adicionar as soluções-estoque descritas no tópico 4.4.2 (soluções 4.4.2.1 a 4.4.2.4) na base de 1,0 ml para cada 1 litro de volume final de trabalho (1,0 ml/L). Em seguida, fazer adições das soluções de substâcias a serem ensaiadas e de inóculo, pelo seguinte esquema:

FRASCO

1) Controle do ensaio em branco. Não inocular nem adicionar mais nada.
2) Ensaio em branco. Adicionar 0,5 ml/L do inóculo (4.5).
3) Padrão biodegradável, a 2 mg/L, pela adição de 2ml/L da solução 4.4.6, feita por exemplo, com glicose. Adicionar 0,5 ml/L do inóculo (4.5).
4) Substância-teste 1, a 2 mg/L, pela adição de 2 ml/L da solução 4.4.4, feita com a substância teste 1. Adicionar 0,5 ml/L do inóculo (4.5).
5) Ensaio de inibição para a substância-teste 1, a 2 mg/L, pela adição de 2 ml/L da solução 4.4.5 feita com a substância-teste 1 e um dos padrões biodegradáveis. Adicionar 0,5 ml/L do inóculo (4.5).

(... e assim por diante para outras substâncias-teste)

Sifonar água aerada (4.3) de modo a completar o volume final de trabalho determinado para cada frasco e homogeneizar por agitação com bastão de vidro e com cuidados para não introduzir bolhas.

5.3. Distribuição das soluções nos frascos de DBO para os ensaios

Imediatamente após a preparação das soluções acima descritas sifonar, cuidadosamente, cada uma delas para os seus respectivos frascos de DBO em duplicata para cada tempo, devidamente rotulados e distribuídos conforme a seguinte bateria:

TEMPO (dias)	ENSAIOS COM AS SOLUÇÕES					
	1	2	3	4	5	n...
0(inicial)	1.0(a,b)	2.0(a,b)	3.0(a,b)	4.0(a,b)	5.0(a,b)...	
5.	1.5(a,b)	2.5(a,b)	3.5(a,b)	4.5(a,b)	5.5(a,b)...	
10.	1.10(a,b)	2.10(a,b)	3.10(a,b)	4.10(a,b)	5.10(a,b)..	
15.	1.15(a,b)	2.15(a,b)	3.15(a,b)	4.15(a,b)	5.15(a,b)..	
20.	1.20(a,b)	2.20(a,b)	3.20(a,b)	4.20(a,b)	5.20(a,b)..	
28.	1.28(a,b)	2.28(a,b)	3.28(a,b)	4.28(a,b)	5.28(a,b)..	

5.4. Incubação

Fechar hermeticamente os frascos, tomando o cuidado de não aprisionar bolhas de ar e, imediatamente, determinar o oxigênio dissolvido dos frascos referentes ao instante inicial (to) do teste e incubar os outros frascos em banho ou em câmara de 20-25 ºC, protegidos de luz.

5.5. Determinação do oxigênio dissolvido (OD)

O conteúdo em OD dos frascos será determinado de acordo com o esquema temporal sugerido pelo tópico 5.3. Entretanto é interessante fazer determinações em tempos menores de forma a obter-se uma melhor definição do platô de término do consumo do oxigênio dissolvido.

Obs: É fundamental o conhecimento da fórmula química de cada substância a ser testada, para se calcular a sua demanda teórica de O_2 (DO-t), o que é feito segundo o Anexo-1. Para efeito deste teste, considerar a oxidação do nitrogênio a nitrato (NO_3).

Caso não seja conhecida a fórmula química, pode-se lançar mão de dados relativos à Demanda Química de Oxigênio (DQO) ou do Carbono Orgânico Total (COT) e inferir o consumo de O_2 esperado para a substância-teste. Nestes casos, referir, nos resultados, a DO-DQO, ou DO-COT, respectivamente.

4.4.5. Soluçao para os ensaios de inibição

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).

De forma a verificar se a substância-teste tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos do inóculo, preparar soluções mistas contendo sempre um dos padrões biodegradáveis mais a substância teste a 1,0 g/L cada uma (portanto, 2,0 g/L totais), sempre em solução nutriente (4.4.1).

No instante inicial dos ensaios (5.2) pipetar os volumes necessários para propiciar as concentrações indicadas para os mesmos (geralmente 2,0 mg/L de cada substância).

4.5. Inóculo

Para a inoculação dos frascos de ensaio (5.4) pode-se utilizar qualquer uma das três fontes de microrganismos descritas em seguida, ou uma mistura das mesmas.

Obs: É imprescindível que as amostras de inóculo apresentem contagens de microrganismos de, no mínimo, 100.000 colônias por mililitro, em agar padrão.

4.5.1. Esgoto doméstico ou efluente de estação de tratamento de esgotos domésticos

Coletar cerca de 500 ml de esgoto, ou de efluente, e passar por papel de filtro grosso (para retirar as partículas grosseiras), desprezando os primeiros 200 ml filtrados. Manter, necessariamente, o

restante do filtrado sob aeração por 24-48 horas. Centrifugar a, no mínimo, 40.000 m/seg (4.000g) por 20 minutos, descartando o sobrenadante. Ressuspender o precipitado de células no mesmo volume original centrifugado, usando solução nutriente (4.4.1). Manter sob aeração por mais 24 horas e, então, usar na inoculação (5.2).

4.5.2. Microrganismos de solo

Pesar 100g de solo fértil (com baixo teor de argila e de matéria orgânica) e suspender em 1 litro de solução nutriente (4.4.1). Homogeneizar bem e deixar em repouso por 30 minutos, para a decantação. Passar o sobrenadante através de papel de filtro grosso, descartando os primeiros 200 ml. Então, proceder conforme descrito para o esgoto doméstico (4.5.1).

4.5.3. Microrganismos de águas superficiais naturais

Utilizar, de preferência, amostra composta. Para tanto, escolher um local apropriado do rio, lago ou represa do qual se queira testar a água quanto ao seu potencial de biodegradar a substância-teste. Coletar cerca de 500 ml de amostra, de 30 em 30 minutos por, no mínimo, 2 horas e misturá-las, mantendo sempre sob aerobiose. Em seguida proceder conforme descrito para as amostras de esgoto (4.5.1).

5. PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

5.1. Preparação da vidraria

Toda a vidraria será lavada com solução sulfocrômica recém-preparada, enxaguada exaustivamente, e relavada com solução de ácido clorídrico em etanol (100 ml de HCl 5 N + 900 ml de etanol). Enxaguar exaustivamente com água comum e com água destilada (4.3) de forma a livrá-la de traços de carbono orgânico solúvel e de materiais tóxicos.

Obs: As determinações do OD podem ser feitas pelos métodos químico (9.2, 9.3) ou eletrométrico (9.3, 9.4).

5.6. Duração dos testes

O período máximo de incubação, para efeito de validade deste teste, é de 28 dias.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Anotação dos resultados brutos

Os resultados (mg O_2/L) das determinações relativas a cada frasco, para cada bateria de testes, serão cuidadosamente anotados em formulário apropriado, o qual deverá conter, além de todos os dados relativos à substância testada e aos testes realizados, os nomes, números de registro em conselhos profissionais e assinaturas do analista e de seu superior hierárquico imediato e o nome e endereço da entidade realizadora do teste. Cópias desses dados brutos serão necessariamente anexadas às documentações de registro de produto, pois os mesmos ficarão sujeitos à comparação com ensaios realizados, sob as mesmas condições, por laboratórios oficiais de referência.

6.2. Cálculo do consumo de oxigênio (CO)

Uma vez obtidos os resultados das análises de oxigênio dissolvido (mg O_2/L), calcula-se o consumo de oxigênio (CO) para cada substância ensaiada, pela fórmula:

$$CO_t = B_t - S_t$$

onde;

CO_t = Consumo de oxigênio dissolvido (mg O_2/L) no tempo t (dias), para uma certa substância.

B_t = Concentração de O_2 (mg/L) do ensaio em branco (solução 2) no tempo t (dias).

S_t = Concentração de O_2 (mg/L) do ensaio com a substância (soluções 3,4,5 etc) no tempo t (dias).

Os resultados de CO são calculados para os ensaios unitários e para a média das duplicatas e são anotados em formulário, conforme exigido para o tópico 6.1.

6.3. Cálculo da demanda teórica de oxigênio (DOt)

A demanda teórica de oxigênio, para uma determinada substância, é estimada com base na fórmula química da mesma, segundo o Anexo 1 (4.4.4). Para efeito deste teste considerar a oxidação do nitrogênio a NO3 (Anexo-1).
Quando não for conhecida a fórmula química de uma substância-teste, deve-se determinar a sua demanda química de oxigênio (DQO) ou o seu Carbono Orgânico Total (COT) e, nestes casos, relatar os dados como DO-DQO ou DO-COT.

6.4. Cálculo da porcentagem de CO em função da DOt(%DOt)

Uma vez determinados os consumos reais de oxigênio (CO) para cada substância ensaiada (6.1), e calculadas as DOt das mesmas (6.3), calcula-se a porcentagem de consumo em relação à demanda, através da seguinte fórmula:

$$\%DOt = (CO/DOt).\ 100$$

onde;

%DOt = Porcentagem de degradação da substância ensaiada no instante t (dias) (3.3).

CO = Consumo de oxigênio (mg O_2/L) no ensaio de uma certa substância, no instante t (dias).

DO_t = Demanda teórica de oxigênio (mgO_2/L) da substância ensaiada.

Obs.: Para substâncias com N considerar a oxidação a NO_3 (Anexo I).

6.5. Gráficos

Lançar os resultados das médias das porcentagens de degradação (%DO_t) em função do tempo de incubação (dias), e anexar cópias dos gráficos obtidos aos documentos de registro de produtos.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Interpretação dos testes com resultados altos de consumo de oxigênio

Os testes serão considerados válidos e, portanto, as substâncias ensaiadas serão consideradas FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS se:

a) Nos controles dos ensaios em branco (solução 1, não inoculada) o consumo de OD não exceder 0,3 mg O_2/L no 5º dia e 0,4 mg O_2/L no 28º dia de incubação.

b) Nos ensaios em branco (solução 2, inoculada) o consumo de OD não exceder 0,5 mg O_2/L no 5º dia e 0,6 mg/L no 28º dia de incubação.

c) O consumo de oxigênio (CO) dos ensaios com as substâncias-teste atingir um mínimo de 60% em relação à demanda teórica de oxigênio (DO_t) das mesmas, mas dentro de um período de 10 dias, contados a partir daquele em que forem atingidos 10% de degradação.

7.2. Interpretação dos resultados com baixos consumos de oxigênio

7.2.1. Os testes serão considerados válidos e, portanto, as substâncias ensaiadas serão consideradas biorresistentes se:

a) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis (solução 3) for atingido um mínimo de 60% de decaimento da demanda teórica de oxigênio (60% da DO_t), num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem atingidos 10% de degradação, restringindo-se a duração total do teste a 28 dias.

b) Nos ensaios de inibição, (solução 5) for alcançado um mínimo de 60% de decaimento da demanda de oxigênio (60% da DO) do padrão biodegradá-

vel adicionado (isto é, 30% da DO_t total esperada para a degradação das duas substâncias adicionadas) num intervalo de 10 dias, conforme tópico 7.2.1.a.

7.2.2. Os testes NÃO serão considerados válidos para se concluir sobre a biodegradabilidade das substâncias ensaiadas, se:

a) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a.
Nestes casos deve-se considerar que o inóculo utilizado não estava ativo e a bateria de testes tem que ser refeita com novos inóculos.

b) Nos ensaios com os padrões biodegradáveis forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.a, mas nos ensaios de inibição não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.b.
Nestes casos deve-se assumir que a substância ensaiada tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos do inóculo, nas concentrações utilizadas e não se pode concluir sobre a biodegradabilidade de tal substância a não ser pelo emprego de testes com metodologias analíticas que permitam o ensaio com concentrações menores, testes estes que, devido ao caráter específico, não estão, ainda, definidos em normas e deverão ser analisados caso a caso.

8. CLASSIFICAÇÃO

8.1. Substâncias "facilmente biodegradáveis"

A substância-teste que apresentar um mínimo de 60% de degradação, obedecidos os critérios de interpretação (7), será classificada como FACILMENTE BIODEGRADÁVEL e receberá o índice mais favorável na tabela de classificação

ecotoxicológica a ser adotada. Além disto, ficará excluída da necessidade de ser submetida a outros testes biodegradabilidade, para efeito desta classificação.

8.2. Substâncias não aprovadas neste teste

As substâncias que não atingirem o mínimo de 60% de degradação, obedecidos os critérios de interpretação (7), serão classificadas com NÃO FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS e receberão o índice mais desfavorável quanto à biodegradabilidade/persistêcia da tabela de classificação ecotoxicológica. A restrição de uso e de descarte ficará na dependência dos índices obtidos pela substância testada quanto aos demais parâmetros exigidos para a classificação ecotoxicológica.

9. LITERATURA BÁSICA

9.1. LEROY, O. Chemicals and the environment: the ECC opts for a preventive policy. Europian Study Service, Rixensart, Belgium, 1987.

9.2. APHA.AMER. PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (USA). Standards methods for the examination of water and wastewater. 16 th. ed. Washington, DC, 1985.

9.3. CETESB. CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. Determinação de oxigênio dissolvido em águas. Método de Wimkler modificado pela azida sódica. Norma Técnica L5.169. CETESB, São Paulo, 1978.

9.4. _____. Tratamento biológico de efluentes industriais. Determinação do oxigênio dissolvido (OD) em água pelo método eletrométrico. Norma Técnica L5.178. CETESB, São Paulo.

ANEXO - 1

CÁLCULO DA DEMANDA TEÓRICA DE OXIGÊNIO

A demanda teórica de oxigênio (DO_t) de uma substância orgânica de fórmula $C_cH_hCl_{cl}Na_{na}O_oP_pS_s$ e de peso molecular PM, supondo as oxidações de: C a CO_2, H a H_2O, P a P_2O_5 e Na a Na_2O, e que os halogênios são eliminados como haletos de hidrogênio, é calculada pelas seguintes fórmulas:

1) Considerando a eliminação do N como amônia:
   $DO_t\ (NH_3) = 16(2c + 1/2\ (h-cl-3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o)/PM.$

2) Considerando a oxidação do N a nitrito:
   $DO_t(NO_2) = 16\ (2c+ 1/2\ (h-cl)+ 3s + 3/2n + 5/2p + 1/2na-o)/PM.$

3) Considerando a oxidação do N e nitrato:
   $DO_t(NO_3) = 16\ (2c+ 1/2\ (h-cl)+ 3s + 5/2n + 5/2p + 1/2na-o)/PM.$

   Exemplos:

a) Glicose ($C_6H_{12}O_6$; PM = 180)
   $DO_t = 16\ (\ (2x6) + ((1/2)x12) - 6)\ /\ 180 = 1,07\ mgO_2/mg.$

b) Anilina (C_6H_7N; PM = 93,1)
   $DO_t\ (NH_3) = 16\ (2x6 + (7-3)\ /2)\ /93,1 = 2,40\ mgO_2/mg.$
   $DO_t\ (NO_2) = 16\ (2x6 + 7/2 + 3/2)\ /93,1 = 2,92\ mgO_2/mg.$
   $DO_t\ (NO_3) = 16\ (2x6 + 7/2 + 5/2)\ /93,1 = 3,09\ mgO_2/mg.$

c) Benzoato de sódio ($C_7H_5O_2Na$; PM = 122,1)
   $DO_t = 16\ (2x7 + 5/2 + 1/2 - 2)\ /122,1 = 1,96\ mgO_2/mg.$

   Obs: para efeito do teste ora descrito, considerar a oxidação do nitrogênio a nitrato (NO_3).

E.1.1.5. TESTE DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA PELA MEDIDA DO DECAIMENTO DO CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO-COD

Data da revisão: 01/88

1. OBJETIVO

Avaliar a biodegradabilidade imediata (3.1) de substâncias orgânicas hidrossolúveis e não-voláteis sob as condições do teste, com metodologia analítica que permita a determinação da biodegradabilidade total (3.2).

2. FUNDAMENTO

Uma determinada substância orgânica é submetida, como única fonte de carbono e de energia, à metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, numa solução mineral definida. O grau de decaimento da concentração de carbono orgânico dissolvido, COD (3.3), medido de maneira adequada, informará se a substância é biodegradável ou biorresistente, num dado período de tempo de incubação. Esta metodologia analítica permite avaliar a biodegradação total (3.2).
São realizados ensaios-controle, de modo a excluir decaimentos de COD devido à volatilização/adsorção (4.4.5) e de modo a detectar possíveis efeitos tóxicos da substância testada sobre os microrganismos (4.4.7).

3. DEFINIÇÕES

3.1. Biodegradabilidade imediata

É a propriedade de uma substância orgânica para ser metabolizada, isto é, destruída por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente, num teste simples, sob condições as mais similares possíveis às da natureza, e que limitem as oportunidades de ocorrer seleção e adaptação microbiana. Assume-se que as substâncias que apresentam resultados positivos frente a este teste serão degradadas de maneira mais rápida e mais completa no meio ambiente natural.

3.2. Biodegradação total

É a completa conversão, pela ação microbiana, de uma substância orgânica em sais minerais, CO_2, H_2O, biomassa e metabólitos normais dos microrganismos.

3.3. Carbono orgânico dissolvido (COD)

É um parâmetro químico analítico, determinado através de procedimento especial no qual o meio é ultrafiltrado em membrana de 0,22 micrômetros de diâmetro de poro, ou centrifugado adequadamente (para livrá-lo de partículas, principalmente de células de microrganismos) e o COD do filtrado, ou do sobrenadante, é determinado num analisador de Carbono Orgânico Total ("TOC-Analyser").

3.4. Biodegradação para efeito deste teste

É definida como a porcentagem de remoção, pela ação de microrganismos num determinado período de tempo, da concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) relativa à substância testada (6.2).

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos e equipamentos

4.1.1. Analisador de COD ("TOC-Analyser") com sensibilidade de detecção de 0,5 mg/L de COD na solução nutriente.

4.1.2. Sistema de agitação que acomode erlenmeyeres de 2 litros, termostatizado, ou mantido em câmara termostatizada a 20-25 ºC (ou ar comprimido filtrado).

4.1.3. Centrífuga para 40.000 m/s, refrigerada, ou mantida em câmara refrigerada a 4ºC (ou sistema de ultrafiltração com membrana de 0,22 micrômetros de diâmetro de poro).

4.2. Vidraria

Toda a vidraria deverá ser lavada adequadamente (5.1).

4.2.1. Erlenmeyeres de 2 litros, de boca estreita.

4.2.2. Demais vidrarias normais de laboratório.

4.3. Água

Água destilada ou desionizada, isenta de substâncias tó-

xicas (em particular o cobre) e que não apresente valor de COD superior a 10% daquele que será introduzido pela substância-teste. Cada bateria de testes deverá ser feita com um mesmo lote de água.

4.4. Soluções

4.4.1. Solução-nutriente

É preparada somente no instante inicial dos testes, adicionando-se, para cada 1 litro final de solução a ser usado, 1,0 ml (um mililitro) de cada uma das soluções-estoque descritas no tópico 4.4.2 (soluções 4.4.2.1 a 4.4.2.6), completando-se o volume sempre com água (4.3).

4.4.2. Soluções-estoque

São preparadas utilizando-se água (4.3), reagentes de grau analítico de boa procedência, e estocadas em refrigerador.

4.4.2.1. Solução de fosfato e amônio

KH_2PO_4..... 8,50g
K_2HPO_4.....21,75g
$Na_2HPO_4.2H_2O$.....33,40g
NH_4Cl.....20,00g

Dissolver em água (4.3) e completar para 1,0 litro.

Obs: o pH deve ser de 7,2.

4.4.2.2. Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) a 22,50 g/litro, em água (4.3).

4.4.2.3. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 27,50 g/litro em água (4.3).

4.4.2.4. Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$) a 0,25 g/litro, em água (4.3).

4.4.2.5. Solução de elementos traço

$MnSO_4.4H_2O$.....39,9mg
H_3BO_3.....57,2mg
$ZnSO_4.7H_2O$.....42,8mg
$(NH_4)6Mo_7O_{24}$.....34,7mg
$FeCl_3$.EDTA.....100,0mg

Dissolver em água (4.3) e completar para 1,0 litro.

Obs: Esterilizar a 120ºC, 2atm., por 20 minutos.

4.4.2.6. Solução fonte de vitaminas

Solução de extrato de levedura a 15 mg/100 ml em água (4.3).

4.4.3. Soluções de padrões biodegradáveis

Fazer ensaio com pelo menos uma das seguintes substâncias consideradas como padrões quanto à biodegradabilidade:

1) Glicose ($C_6H_{12}O_6$, peso molecular 180; 0,400gC/g; DO_t de 1,07 mgO_2/mg).
2) Anilina, recém-destilada (C_6H_7N; peso molecular 93,1; 0,773 gC/g; DO_t (NO_3) de 3,09 mgO_2 /mg).
3) Benzoato de sódio ($C_7H_7O_2Na$: peso molecular de 122,1; DO_t de 1,96 mgO_2/mg).

Obs.: DO_t = demanda teórica de oxigênio.

4.4.3.1. Soluções concentradas de padrões biodegradáveis

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).

Preparar soluções a 1,0 g/L em solução nutriente (4.4.1) e determinar a DQO-solúvel das mesmas.

4.4.3.2. Soluções diluídas de padrões biodegradáveis, para os ensaios

No instante inicial dos ensaios (5,2), preparar soluções a 200 mgDQO/L, diluindo quantitativamente a solução 4.4.3.1 em solução nutriente (4.4.1).

4.4.4. Soluções de substâncias a serem testadas

4.4.4.1. Soluções concentradas de substâncias-teste

Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).

Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1,0 g/L, em solução nutriente (4.4.1) e determinar a DQO-solúvel das mesmas.

Para substâncias-teste menos solúveis, preparar soluções o mais concentradas possível, sempre em solução nutriente (4.4.1).

4.4.4.2. Soluções diluídas de substâncias-teste:
No instante inicial dos ensaios (5.2) preparar soluções a 20 mgCOD/L, diluindo quantitativamente as soluções 4.4.4.1 em solução-nutriente (4.4.1).

4.4.5. Soluções para ensaios estéreis, para controle de volatilização e/ou absorção, das substâncias-teste

Para o controle da possibilidade de perdas da substância ensaiada por processos outros que não o da biodegradação, serão feitos ensaios com as substâncias-teste dissolvidas em água (4.3), isto é, sem a presença dos nutrientes. Além disto os ensaios não serão inoculados e serão mantidos estéreis pela adição de cloreto mercúrico.

4.4.5.1. Soluções concentradas de substâncias-teste em água
Serão preparadas somente no dia do uso (não estocar).
Preparar soluções, de cada substância a ser testada, a 1g/L em água (4.3), e determinar a concentração de COD das mesmas.

4.4.5.2. Soluções diluídas para os ensaios estéreis
No instante inicial dos ensaios (5.2) preparar soluções substâncias-teste a 20 mgCOD/L, pela diluição quantitativa da solução 4.4.4.1, em água (4.3 não adicionar nutrientes). Adicionar 5ml/L de solução esterilizadora (4.4.6).
Não inocular quando dos ensaios (5.3).

4.4.6. Solução esterilizadora
Cloreto mercúrico ($HgCl_2$) a 1% em água (4.3).
Obs: ter cuidados especiais com a preparação, estocagem e manuseio desta solução e de suas derivações por tratar-se de material tóxico.

4.4.7. Solução para ensaio de inibição para as substâncias-teste:

De forma a verificar se a substância teste tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos do inóculo, no instante inicial dos ensaios (5.2) preparar soluções mistas, diluindo quantitativamente as soluções 4.4.4.1 (padrão biodegradável) e 4.4.4.2 (substância-teste a 20 mgCOD/L cada (portanto 40 mgCOD/L totais) em solução-nutriente (4.4.1).

4.5. Inóculo

Para a inoculação dos frascos de ensaio (5.4) pode-se utilizar qualquer uma das três fontes de microrganismos descritas em seguida, ou uma mistura das mesmas.

OBS: é imprescindível que as amostras de inóculo apresentem contagens de microrganismos de, no mínimo, 100.000 colônias por mililitro, em agar padrão.

4.5.1. Esgoto doméstico ou efluente de estação de tratamento de esgotos domésticos

Coletar cerca de 500ml de esgoto, ou de efluente, e passar por papel de filtro grosso (para retirar as partículas grosseiras), desprezando os primeiros 200ml filtrados. Manter o restante do filtrado sob aerobiose até o início dos ensaios, o que não deve exceder 6 horas após a coleta das amostras de inóculo.

4.5.2. Microrganismos de solo

Pesar 100g de solo fértil (com baixo teor de argila e de matéria orgânica) e suspender em 1 litro de solução-nutriente (4.4.1), homogeneizar bem e deixar em repouso por 30 minutos para a decantação. Passar o sobrenadante através de papel de filtro grosso, descartando os primeiros 200ml. Manter o restante do filtrado sob aerobiose até o início dos ensaios, o qual não deve exceder a 6 horas após o preparo do inóculo.

4.5.3. Microrganismos de águas superficiais naturais

Utilizar, de preferência, amostra composta. Para tanto, escolher um local apropriado do rio, lago ou represa do qual se queira testar a água quanto ao seu potencial de biodegradar a substância-teste e coletar cerca de 500ml de amostra, de 30 em 30 minutos por, no mínimo, 2 horas. Misturá-las, mantendo sempre sob aerobiose e em seguida, proceder conforme descrito para as amostras de esgoto (4.5.1).

5. PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

5.1. Preparação de vidraria

Toda a vidraria será lavada com solução sulfocrômica recém-preparada, enxaguada exaustivamente, e relavada com solução de ácido clorídrico em etanol (100ml de HCl 5N + 900ml de etanol). Enxaguar exaustivamente com água comum e com água destilada (4.3), de forma a livrar a vidraria de traços de carbono orgânico solúvel e de materiais tóxicos.

5.2. Preparação das soluções para os ensaios

Preparar o volume necessário da solução-nutriente (4.4.1) para a realização de toda a bateria de teste (5.3) e 3 litros de cada uma das soluções descritas nos tópicos 4.4.3.2, 4.4.4.2, 4.4.5 e 4.4.7.

5.3. Preparação dos frascos para os ensaios

Os ensaios deverão ser feitos em duplicata para cada substância a ser testada, bem como para os padrões, para os controles, para os ensaios de inibição e para o ensaio em branco.

Para tanto, distribuir 900ml de cada uma das soluções descritas no tópico 5.2, bem como da solução nutriente

(4.4.1, branco) em erlenmeyeres de 2 litros, preparando a seguinte bateria de teste:

Frascos

1. (a,b) Branco (solução 4.4.1 sem adições). Inocular (5.4).
2. (a,b) Padrão biodegradável a 20 mgCOD/L. (Solução 4.4.3.2). Inocular (5.4).
3. (a,b) Substância-teste 1, a 20 mgCOD/L. (Solução 4.4.4.2). Inocular (5.4).
4. (a,b) Controle estéril da substância-teste 1, a 20 mgCOD/L. (Solução 4.4.5). Não inocular (5.4).
5. (a,b) Ensaio de inibição para a substância-teste 1. (Solução 4.4.7). Inocular (5.4).
   (... e assim por diante, para outras substâncias-teste)

5.4. Inoculação

Homogeneizar bem o inóculo (4.5) e adicionar 0,5ml a cada frasco (0,5 ml/L), excetuando os frascos de controles estéreis (frasco 4, no exemplo).

5.5. Controle da evaporação por gravimetria

No dia inicial de cada bateria de testes, fazer as coletas de amostras (5.7) e, então, pesar cada frasco, com precisão de 1,0g, anotando o peso em uma tabela de controle.

A partir da segunda coleta de amostras, pesar cada frasco antes de efetuar a retirada da amostra e caso exista diferença de peso em relação aos valores esperados pela tabela, corrígi-la pela adição de água (4.3). Então, fazer a retirada de amostras e repesar cada frasco, anotando o novo peso na tabela de controle.

5.6. Incubação dos frascos

Cobrir a boca das frascos com folha de alumínio, de maneira frouxa, mas de forma a impedir entrada de materiais

particulados do ar (os frascos não podem ser tampados com algodão pois pode haver liberação de COD para o meio, e estes ensaios não exigem proteção das soluções contra contaminações microbianas), e incubá-los em agitador rotatório (100-150 rpm), ou sob aeração com ar comprimido (50-100 ml/min), a 20-25 ºC, na ausência de luz. O ar ambiente (ou o ar comprimido) não poderá conter gases tóxicos e/ou que possam contaminar os meios nutrientes com COD.

5.7. Coleta e preservação de amostras e análises de COD

Obs.: Para os controles estéreis, que contêm $HgCl_2$, fazer coletas apenas nos dias: o (inicial), 14 e 28. Processar essas amostras da mesma forma usada para as demais, mas com maiores precauções e rotulá-las com a observação: " CUIDADO: TÓXICO ".

Diariamente, ou de 2 em 2 dias, para cada frasco, a partir do instante inicial dos testes até o 28º dia de ensaio, e observando a correção da evaporação (5.5), coletar apenas o volume necessário de amostra, ultrafiltrar em membrana de 0,22 um, ou centrifugar a, no mínimo, 40.000 m/s (4.000g), sob controle de temperatura (máxima 15ºC), por 20 minutos. Transferir o filtrado (ou decantar um pequeno volume do sobrenadante da centrifugação, porém suficiente para fazer várias análises de COD), para um recipiente adequado e devidamente rotulado e, imediatamente, congelá-lo até à realização das análises, as quais deverão ser feitas de uma única vez. (As amostras terão que ser mantidas congeladas durante todo o período de estocagem, caso contrário terão que ser analisadas imediatamente após a preparação).
Para a coleção de amostras de cada frasco, as análises são feitas a partir da amostra do dia inicial de teste e descontinuadas quando for claramente estabelecido o platô final de decaimento do COD).

5.8. Tempo total de duração das incubações

O tempo máximo de incubação, para efeito deste teste, é de 28 dias.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Resultados brutos

Os resultados (mgCOD/L) das análises de cada amostra, de cada frasco, para cada bateria de testes, serão cuidadosamente anotados em formulários apropriados, os quais conterão, além de todos os dados relativos ao teste feito, o nome e endereço da entidade executora e os nomes, números de registro em conselhos profissionais e assinaturas do analista e de seu superior hierárquico. Cópias desses dados brutos serão, necessariamente, anexadas a todas documentações que visarem processos para registros de produtos pois os mesmos ficarão sujeitos à comparação com ensaios realizados, sob as mesmas condições, por laboratórios oficiais de referência.

6.2. Cálculo das porcentagens de degradação

Calcular a porcentagem de degradação obtida para cada frasco individual ensaiado, utilizando a fórmula:

$$\%D_t = 100. (Ci - Cf)/Ci$$

onde:

$\%D_t$ = % de degradação no instante t (dias)
Ci = Concentração inicial = Co - Bo
Cf = Concentração final = Cf - Bt

e

Co = Concentração de COD (mg/L) do frasco com substância-padrão ou teste, no instante inicial do teste.
Ct = Concentração de COD (mg/L) do frasco com substância padrão ou teste, no instante t (dias).
Bo = Concentração de COD (mg/L) do ensaio em branco no instante inicial do teste.
Bt = Concentração de COD (mg/L) do ensaio em branco no instante t (dias).

6.3. Gráficos

Lançar os resultados das porcentagens de degradação em função do tempo de degradação, em dias, construindo gráficos para cada ensaio realizado, e para a média dos ensaios em duplicata.
Anexar cópias de tais gráficos aos documentos dos processos.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Testes com resultados altos de decaimento do COD

Estes testes serão considerados válidos e, portanto, as substâncias ensaiadas serão consideradas FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS, se:

a. Nos ensaios estéreis, para a substância-teste (frasco 4) não ocorrerem perdas do COD superiores a 30% no mesmo intervalo de tempo em que forem verificados 70% de decaimento do COD dos ensaios normais com tal substância (frasco 3).
Caso contrário, assume-se que estão ocorrendo perdas de COD por processos outros que não o de biodegradação e que deverão ser providenciados testes sob condições que permitam ensaios de substâncias voláteis, como os testes em frascos fechados, TESTE E.1.1.3 e E.1.1.4 desta série.

b. Nos ensaios normais com a substância-teste (frasco 3) for atingido um mínimo de 70% de decaimento do COD, para a média dos ensaios em duplicata, num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem verificados 10% de remoção do COD, restringindo-se o tempo total de teste a 28 dias (5.8).

7.2. Interpretação dos testes com resultados baixos de decaimento de COD:

7.2.1. Os testes com baixos resultados de decaimento de COD serão considerados válidos e, portanto, a substância-teste será considerada biorresistente, se:

a. Os ensaios com os padrões biodegradáveis (frasco 2) apresentarem um mínimo de 70% de decaimento do COD num intervalo de 10 dias contados a partir daquele em que forem atingidos 10% de degradação, restringindo-se a duração total do teste a 28 dias.

b. Os ensaios de efeitos inibidores (frasco 5) apresentarem um mínimo de 70% de decaimento de COD relativo ao padrão biodegradável adicionado (isto é, 35% do COD total relativo às duas substâncias adicionadas), num intervalo de 10 dias, conforme descrito para o tópico 7.2.1.a.

7.2.2. Os testes com baixos resultados de decaimento de COD não serão considerados válidos para se concluir sobre a biodegradabilidade da substância-teste se:

a. Nos ensaios com os padrões biodegradáveis não forem satisfeitas as oxigências do tópico 7.2.1.a. Neste caso considera-se que o inóculo utilizado não estava ativo e a bateria de testes tem que ser refeita utilizando-se novos inóculos.

b. Nos ensaios com os padrões biodegradáveis forem satisfeitos as exigências do tópico 7.2.1.a, mas nos ensaios de inibição não forem satisfeitas as exigências do tópico 7.2.1.b.
Neste caso deve ser assumido que a substância testada tem efeitos tóxicos sobre os microrganismos nas concentrações utilizadas e será necessário um outro tipo de teste que permita o uso de concentrações mais baixas, como o TESTE E.1.1.4 desta série (teste de decaimento do oxigênio dissolvido)

8. CLASSIFICAÇÃO

8.1. Substâncias "facilmente biodegradáveis"

A substância-teste que apresentar um mínimo de 70% de degradação, como média dos ensaios em duplicata, obedecidos os critérios de interpretação (7), será classificada como FACILMENTE BIODEGRADÁVEL e receberá o índice mais favorável para a tabela de classificação ecotoxicológica a ser adotada. Além disto, ficará excluída da necessidade de ser submetida a outros testes de biodegradabilidade, para efeito desta classificação.

8.2. Substâncias não aprovadas neste teste

As substâncias que não atingirem o mínimo de 70% de degradação, como média para os ensaios em duplicata, obedecidos os critérios de interpretação (7) serão classificadas com **NÃO** FACILMENTE BIODEGRADÁVEIS e receberão o índice mais desfavorável para tabela de classificação ecotoxicológica. A restrição de uso e descarte ficará na dependência dos índices obtidos pela substância com relação aos outros parâmetros da classificação ecotoxicológica.

9. LITERATURA BÁSICA

9.1. Approved code of practice - Methods for the determination of ecotoxicity - Notification of new substances regulations Health and Safety Commission, Secretary of State for Employment. England. 1982.

9.2. KLEIN A.W. OECD fate and mobility tests methods. In: HUTZINGER, O.ed. The Handbook of environmental chemistry. vol 2, part C - Reactions and processes. Spring Verlag, New York. 1985.

9.3. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Modified OECD screening test with DOC analysis. OECD, Paris, 1979.

9.4. ISO. International Organization for Standardization. Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic

biodegradability of organic materials - Method by analysis of dissolved organic carbon - COD. ISO/TC 147/SC 5.

9.5. LEROY, O. Chemicals and the environment: the ECC opts for a preventive policy. Europian Study Service, Rixensart, Belgium, 1987.

E.1.2. TESTE DA BIODEGRADABILIDADE DOS SOLOS

E.1.2. TESTE DA BIODEGRADABILIDADE EM SOLOS

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Determinar em laboratório, através de técnicas radiométricas, a biodegradação de substâncias-teste no solo.

2. FUNDAMENTOS

O teste se baseia nas alterações metabólicas que um composto químico sofre pela ação microbiana do solo, levando à mineralização do composto com evolução de $^{14}CO_2$, que é captado em armadilha apropriada.

3. DEFINIÇÃO

- Substâncias-teste radioativas: compostos marcados no ^{14}C.
- Ci (curie) = unidade padrão de medida radioativa.
- uCi (microCurie); mCi (miliCurie).
- Bq (Becquerel) = unidade padrão de medida radioativa: 1 Bq = 1 dps.
- dpm = desintegrações por minuto da amostra radioativa, sendo 1uCi = $2,2 \times 10^6$ dpm.
- dps = desintegrações por segundo.
- Mineralização: degradação do composto a CO_2, H_2O e outros compostos inorgânicos.
- Meia Vida: tempo decorrido no qual a metade da concentração original desaparece do solo.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Espectrômetro de cintilação em líquido, com correção de "quench" pelo método da razão de canais com fonte externa.

4.2. Frascos de cintilador:

- Jarros de vidro de boca larga de 250ml e tamoa rosqueada, para as amostras de solo.

4.3. Soluções reagentes:

- Substância-teste radioativa, uniformemente marcada em todos os carbonos do anel, de pureza radio-química maior do que 99% e a correspondente substância não-radioativa.
- PPO, POPOP, tolueno, dioxano, metanol, para preparo de soluções cintiladoras.
- Entanolamina ou NaOH para armadilhas de capturas do CO_2.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Padronização

5.1.1. Solos agrícolas recém-coletados.

5.1.2. Dois tipos de solos com diferentes propriedades físico-químicas, principalmente um rico e um pobre em matéria orgânica.

5.1.3. Secar os solos à temperatura ambiente e passar por peneira de 2mm.

5.1.4. Distribuir amostras de 10g nos jarros de solo.

5.1.5. Temperatura do teste constante, de 20 a 30ºC.

5.2. Descrição das condições experimentais

Reativar os solos pela adição de água equivalente a 2/3 da capacidade de campo. Uma semana após, adicionar a substância radioativa em solução contendo a substância não-radioativa na concentração apropriada (1 ug/g de solo, 10 ug/g solo) e em concentrações mais elevadas (100 ug/g, 500 ug/g) visando o problema de acúmulo no solo.

No mesmo jarro de solo, colocar um frasco de cintilador com 1,0 ml de etanolamina ou 1,0 ml de solução 2N de NaOH. Realizar 5 repetições por tipo de solo, e por concentração da substância-teste.

5.3. Execução

5.3.1. Durante 28 dias, e em intervalos semanais, retirada do frasco de cintilador com etanolamina e substituição com frasco de etanolamina recém-colocada.

5.3.2. Preencher o frasco de etanolamina retirado do jarro de solo com solução cintiladora.

5.3.3. Quantificar no cintilador de amostra líquida o $^{14}CO_2$ evoluído; contagem durante 10 minutos.

6. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

Média das contagens (5 por solo e por concentração de substância-teste) e apresentação em porcentagens de $^{14}CO_2$ evoluído, relacionando-se a quantidade de dpm's adicionada ao solo com a quantidade captada pela etanolamina nas medidas semanais.
Porcentagem acumulativa total:

$$\% \; T_0 + T_7 + T_{14} + T_{21} + T_{28} \text{ dias.}$$

7. INTERPRETAÇÃO

Resultados quantitativos mostram maior ou menor evolução da substância-teste a CO_2 e, consequentemente, quanto maior a % de evolução, maior a taxa de mineralização, indicando menor persistência do composto no meio ambiente.

8. CLASSIFICAÇÃO DOS PRODUTOS QUANTO À PERSISTÊNCIA

Quando a porcentagem de evolução do $^{14}CO_2$ em 28 dias for de:

0 _____ 1% - Persistência alta (meia vida acima de 180 dias)

1 _____ 10% - Persistência média (meia vida maior do que 90 dias e menor do que 180 dias).

10 _____ 25% - Persistência reduzida (meia vida maior do que 30 dias e menor do que 90 dias).

acima de 25% - Não-persistente (meia vida menor do que 30 dias)

9. CONTROLE DE QUALIDADE

Reprodutividade: alta.
Sensibilidade: ug ^{14}C/g solo.

10. LITERATURA BÁSICA

10.1. - KOUFMANN, D.D. Approaches to investigating soil degradation and dissipation of pesticides. In: WITT, J.M & GILLET, J.W. Eds. Terrestrial microcosms and Environmental Chemistry. 1977. p. 41-53.

10.2. - HILL, I.R. & ARNOLD, D.J. Transformation of pesticides in the environment. The experimental approach. In: HILL, J.R. & WRIGHT, S.J.L. Eds. Pesticide Microbiology. Microbiological aspects of pesticide behavior in the environment. Academic Press, London & N. York, 1978. p. 203-345.

10.3. - PRAMER, D. & BARTHA, R. Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. Environ. Letters, 2: 217-224, 1972.

10.4. - MUSUMECI, M.R. & RUEGG, E.F. Degradação do aldrin em amostras de solos do Cerrado. Arq. Inst. Biol., 48: 39-44. 1981.

E.2. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA MOBILIDADE

E.2. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA MOBILIDADE

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Verificar a mobilidade de uma substância-teste em amostras de solos, em condições de laboratório, utilizando-se cromatografia em camada delgada de solos.

2. FUNDAMENTOS

O teste baseia-se na capacidade de arraste de uma substância-teste ^{14}C em camadas de solos, desenvolvido em água, seguindo os princípios da técnica de cromatografia em camada delgada, sendo o solo a fase estacionária do sistema.

3. DEFINIÇÃO

R_F (Relação de Frentes): Relação entre a distância percorrida pela substância-teste na cromatoplaca de solo e a frente do solvente (H_2O).

Auto-Radiografia: impressão de um filme de Raios-X como consequência de sua exposição a um composto radioativo.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

- Placas de vidro (10x10cm) recobertas com o solo a ser ensaiado.
- Substâncias-teste marcadas com ^{14}C.
- Filmes de Raios-X.
- Solução reveladora para filmes de Raios-X.
- Fixador.
- Câmara escura.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Padronização

Utilizar a substância a ser analisada, marcada com radiocarbono.

5.2. Descrição das condições experimentais

Utilizar 3 amostras de solos com diferentes propriedades físico-químicas (pH, teor de matéria orgânica, % areia, % argila, CTC).

5.3. Execução do teste

- Aplicar na origem das cromatoplacas 10ul de uma solução contendo 0,1 ug/ml de substância não radioativa mais o composto correspondente marcado com ^{14}C.
- A placa, em posição horizontal, é percolada com água até uma distância delimitada.
- Após o desenvolvimento, a placa é seca ao ar livre e coberta com filme de Raios-X, no escuro.
- Deixar a placa em exposição ao filme durante aproximadamente 10 dias, se a atividade do composto radioativo for de 0,1 uCi/ml, ou 3 dias se a atividade empregada for maior do que 1,0 uCi/ml.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Será expresso em termos de R_F.

7. INTERPRETAÇÃO

As substâncias terão maior mobilidade nos solos quanto maior for o valor de R_F.

8. CLASSIFICAÇÃO

CLASSE	R_F	MOBILIDADE
1	0,00-0,09	imóveis
2	0,10-0,34	baixa mobilidade
3	0,35-0,64	mobilidade intermediária
4	0,65-0,89	mobilidade elevada
5	0,90-1,00	totalmente móvel

9. CONTROLE DE QUALIDADE

A cromatografia em camada delgada de solos é de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade dentro das condições específicas.

10. LITERATURA BÁSICA

10.1. - HELLING, C. Pesticides Mobility in Soils. Soil Sci.Soc Amer. Proc., 35: 732-747, 1971.

10.2. - LUCHINI, L.C.; HIRATA, R.; RUEGG, E.F. Sorção e mobilidade de pesticidas associados e propriedades físico-químicas de solos de cerrados do Estado de São Paulo. Pesq. Agropec. bras., 19(2): 157-162, 1984.

8. CLASSIFICAÇÃO

CLASSE	R_f	MOBILIDADE
1	0,00-0,05	imóveis
2	0,10-0,34	baixa mobilidade
3	0,35-0,64	mobilidade intermediária
4	0,65-0,89	mobilidade elevada
5	0,90-1,00	totalmente móvel

9. CONTROLE DE QUALIDADE

A cromatografia em camada delgada de sílica é de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade dentro das condições específicas.

10. LITERATURA BÁSICA

10.1. - HEILING, C. Pesticides Mobility in Soils. Soil Sci.Soc Amer. Proc., 35:729-732, 1971.

10.2. - LUCHINI, L.C.; HIRATA, R.; RUEGG, E.F. Sorção e mobilidade de pesticidas associados a propriedades físico-químicas de solos de cerrados do Estado de São Paulo. Pesq. Agropec. bras., 19(2):157-162, 1984.

E.3. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO/DESSORÇÃO

E.3. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO/DESSORÇÃO

Data da Revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Verificar a capacidade de adsorção e dessorção de substâncias-teste em solos e, portanto, seu potencial de lixiviação, escoamento superficial, assim como a translocação para as plantas.

2. FUNDAMENTO

O teste baseia-se nas isotermas de adsorção de Freundlich e tem sido aceito como modelo preferido para estudos de adsorção ou dessorção de uma substância em solos, a partir de soluções diluídas.

3. DEFINIÇÃO

Isotermas de Freundlich

$$\text{Log } \frac{X}{M} = \text{Log } K + 1/n \text{ Log } C_e$$

onde:

X = quantidade de substância adsorvida (mg).

M = peso do solo (g).

C_e = concentração da substância na solução em equilíbrio com o solo (ug/ml).

K = quantidade adsorvida ou remanescente no solo para uma concentração de equilíbrio igual a 1ug/ml.

1/n = grau de linearidade de adsorção ou dessorção, isto é, reflete o grau em que a adsorção depende da concentração da substância-teste no equilíbrio com o solo.

Os valores de K e 1/n são parâmetros de regressão característicos para cada sistema solo-substância estudado.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

- Espectrômetro de cintilação em líquido
- Centrífuga
- Agitador mecânico de mesa
- Substâncias-teste marcadas com radiocarbono.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Padronização

Utilizar a substância-teste a ser analisada marcada com radiocarbono.

5.2. Descrição das condições experimentais

O teste deve ser realizado utilizando-se, no mínimo, 5 soluções de concentrações diferentes de cada substância-teste para cada solo, na ordem de 0,1ug/ml, 1 ug/ml, 5 ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml.

Deve-se adicionar às respectivas soluções a substância marcada com radiocarbono, de forma a se obter uma atividade aproximada de 0,01uCi/ml.

5.3. Execução do teste

5.3.1. Adsorção

Adicionar 10ml da solução contendo a substância não marcada mais a substância radiomarcada a 1g de solo, em tubos de centrífuga. A solução deve ser feita em 0,01M de $CaCl_2$, para facilitar a centrifugação.

Agitar mecanicamente o conjunto solo/solução por 24 horas.

Centrifugar o sistema solo/solução a 15000 rpm por aproximadamente 20 minutos.

Retirar uma alíquota do sobrenadante para leitura em espectrômetro de cintilação em líquido, durante 10 minutos, e conseqüente quantificação da substância adsorvida. O resultado será obtido pela diferença entre a concentração adicionada e a concentração final.

5.3.2. Dessorção

Decantar a solução sobrenadante restante do ensaio anterior.

Adicionar ao tubo de centrífuga contendo solo-substância solução aquosa 0,01M de $CaCl_2$, sem a substância-teste.

Agitar mecanicamente por 24 horas.

Centrifugar.

Retirar uma alíquota do sobrenadante para quantificação da substância dissolvida após leitura em espectrômetro de cintilação.

6. RESULTADOS

Os resultados serão obtidos através das isotermas de adsorção e dessorção da substância pelos solos, em função das várias concentrações utilizadas. Os valores da constante K serão expressos em ug/g.

7. INTERPRETAÇÃO

Quanto maior o valor da constante K, maior a capacidade de adsorção da substância pelo solo.

8. CLASSIFICAÇÃO

VALOR DE K	ADSORÇÃO
0 - 24	pequena adsorção
25 - 49	média adsorção
50 - 149	grande adsorção
150	elevada adsorção

9. CONTROLE DE QUALIDADE

O teste é de grande reprodutibilidade.

10. LITERATURA BÁSICA

10.1 - BAILEY, G.W. & WHITE, J.L. Factors influencing the adsorption, desorpitron and movement of pesticides in soil. Residue Rev., 32: 30-83, 1970.

10.2 - FELSOT, A. & DAHAM, P.A. Sorption of organophosphorus and carbamate insecticide by soil. J. Agric. Food Chem, 27 (3): 557-63, 1979.

10.3 - MARTIN, M.J.S.: PLAZA, S.J.: CAMANZO, M.S. Adsorcíon de molinato por esmetitas. II. Estudiocinético, isotermas de adsorcíon. Agrochimica, 29(1): 22-29, 1985.

PARTE F

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA ANIMAIS SUPERIORES (MAMÍFEROS) E DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS

Parte F - INFORMAÇÕES SOBRE A TOXICIDADE DA SUBSTÂNCIA-TESTE
- MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

DEFINIÇÕES GERAIS

Dose - é a quantidade administrada da substância-teste.
É expressa em peso (g ou mg), ou em peso da substância por unidade de peso do animal (ex: mg/Kg), ou como o peso da substância por peso de alimento, de água de beber (ex: mg/Kg ou mg/L).

Dose-sem-efeito - é a dose máxima usada em um teste que não produz efeitos adversos.

Dose-resposta - é a relação entre a dose administrada e a proporção de uma amostra populacional que mostra um efeito definido.

Dose-efeito - é a relação entre a dose administrada e a magnitude de um efeito biológico observado em um indivíduo.

DL_{50} (dose letal 50%) - é definida como a expressão estatística de uma única dose da substância, em mg por Kg de peso animal, capaz de matar 50% da população de animais em teste dentro de até 14 dias subsequentes à administração da substância.

CL_{50} (concentração letal 50%) - é definida como a concentração atmosférica da substância, obtida estatisticamente, a qual acredita-se ser capaz de causar a morte de 50% dos animais em teste durante a exposição por um período fixado de tempo, ou, dentro de um período definido após a exposição.

F.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL

F.1.1. TOXICIDADE ORAL A CURTO PRAZO PARA RATOS

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Conhecer o potencial de letalidade de substância-teste através da determinação da DL_{50} e do perfil da curva dose/resposta de letalidade. Além disto, este permite estabelecer as doses para estudos a médio e longo prazo, bem como fornecer informações sobre o modo de ação tóxica da substância.

2. FUNDAMENTO

O protocolo básico consiste no tratamento de grupos de animais com doses matematicamente relacionadas da substância, para se determinar a dose que mata 50% dos animais de cada grupo e a função dose-resposta. As mortes ocorridas dentro das primeiras 24 horas após tratamento são devidas, provavelmente, ao efeito tóxico das substâncias, seja ele direto ou indireto. Sinais que se manifestem após o período de 24 horas do tratamento podem dar alguma indicação do efeito que a substância pode ter em concentrações mais baixas, quando administradas por períodos de tempo mais longos.

3. DEFINIÇÕES

3.1. DL_{50} - ver definições gerais da Parte F.

3.2. Dose-resposta - ver definições gerais da Parte F.

3.3. Toxicidade oral a curto prazo - é aquela que se manifesta por efeitos adversos ocorridos dentro de curto espaço de tempo após a administração de uma única dose oral ou de doses orais múltiplas de uma substância. No caso de doses múltiplas, devem ser todas administradas no intervalo máximo de 24 horas.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação - Usar ratos, machos e fêmeas, adultos e de raças perfeitamente definidas.
As fêmeas devem ser nulíparas e não prenhes.
Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não tratadas e saudáveis. Da mesma forma, não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter história recente de exposição a anti-helmínticos ou tratamento com qualquer outra substância.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais de experimentação - Os animais devem ser climatizados às condições de laboratório por pelo menos 5 dias antes do experimento e distribuídos ao caso entre os grupos de teste.
O número de animais-teste usado deve ser suficiente para análise estatística dos dados e depende do método escolhido para cálculo de DL_{50}. Normalmente 10 ratos (5 de cada sexo) são usados por grupo/dose.
A temperatura da sala de experimentação deve ser 22 $\pm$ 3°C e a umidade relativa de 30 a 70%. Os animais devem ser agrupados em gaiolas, por sexo sem que o número excessivo interfira na clara observação de cada animal. As propriedades biológicas da substância-teste ou os efeitos tóxicos (ex: morbidade, excitabilidade) podem indicar o uso de gaiolas individuais. Aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e outro de 12 horas no escuro. Dietas convencionais são indicadas com suplementação de água "ad libitum".

5.2. Doses
As doses são escolhidas de forma a fornecer dados para o cálculo da DL_{50} e para obter informações sobre a inclinação da curva dose-resposta. Pelo menos quatro doses devem ser selecionadas em progressão logarítmica. A dose inicial deve ser tal que nenhum efeito se manifeste nos animais. Nos grupos subsequentes de animais, a dose deve ser aumentada por um múltiplo constante, até que a dose do

composto administrado seja suficientemente alta, de forma a levar à morte todos os animais do grupo. Nestas condições, os dados obtidos são registrados graficamente, de forma a se obter uma curva-resposta e, a partir da qual se calcula a DL_{50}.

5.3. Execução - O peso dos animais deve ser tomado, e a quantidade de substância a ser administrada calculada, considerando a dose desejada e o peso dos animais. A via de administração escolhida é oral e o composto deve ser administrado por tubagem gástrica (em vez de misturado à dieta) a animais em jejum, dissolvido em veículo próprio, o qual não deve ser tóxico ao animal. Quando a substância for veiculada em substância de toxicidade desconhecida um grupo-controle deve ser ensaiado para estudo da toxicidade do veículo.

Quando necessário, a substância-teste é dissolvida em óleo ou suspendida em veículo apropriado. Recomenda-se, sempre que possível, o uso de solução aquosa, seguido de solução oleosa (óleo de milho) e finalmente soluções em outros veículos.

O volume máximo de líquido que pode ser administrado depende do tamanho do animal teste. Assim, para roedores, o volume não deve exceder 1,0 ml/100g de peso corporal, exceto no caso de soluções aquosas, onde é possível admitir até 2 ml/100g de peso corporal. Deve-se ajustar a concentração da solução-teste para que se possa administrar sempre o mesmo volume, qualquer que seja a dose-teste.

Uma observação clínica deve ser realizada, incluindo modificações na pele e pêlos, olhos e mucosas, alterações circulatórias, respiratórias e do sistema nervoso central e periférico.

Atenção particular deve ser dada à observação de tumores, convulsões, salivação, diarréia, letargia, sono e coma. O tempo da morte deve ser anotado com a melhor precisão possível.

Todos os animais submetidos ao teste, isto é, os que morreram dentro do período de observação mais aqueles sobreviventes, devem ser autopsiados. A autópsia deve incluir exame macro e microscópico de todos os órgãos. Se a morte

for quase instantânea e devido a um efeito farmacológico ou físico, isto é, hemorragia gastro-intestinal ou insuficiência respiratória aguda, o exame histopatológico detalhado de todos os órgãos é dispensável.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em tabelas, mostrando, para cada grupo testado, o número de animais no início do teste, o tempo de morte de cada animal individualmente para cada dose usada, o número de animais que apresentam outros sinais de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e o resultado da necrópsia.

A DL_{50} deve ser determinada por qualquer um dos métodos referidos no item 8.

Deve ser apresentado um relatório contendo:

a - raça dos animais;

b - peso corporal dos animais;

c - resposta tóxica para cada sexo e dose e número de animais expostos;

d - tempo de morte durante o estudo, ou se os animais sobreviveram até o término;

e - valor da DL_{50}, para cada sexo, determinada em até 14 dias;

f - 95% de intervalo de confiança para DL_{50};

g - curva dose-resposta para mortalidade, com inclinação;

h - descrição detalhada do estudo anatomopatológico.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Este método permite estimar a toxicidade de uma sustância. Os valores de DL_{50} são utilizados para a classificação toxicológica da substância-teste.

8. LITERATURA BÁSICA

8.01. ARMITAGE, P. & ALLEN , I.J. Hyg., 48: 298-322,1950.

8.02. BLISS, C.I. Quart. J. Pharm. Pharmacol., 11: 192-216 1968.

8.03. CONNEY, A.H.; SCHNEIDERMAN, K.; JACOBSON, M. & KUNTZMAN, R. Ann. N.Y. Acad. Sci., 123: 28-109, 1965.

8.04 EPA. Environmental Protection Agency. Toxic. Substances Control Act Test: Guidelines. Federal Register, 50 (188), 1985.

8.05. FINNEY, D. G. Probit Analysis. 3 rd. ed. London, Cambridge University Press, 1971.

8.06. FOUNTS, J. R. & HART, L. G. Ann. N. Y. Acad. Sci., 123: 245-251, 1965.

8.07. JONDORF, W. B.;MAICKEL, R. P. & BRODIE, B. B. Biochem. Pharmacol., 1: 352-354, 1959.

8.08. LECLAIR, J. M. & WILLARD, J. W. Guide for preparation of submissions on tolerances for incidental contaminants and agricultural chemicals in food. Ottawa, Canada, Food and Drug Directorate, Dept. of national Health and Welfare, 1970.

8.09. LITHFIELD, J. T. & NILCOXON, F. A. J. Pharm. Exp. Ther., 96: 99-113, 1949.

8.10. MC COLLISTER; D. D. Agric. Food Chem., 11(6): 486-91, 1963.

8.11. MILLER, L. C. & TAINTER, M. L. Proc. Soc. Biol. Med. N. Y., 57: 261-264, 1944.

8.12. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1981.

8.13. RUMKE, Chr. L. Some Limitations of animal tests. In: LAURENCE, D. R. & BACHARACH, A. L. ed. Evaluation of drug activities: Pharmacometrics. London, N. Y., Academic Press, Vol. 1, 1964. p. 125-133. 1964.

8.14. SETNIKAR, I. & MAGISTRETTI, M. J. Proc. Eur. Soc. Drug Toxicology, 4: 132-139, 1964.

8.15. THOMPSON, W. Bact. Rev., 11: 115-141, 1947.

8.16. WEIL, C. S. Agric. Food, Chem., 11: 486-491, 1952.

8.17. WEIL, C. S. Biometrics, 8: 249-263, 1952.

F.1.2. TOXICIDADE ORAL A CURTO PRAZO COM DOSES REPETIDAS PARA RATOS (estudos de 28 dias)

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre os efeitos de doses repetidas e indicar a necessidade de estudos a longo prazo. Além disto, permite definir as doses a serem usadas em testes de toxicidade a médio e longo prazo.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos diariamente, durante 28 dias, a doses matematicamente relacionadas da substância-teste.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Dose - ver definições gerais da Parte F.

3.2. Dose-sem efeito - ver definições gerais da Parte F.

3.3. Toxicidade cumulativa - é o efeito adverso de doses repetidas que ocorre como resultado da ação prolongada, ou de concentrações crescentes da substâncias em tecidos susceptíveis.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação

Usar ratos, machos e femeas, de 4 a 6 semanas de idade, de raças perfeitamente definidas. No início do experimento a variação de peso dos animais não deverá exceder 20% do peso médio.

As fêmeas devem ser nulíparas e não prenhes.

Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não tratadas e saudáveis. Da mesma forma, não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter hitória recente de exposição a anti-helmínticos ou tratamento com qualquer outra substância.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais

Pelo menos 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) devem ser usados para cada dose. Além disto, um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) deve ser tratado com a maior dose por 28 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos durante 14 dias após o final do tratamento.

A temperatura da sala de experimentação deve ser de 22 $\pm$ 3°C e a umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artifical aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e outro de 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

Os animais podem ser colocados em gaiolas, em grupos por sexo, ou individualmente. Para grupos, não mais que 5 animais devem ser colocados em cada gaiola.

5.2. Doses

Pelo menos 3 doses e um controle devem ser usados, sendo que os animais do grupo-controle devem receber o mesmo tratamento dos demais grupos, excetuando-se a substância-teste.

A dose mais elevada deve promover efeitos tóxicos, mas não produzir mais do que 10% de mortalidade após uma dose única, sendo as demais doses frações desta. A menor dose não deve produzir evidência de toxicidade.

5.3. Execução

Os animais receberão a substância sete dias por semana, durante 28 dias, na dieta ou na água de beber. Medidas

semanais de consumo alimentar e de água (se for o caso), bem como de peso dos animais, serão efetuadas.

Os sinais de toxicidade devem ser anotados à medida em que sejam observados, incluindo tempo de aparecimento, grau e duração.

Alterações na pele e pêlos, olhos e mucosas, bem como dos sistemas respiratório, circulatório, nervosos central e autônomo, da atividade somatomotora e padrão comportamental devem ser observadas.

Hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem global e diferencial de leucócitos, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas devem ser medidos no final do período de teste.

A seleção de outros testes específicos deverá ser influenciada por observações sobre o modo de ação da substância.

No final do período de testes os animais serão necropsiados e serão descritas as observações de todos os sistemas.

Os seguintes órgãos e tecidos devem ser preservados para análise histopatológica: fígado, rins, baço, adrenais, coração e órgão-alvo, isto é, aqueles que mostrarem alterações macroscópicas ou variações de tamanho.

O exame histopatológico será realizado nos órgãos e tecidos acima referidos, para todos os animais do grupo de controle e do grupo de dose mais elevada. Órgãos-alvo de animais de grupos com doses intermediárias também devem ser examinados.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Todos os resultados observados, quantitativos ou incidentais, devem ser avaliados por método estatístico apropriado, selecionado durante o delineamento experimental.

Os achados de estudos de toxicidade oral com doses repetidas devem ser considerados em termos dos efeitos tóxicos observados e dos achados de necrópsia e da histopatologia. A avaliação incluirá a relação entre a dose da substância-teste e a presença ou ausência, incidência e severidade de anormalida-

des, incluindo alterações clínicas e de comportamento, lesões macroscópicas, identificação de órgãos-alvo, alterações de peso corpóreo, efeitos tóxicos.

O relatório final do teste deve conter:

- raça dos animais;
- dados de resposta toxicológica por sexo e dose e número de animais por dose;
- tempo de morte durante o experimento;
- efeitos tóxicos;
- tempo de observação de cada sinal anormal e sua evolução;
- dados de consumo de alimento ou água e peso corpóreo;
- testes de bioquímica utilizados e resultados relevantes,
- descrição detalhada das alterações macro e microscópicas dos órgãos e tecidos examinados;
- tratamento estatístico dos resultados, quando pertinente.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os estudos com doses orais repetidas fornecem informações sobre os efeitos de exposições orais repetidas à substância. Os resultados podem fornecer informações sobre o modo de ação da substância.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act Test Guidelines. Federal Register, 50(188), 1985.

8.2. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

8.3. WHO. World Health Organization. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Environmental Health Criteria, 6, I, 1978.

F.1.3. TOXICIDADE ORAL A MÉDIO PRAZO PARA RATOS
(estudo de 90 dias)
Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre efeitos adversos causados por exposições repetidas num período de tempo limitado. Permite, também, obter informações sobre: órgãos-alvo, possibilidade de acúmulo, dose-sem-efeito, a qual será usada para selecionar doses para estudo a longo prazo e estabelecimento de critérios de segurança para a exposição humana.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos diariamente, durante 90 dias, a doses de substância-teste escolhidas a partir dos estudos de toxicidade oral a curto prazo com doses repetidas (F.1.2).

3. DEFINIÇÕES

3.1. Toxicidade oral a médio prazo

É o efeito adverso resultante da exposição oral diária a uma substância química durante parte (mais que 10%) do tempo de sobrevida dos animais de experimentação.

3.2. Dose

Ver definições gerais da Parte F.

3.3. Dose-sem-efeito

Ver definições gerais da Parte F.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação

Usar ratos, machos e fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade e de raça perfeitamente definida. As fêmeas devem ser nulí-

paras e não prenhes. No início do experimento o peso dos animais não deve exceder 20% do peso médio. Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não-tratadas e saudáveis. Da mesma forma não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter história recente de exposição a anti-helmínticos ou tratamento com qualquer outra substância.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais

Pelo menos 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) devem ser usados para cada dose. Além disto, um grupo adicional de 20 animais (10 de cada sexo) deve ser tratado com a dose mais elevada durante 90 dias e observado, quanto a reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada dos efeitos tóxicos, durante 28 dias após o final do tratamento.

A temperatura da sala de experimentos deve ser de 22 $\pm$ 3oC e a umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a iluminação for artificial, aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e outro de 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

Os animais devem ser colocados em gaiolas em grupos (não mais de 5 animais por gaiola), por sexo, ou individualmente.

5.2. Doses

Pelo menos três doses e um controle devem ser usados, sendo que os animais do grupo-controle devem receber o mesmo tratamento dos demais grupos, excetuando-se a substância teste.

A dose mais elevada deve promover efeitos tóxicos, mas não produzir um índice de mortalidade que impeça uma avaliação significativa. A menor dose não deve promover evidências de toxicidade.

5.3. Execução

Os animais receberão a substância cinco dias por semana, durante 90 dias, na dieta ou na água de beber. Medidas semanais do consumo alimentar e de água (se for o caso) bem como do peso dos animais, serão efetuadas.

Os sinais de toxicidade devem ser anotados à medida que sejam observados, incluindo tempo de aparecimento, grau e duração. Devem ser observadas alterações na pele e pêlos, olhos e mucosas, dos sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo, da atividade somatomotora e do padrão comportamental.

Exame oftalmológico deve ser realizado antes da exposição e no final do estudo, pelo menos no grupo de dose mais elevada e no controle.

No final do período de teste devem ser executados os seguintes exames: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócito, contagem global e diferencial de leucócitos, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas.

Da mesma forma, no final do período de teste, devem ser avaliados os parâmetros sanguíneos de função hepática.

A seleção de outros testes específicos deverá ser influenciada por observações sobre o modo de ação da substância-teste.

Também no final do teste os animais serão necropsiados e as observações de todos os sistemas descritas.

Os seguintes órgãos e tecidos devem ser preservados para histopatologia: fígado, rins, baço, adrenais, coração e órgãos-alvo, e aqueles que mostrarem alterações macroscópicas ou aumento de tamanho. O exame histopatológico será realizado nos órgãos e tecidos acima mencionados, para todos os animais do grupo-controle e do grupo-experimental que recebeu a dose mais elevada. Devem também ser examinados os órgãos-alvo de animais que foram tratados com doses intermediárias da substância-teste

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabelas, especificando-se para grupo-teste, um número de animais no início do experimento, número de animais que desenvolveram lesões e de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Os achados de estudos de toxicidade oral a médio prazo para ratos devem ser considerados em termos dos efeitos tóxicos e das alterações observadas em necrópsia e exames histopatológicos. A avaliação dos resultados incluirá a relação entre a dose da substância-teste e a presença ou ausência, a incidência e severidade das anormalidades, incluindo alterações comportamentais e clínicas, lesões macroscópicas, identificação de órgãos-alvo, alterações de peso corpóreo, efeitos sobre a mortalidade e qualquer outro efeito tóxico. Este teste deve permitir uma estimativa satisfatória da dose-sem-efeito.

O relatório final do teste deve conter:

- raça dos animais;
- dados de resposta toxicológica por sexo e dose;
- número de animais por dose;
- tempo de morte durante o experimento, ou se os animais sobreviverem até o final do experimento;
- efeitos tóxicos;
- tempo de observação de cada sinal anormal e sua evolução;
- dados do consumo de alimentos (ou água) e peso corpóreo;
- alterações oftalmológicas;
- testes hematológicos utilizados e resultados relevantes;
- testes de bioquímica clínica utilizados e resultados relevantes:
- descrição detalhada das alterações macro e microscópica dos tecidos e ógãos examinados:
- tratamento estatístico dos resultados, quando pertinente.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os estudos da toxicidade oral a médio prazo fornecem informações sobre o efeito tóxico deste tipo de exposição à substância-teste.

A extrapolação destes resultados para o homem só é válida dentro de limites muito estreitos, mas eles podem fornecer informações úteis sobre a dose-sem-efeito e a exposição humana permitida.

8 LITERATURA BÁSICA

8.1. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act Test: Guidelines. Federal Register, 50 (188), 1985.

8.2. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1981.

8.3. WHO. World Health Organization. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Environmental Health Criteria, 6, I, 1978.

F.1.4. TOXICIDADE ORAL A MÉDIO PRAZO PARA CÃES (estudo de 90 dias)

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre os efeitos adversos causados por exposições repetidas num período de tempo limitado. Permite também, obter informações sobre: órgãos-alvo, possibilidade de acúmulo, dose-sem-efeito, a qual será usada para selecionar doses para estudo a longo prazo e estabelecimento de critérios de segurança para a exposição humana.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos diariamente, durante 90 dias, a doses da substância-teste escolhidas a partir dos estudos de toxicidade oral a curto prazo com doses repetidas.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Toxicidade oral a médio prazo

É o efeito adverso resultante da exposição oral diária a uma substância química durante parte (mais que 10%) do tempo de sobrevida dos animais de experimentação.

3.2. Dose

Ver definições gerais da Parte F.

3.3. Dose-sem-efeito

Ver definições gerais da Parte F.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação

Usar cães machos e fêmeas, de raça definida, com idade entre 4 e 6 meses.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais

Pelo menos 8 animais (4 machos e 4 fêmeas) devem ser usados para cada dose.

Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

5.2. Doses

Pelo menos 3 doses e um controle devem ser usados, sendo que os animais do grupo controle devem receber o mesmo tratamento dos demais grupos, excetuando-se a substância-teste.

A dose mais elevada deve produzir efeitos tóxicos sem letalidade. A menor dose não deve produzir evidência de toxicidade.

5.3. Execução

Os animais receberão a substância sete dias por semana, durante 90 dias, na dieta ou na água de beber.

Medidas semanais de consumo alimentar e de água (se for o caso), bem como de peso dos animais serão efetuadas.

Os sinais de toxicidade devem ser anotados à medida que sejam observados, incluindo tempo de aparecimento, grau e duração.

Alterações na pele e pêlos, olhos e mucosas, bem como dos sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo, da atividade somatomotora e padrão comportamental devem ser observadas.

Exame oftalmológico deve ser realizado nos animais tratados com a maior dose e nos controles, antes da administração da substância e ao término do tratamento.

Hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem global e diferencial de leucócitos, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas devem ser medidos no início do teste e mensalmente durante o período do teste, bem como no final do tratamento.

Determinações bioquímicas no sangue devem ser realizadas no início, mensalmente durante o teste e no final do experimento. Os testes indicados incluem a avaliação do balanço eletrolítico, do metabolismo de carboidratos e das funções hepática e renal, a saber: determinação de cálcio, fósforo, cloreto, sódio, potássio, glicemia em jejum, AST, ALT, ornitina decarboxilase, gamaglutamil transpeptidase, uréia, creatinina, bilirrubina total, albumina e proteínas totais no soro. Outras determinações que possam ser necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem análise de lipídios, hormônios, equilíbrio ácido-base, metahemoglobina e inibição de colinesterase. Outras análises bioquímicas devem ser realizadas, quando necessário, baseadas nos exames observados. Todas as determinações devem ser realizadas em animais submetidos a jejum de 24 horas antes da coleta de amostra.

No final do período todos os animais serão necropsiados e descritas todas as observações de todos os sistemas. Fígado, rins, adrenais, tireóide, paratireóide e testículos devem ser pesados imediatamente após a dissecção. Os seguintes órgãos e tecidos devem ser preservados para futura análise histopatológica: todos os que apresentarem alterações macroscópicas, cérebro - incluindo seção de medula, córtex cerebelar e cerebral - pituitária, tireóide (paratireóide), pulmão (traquéia), coração, aorta, glândula salivar, fígado, baço, rins, adrenais, pâncreas, gônadas, útero, (órgãos genitais acessórios), (pele), bexiga urinária, esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, colo, reto, vesícula biliar, linfonodos, (glândula mamária feminina), (músculo), nervo periférico, (olhos), esterno com medula óssea,(fêmur - incluindo superfície articular) e (medula espinal em três níveis - cervical, torácica e lombar). (Os tecidos mencionados entre parênteses serão examinados somente se mostrarem sinais de toxicidade ou forem considerados órgãos-alvo).

Exames histopatológicos devem ser realizados em todos os órgãos e tecidos de todos os animais do grupo-controle e do grupo tratado com a maior dose. Exames histopatológicos serão realizados nos grupos tratados com doses menores, nos órgãos que apresentarem lesões no grupo tratado com a maior dose ou quando as observações clínicas indicarem a necessidade.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabelas, constando, para cada grupo, o número de animais no início do experimento, número de animais que desenvolveram lesões, tipos de lesões e percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Todos os resultados, quantitativos e incidentais, devem ser avaliados por método estatístico apropriado, selecionado durante o delineamento do experimento.

Os resultados de estudos de toxicidade oral a médio prazo devem ser considerados em termos de efeito tóxico e das alterações observadas em necrópsias e exames histopatológicos. A avaliação incluirá a relação entre dose da substância em teste e, presença ou ausência, incidência e severidade de anormalidades, incluindo alterações comportamentais e clínicas, lesões macroscópicas, identificação de órgãos-alvo, alterações de peso corpóreo, efeito sobre a mortalidade ou outros efeitos tóxicos.

O relatório final do teste deve conter:

- raça dos animais;
- dados de resposta toxicológica por sexo e dose;
- tempo de morte durante o experimento, ou se os animais sobreviveram até o final do experimento;
- efeitos tóxicos;
- tempo de observação de cada sinal anormal e sua evolução;
- dados de consumo de alimento (ou água) e peso corpóreo;
- resultados do exame oftalmológico;
- testes hematológicos utilizados e resultados relevantes;
- testes de bioquímica clínica utilizados e resultados relevantes;

- descrição detalhada das alterações macro e microscópicas dos tecidos e órgãos examinados;
- tratamento estatístico dos resultados, quando pertinente.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os testes de toxicidade oral a médio prazo permitem uma estimativa satisfatória das doses-sem-efeito.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. EPA. Environmental Protection Agency Toxic Substance Control Act Test: Guidelines. Federal Register, 50 (188), 1985.

F.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INALATÓRIA

F.2.1. TOXICIDADE INALATÓRIA A CURTO PRAZO PARA RATOS

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Conhecer a toxicidade de substâncias que sejam introduzidas pela via respiratória, através da determinação da concentração letal 50% - CL_{50} e do perfil da curva dose/resposta de letalidade. O teste permite estabelecer as doses para estudos a médio e longo prazo, bem como fornecer informações sobre o modo de ação inalatória da substância.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos, por períodos de tempo definidos, a várias concentrações da substância-teste, determinando-se a concentração e a função dose-resposta. Os animais mortos durante o teste são necropsiados e, ao final do teste os que sobreviverem são sacrificados e necropsiados.

3. DEFINIÇÕES

3.1. CL_{50} - ver definições gerais da Parte F.

3.2. Toxicidade inalatória a curto prazo - é a soma dos efeitos adversos causados por uma substância, após a exposição ininterrupta por inalação, durante um curto período de tempo (24 horas ou menos).

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos

A câmara de inalação deve ser constituída de modo a permitir um fluxo de ar de 12 a 15 trocas por hora, uma concentração de oxigênio de 19% e uma distribuição uniforme da atmosfera de exposição. A arquitetura da câmara deve

ser tal que não permita aglomeração dos animais-teste e maximize a exposição à substância. Para garantir a estabilidade da atmosfera na câmara, o volume total dos animais-teste não deve ser superior a 5% do volume total da câmara. Um sistema dinâmico de inalação, com controle analítico de concentração, tem de ser usado. A velocidade do fluxo de ar deve ser ajustada para garantir que, dentro da câmara, as condições sejam essencialmente as mesmas. A manutenção de leve pressão negativa dentro da câmara previne a perda de substâncias-teste para o exterior.

4.2. Animais de experimentação

Usar ratos machos e fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, de raças perfeitamente definidas. A variação de peso dos animais não deve exceder 20% do peso médio. As fêmeas devem ser nulíparas e não prenhes.

Os animais serão mantidos, antes e após a exposição, em salas com temperatura de 22 $\pm$ 3°C e umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artificial aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e outro de 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum". Os animais serão aclimatados às condições de laboratório por pelo menos 5 dias antes do teste.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais

Pelo menos 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) devem ser usados para cada nível de concentração.

5.2. Doses

Pelo menos três doses devem ser usadas com concentrações suficientemente diferentes de modo a produzir grupos-teste com uma escala de efeitos tóxicos e de mortalidade que permitam a construção de uma curva de concentração/mortalidade e o cálculo aceitável da CL_{50}. No caso de substância potencialmente explosiva, cuidados devem ser tomados para evitar concentrações explosivas no interior da câmara.

5.3. Execução

Pouco antes da exposição os animais são pesados e expostos a concentrações de teste no equipamento apropriado, durante 4 horas. A temperatura de realização do teste deve ser mantida em 22 ± 2ºC e a umidade relativa, sempre que possível, entre 30 a 70%. Os animais não devem receber nem água nem comida durante o tempo de exposição. Durante a exposição devem ser aferidos os seguintes parâmetros: velocidade de fluxo de ar, concentração real da substância (que deve ser mantida constante), tamanho das partículas (para determinar a uniformidade de distribuição do tamanho das partículas), temperatura e umidade.

Durante e após a exposição os sinais de toxicidade devem ser anotados. Exames clínicos diários durante 14 dias devem ser realizados devendo ser anotados os tempos de aparecimento dos sinais de toxicidade e tempos de morte.

Alterações da pele e pêlos, olhos, mucosas, sistemas respiratório, circulatório e nervoso, com atenção especial para aparecimento de tumores, convulsões, salivação, diarréia, letargia, sono e coma, devem ser observados.

O peso dos animais será aferido semanalmente e no dia do sacrifício.

Exames anatomopatológicos macroscópicos devem ser realizados dependendo dos efeitos tóxicos observados e, com particular atenção, as alterações do aparelho respiratório.

Exames microscópicos podem ficar restritos aos órgãos-alvo.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabelas, mostrando, para cada grupo, o número de animais no início do teste, a hora de morte dos animais nos diferentes níveis de exposição, o número de animais que demonstrarem outros efeitos tóxicos e os resultados da necrópsia.

A CL_{50} pode ser determinada por qualquer um dos métodos referidos no ítem 8.

O relatório final do teste deve conter as seguintes informações:

a - Descrição do aparelho de exposição onde conste projeto, dimensões, fonte de ar, sistema de geração de partículas ou aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar de exaustão e método de acomodação dos animais na câmara.

b - Descrição do equipamento para medidas de temperatura, umidade, concentração e tamanho das partículas de aerossóis.

c - Dados da exposição tabulados e apresentados os valores médios com uma medida de variabilidade incluindo:
- índice de fluxo de ar através do equipamento de inalação;
- temperatura e umidade do ar ;
- concentração nominal da substância no interior da câmara:
- concentração real na zona-teste de respiração;
- distribuição do tamanho das partículas.

d - Dados dos animais:
- espécie/raça utilizada;
- tabulação dos dados das respostas por sexo e nível de exposição;
- tempo de morte durante ou após a exposição;
- CL_{50} para cada sexo ao final do período de exposição (com método de cálculo especificado);
- curva dose-resposta para mortalidade, com inclinação;
- resultados da necrópsia e achados histopatológicos.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A determinação da CL_{50} permite estimar a toxicidade relativa de uma substância pela via inalatória.

O valor da Cl_{50} deve ser considerado em conjunto com os efeitos tóxicos observados e os resultados da necrópsia. Estes valores servem como valores de referência para ítens de classificação e embalagem das substâncias-teste e como expressão do potencial letal da substância testada após inalação.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. BLISS, C.V. Quart. J. Pharm. Pharmacol., 11: 192-216, 1938.

8.2. FINNEY, D. G. Probit Analysis. 3rd.ed., London, Cambridge University Press, 1971.

8.3. LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96 : 99-113, 1949.

8.4. MILLER, L. C. & TAINTER, M. L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y., 57: 261-264, 1944.

8.5. NAS. National Academy of Sciences. Comittee for the Revision of NAS Publications 1138 - Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substance. Washington D.C., 1977.

8.6. THOMPSON, W. Bact. Rev., 11: 115 - 141, 1947.

8.7. WEILL, C.S. Biometrics, 8 : 249 - 263,1952.

8.8. WHO. World Health Organization. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Enviromental Health Criteria, 6, I, 1978.

F.2.2. TOXICIDADE INALATÓRIA A CURTO PRAZO COM EXPOSIÇÕES REPETIDAS PARA RATOS (estudo de 28 dias)
Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre os efeitos adversos de exposições repetidas de ratos a substâncias químicas, pela via inalatória, num período limitado de tempo.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos diariamente, durante 28 dias, a concentrações graduadas da substância-teste, usando-se uma concentração para cada grupo. Quando se utilizar um veículo para gerar uma concentração-teste na atmosfera, deve-se usar um grupo-controle exposto apenas ao veículo.

3. MATERIAL NECESSÁRIO

3.1. Aparelhos

A câmara de inalação deve ser construída de modo a permitir um fluxo de ar de 12 a 15 trocas por hora, uma concentração de oxigênio de 19% e uma distribuição uniforme da atmosfera de exposição. A arquitetura da câmara deve ser tal que não permita aglomeração dos animais-teste e maximize a exposição à substância. Para garantir a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais-teste não deve ser superior a 5% do volume total da câmara. Um sistema dinâmico de inalação, com controle analítico de concentração, tem de ser usado. A velocidade do fluxo de ar deve ser ajustada para garantir que, dentro da câmara, as condições sejam essencialmente as mesmas. A manutenção de leve pressão negativa dentro da câmara previne a perda de substância-teste para o exterior.

3.2. Animais de experimentação

Usar ratos, machos e fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, de raças perfeitamente definidas. No início do experimento a variação de peso dos animais não deverá exceder 20% do peso médio.

As fêmeas devem ser nulíparas e não-prenhes.

Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não-tratadas e saudáveis da mesma forma que não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter história recente de exposição a anti-helmínticos ou tratamentos com qualquer outra substância

4. PROCEDIMENTO

4.1. Animais

Pelo menos 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) devem ser utilizados em cada grupo-teste. Além disto, um grupo satélite de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) deve ser exposto à concentração mais elevada, por 28 dias, e observado quanto à reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos durante 14 dias após o final do tratamento.

Os animais serão mantidos, antes e após a exposição, em salas com temperatura de 22 $\pm$ 3°C e umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artificial aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

Os animais podem ser colocados em gaiolas em grupos por sexo ou individualmente. Para grupos, não mais que 5 animais devem ser colocados em cada gaiola.

4.2. Doses

Pelo menos 3 concentrações e um controle e, quando apropriado, um controle de veículo (correspondendo à concentraçao do veículo na dose de exposição mais alta) devem ser usadas. A concentração mais alta deve resultar em efeitos tóxicos, mas não deve produzir uma taxa de mortalidade que impeça uma avaliação significativa. A concen-

tração mais baixa não deve produzir nenhuma evidência de toxicidade.

No caso de substâncias potencialmente explosivas devem ser tomadas precauções para evitar a geração de concentrações explosivas.

4.3. Execução

Os animais são expostos à substância-teste 7 dias por semana, durante 28 dias. A duração da exposição diária deve ser de 6 horas após o equilíbrio da concentração da câmara. A temperatura durante a realização do teste deve ser mantida em 22 $\pm$ 2°C e a umidade relativa, sempre que possível, entre 30 a 70%. Os animais não devem receber nem água, nem comida durante o tempo de exposição.

Durante a exposição devem ser aferidos os seguintes parâmetros: a velocidade do fluxo de ar, concentração real da substância (que deve ser mantida constante), tamanho das partículas (para determinar a estabilidade da concentração de aerossóis e a uniformidade de distribuição do tamanho das partículas), temperatura e umidade.

Os animais devem ser observados durante e após a exposição. Todos os animais devem ser observados diariamente e os sinais de toxicidade registrados, incluindo hora de início, grau e duração.

Alterações da pele e pêlos, olhos, mucosas, sistema respiratório, sistema nervoso autônomo e central, com atenção especial para atividade somatomotora e padrão comportamental devem ser observadas.

O peso dos animais, bem como o consumo de ração, devem ser aferidos semanalmente.

Hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, e uma medida do potencial de coagulação, através do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas, devem ser medidos no final do período de teste.

Determinações bioquímicas no sangue devem ser executadas no final do estudo e a seleção dos testes será influen-

ciada pelas observações sobre o modo de ação da substância.

No final do período do teste todos os animais serão necropsiados e descritas as observações de todos os sistemas.

Os seguintes órgãos e tecidos devem ser preservados para análise histopatológica: pulmões inteiros (preferencialmente perfundidos com fixador), fígado, rins, baço, adrenais, coração e outros órgãos-alvo, isto é, aqueles que mostrarem alterações macroscópicas ou variações de tamanho.

O exame histopatológico será realizado nos órgãos e tecidos acima , para todos os animais do grupo-controle e do grupo de exposição mais elevada.

Estes exames podem ser estendidos aos animais dos grupos expostos a outras concentrações, se for necessário investigar as mudanças ocorridas no grupo de concentração mais alta.

5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabelas, mostrando, para cada grupo o número de animais no início do teste, o número de animais que apresentam lesões, os tipos de lesões e o percentual de animais apresentando cada tipo de lesão. Os resultados devem ser avaliados por um método estatístico apropriado, selecionado durante o delineamento do experimento.

A avaliação dos resultados devem incluir a relação entre a concentração da substância testada e a duração da exposição, a presença e ausência, incidência e severidade de anomalias comportamentais e clínicas, lesões macroscópicas, órgãos-alvo identificados, mudança no peso dos animais e outros efeitos tóxicos.

O relatório final do teste deve conter as seguintes informaçoes:

a - Descrição da câmara de exposição onde conste projeto, dimensoes, fonte de ar, sistema de geração de partículas ou aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar de exaustão e método de acomodação dos animais na câmara.

b - Descrição dos equipamentos para medidas de temperatura, umidade, concentração e tamanho das partículas/aerossóis.

c - Dados da exposição tabulados e apresentados os valores médios com uma medida de variabilidade incluindo:
- velocidade de fluxo de ar através do equipamento de inalação;
- temperatura e umidade do ar;
- concentração nominal da substância no interior da câmara;
- concentração real da zona de respiração;
- distribuição do tamanho de partículas.

d - Dados dos animais:
- espécie/raça utilizada;
- tabulação dos dados das respostas por sexo e nível de exposição;
- tempo de morte durante o estudo, ou se os animais sobreviveram até o final;
- efeitos tóxicos;
- hora de observação de cada sinal anormal e seu desenvolvimento posterior;
- dados sobre peso de alimento e peso dos animais;
- testes hematológicos realizados e resultados relevantes;
- testes bioquímicos realizados e resultados relevantes:
- resultados de necrópsias;
- descrição detalhada dos achados histopatológicos;
- tratamento estatístico dos resultados quando apropriado.

6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os estudos de inalação com exposições repetidas devem fornecer informações sobre os efeitos de tal tipo de exposição e podem indicar a necessidade de estudos por períodos mais longos.

7. LITERATURA BÁSICA

7.1. NAS. National Academy of Sciences. Comittee for the Revision of NAS Publications, 1138. Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances. Washington D.C., 1977.

7.2. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 1981.

7.3. WHO. World Health Organization. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Enviromental Health Criteria, 6 , I, 1978.

F.2.3. TOXICIDADE INALATÓRIA A MÉDIO PRAZO PARA RATOS
(estudo de 90 dias)
Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre os efeitos adversos de exposições repetidas de ratos a substâncias químicas pela via inalatória, num período de 90 dias.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos diariamente, durante 90 dias, a concentrações graduadas da substância-teste, usando-se uma concentração para cada grupo. Quando se utilizar um veículo para gerar uma concentração apropriada da substância-teste na atmosfera, deve-se usar um grupo-controle exposto apenas ao veículo.

3. DEFINIÇÕES

Toxicidade inalatória a médio prazo - é o efeito adverso decorrente da exposição repetida, pela via inalatória, durante parte (não mais de 10%) do tempo de vida do animal.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Aparelhos

A câmara de inalação deve ser construída de modo a permitir um fluxo de ar de 12 a 15 trocas por hora, uma concentração de oxigênio de 19% e uma distribuição uniforme da atmosfera de exposição. A arquitetura da câmara deve ser tal que não permita aglomeração dos animais-teste e maximize a exposição à substância. Para garantir a estabilidade da atmosfera de câmara o volume total dos ani-

mais-teste não deve ser superior a 5% do volume total da câmara. Um sistema dinâmico de inalação, com controle analítico de concentração, tem de ser usado. A velocidade do fluxo de ar deve ser ajustada para garantir que, dentro da câmara, as condições sejam essencialmente as mesmas. A manutenção de leve pressão negativa dentro da câmara previne a perda de substância-teste para o exterior.

4.2. Animais de Experimentação

Usar ratos, machos e fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, de raças perfeitamente definidas. No início do experimento a variação de peso dos animais não deverá exceder a 20% do peso médio.

As fêmeas devem ser nulíparas e não-prenhes.

Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não-tratadas e saudáveis. Da mesma forma não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter história recente de exposição a anti-helmínticos ou tratamento com qualquer outra substância.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Animais

Pelo menos 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) devem ser utilizados em cada grupo-teste. Além disto, um grupo satélite de 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) deve ser exposto à concentração mais elevada durante 90 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos durante, pelo menos, 28 dias após o tratamento.

A temperatura da sala de experimentação deve ser de 22 $\pm$ 3oC e a umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artificial, aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

Os animais podem ser colocados em gaiolas em grupos por sexo ou individualmente. Para grupos, não mais de 5 animais devem ser colocados em cada gaiola.

5.2. Doses

Pelo menos 3 concentrações e um controle e, quando apropriado, um controle de veículo (correspondendo à concentração do veículo na dose de exposição mais alta), devem ser usadas. A concentração mais elevada deve resultar em efeitos tóxicos, mas não deve produzir uma taxa de mortalidade que impeça uma avaliação significativa. A concentração mais baixa não deve produzir nenhuma evidência de toxicidade.

No caso de substâncias potencialmente explosivas devem ser tomadas precauções para evitar a geração de concentrações explosivas.

5.3. Execução

Os animais são expostos 5 dias por semana à substância-teste, durante 90 dias. A duração da exposição diária deve ser de 6 horas após o equilíbrio da concentração da câmara. A temperatura em 22 $\pm$ 2ºC e a umidade relativa, sempre que possível, entre 30 a 70%. Os animais não devem receber nem água nem comida durante o tempo de exposição. Durante a exposição devem ser aferidos os seguintes parâmetros: velocidade de fluxo de ar, concentração real da substância (que deve ser mantida constante), tamanho das partículas (para determinar a estabilidade da concentração de aerossóis e a uniformidade de distribuição do tamanho das partículas), temperatura e umidade.

Os animais devem ser observados durante e após a exposição. Todos os animais devem ser observados diariamente e os sinais de toxicidade registrados, incluindo hora de início, grau e duração.

Alterações da pele e pêlos, olhos e mucosas, sistema respiratório, circulatório e nervoso autônomo e central, com especial atenção para atividade somatomotora e padrão comportamental devem ser observados.

O peso dos animais, bem como o consumo de ração, devem ser aferidos semanalmente.

Exame oftalmológico, com auxílio de oftalmoscópio, deve ser realizado no início e término do experimento nos animais expostos à maior dose e nos do grupo controle. Se alterações forem detectadas todos os animais serão examinados.

Hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos e uma medida do potencial de coagulação, através do tempo de coagulação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas, devem ser realizados no início e término do período de teste.

Determinações bioquímicas no sangue devem ser executadas no final do estudo e a seleção dos testes será influenciada pelas observações sobre o modo de ação da substância.

Devem ser avaliados, pelo menos, balanço eletrolítico, metabolismo de carboidratos e função hepática e renal.

No final do período do teste todos os animais serão necropsiados e descritas as observações de todos os sistemas.

Os seguintes órgãos e sistemas devem ser preservados para análise histopatológica: todos os que mostrarem lesões macroscópicas, pulmões inteiros, tecido nasofaríngeo, cérebro (incluido medula, cortex cerebral e cerebelar),pituitária, tireóide/paratireóide,timo, traquéia, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, adrenais, pâncreas, gônadas, útero, órgãos genitais acessórios, esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, colo, reto, bexiga urinária, linfonodos, nervo periférico, esterno com medula óssea, pele, glândula mamária feminina, músculo, olhos, fêmur, medula espinal e glândulas lacrimais.

O exame histopatológico será obrigatoriamente realizado nos tecidos do trato respiratório e todos os outros tecidos dos animais do grupo de controle e do de maior dose. Além disto, todas as lesões macroscópicas deverão ser examinadas, bem como os órgãos-alvo e os pulmões, em todos os grupos.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabelas, mostrando, para cada grupo, o número de animais no início do teste, número de

animais com lesões, tipos de lesão e o percentual de animais apresentando cada tipo de lesão. Os resultados devem ser avaliados por um método estatístico apropriado, selecionado durante o delineamento experimental.

A avaliação dos resultados deve incluir a relação entre a concentração da substância testada e duração da exposição, a presença ou ausência, incidência e severidade de anomalias, incluindo anomalias comportamentais e clínicas, lesões macroscópicas, órgãos-alvo identificados, alterações no peso dos animais e outros efeitos tóxicos.

O relatório final do teste deve conter as seguintes informações:

a - Descrição do aparelho de exposição, onde conste projeto, dimensões, fonte de ar, sistema de geração de partículas de aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar de exaustão e método de acomodação dos animais na camara.

b - Descriçao dos equipamentos para medidas de temperatura, umidade, concentraçao e tamanho das partículas/aerossóis.

c - Dados da exposiçao tabulados e apresentados os valores médios com uma medida de variabilidade incluindo:
  - velocidade de fluxo de ar do equipamento de inalaçao;
  - temperatura e umidade do ar;
  - concentraçao nominal da substância no interior da câmara;
  - concentraçao real na zona de respiração;
  - distribuição do tamanho das partículas.

d - Dados dos animais:
  - espécie/raça utilizada;
  - tabulação dos dados de resposta por sexo e nível de exposição:
  - tempo de morte durante o estudo, ou se os animais sobreviveram até o final;
  - efeitos tóxicos;
  - horas de observação de cada sinal anormal e seu desenvolvimento posterior;
  - dados sobre peso do alimento e peso dos animais;
  - testes hematológicos realizados e resultados relevantes:
  - testes bioquímicos realizados e resultados relevantes:
  - resultados de necrópsia;

- descrição detalhada dos achados histopatológicos;
- tratamento estatístico dos resultados quando apropriado

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O teste de toxicidade inalatória pelo período de 90 dias permite uma estimativa satisfatória das doses-sem-efeito para este tipo de exposição.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. CAGE, J. C. Experimental Inhalation Toxicology. In: PAGET, G. E. Ed. Methods in Toxicology. Oxford, Blackeweell. p. 258-277.

8.2. CASARETT, L. J. & DOULL, J. Toxicology: Basic Science of Poisons. New York, MacMillam, 1975.

8.3. MAC ARLAND, H. N. Respiratory Toxicology. In: Hayes, J.C. Ed. Essays in Toxicology. New York, Academic Press, Vol. 7, p. 121-54. 1976.

8.4. NAS. National Academy of Sciences. Comittee for the Revision of NAS Publications, 1138. Principles and Procedures for Evaluating the toxicity of Household Substances. Washington D. C., 1977.

8.5. WHO. World Health Organization. Principles and methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Environmental Health Criteria, 6, I, 1978.

F.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CUTÂNEA

F.3.1. TOXICIDADE CUTÂNEA A CURTO PRAZO PARA RATOS

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre efeitos adversos decorrentes da exposição de ratos a uma substância, pela via cutânea. Permite também estabelecer as doses para estudos a médio e a longo prazo, bem como fornecer informações sobre o modo de ação tóxica da substância.

2. FUNDAMENTO

A substância-teste é aplicada sobre a pele de vários grupos de animais, usando-se doses matematicamente relacionadas desta substância, uma por grupo de animais.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Dose - ver definições gerais da Parte F.

3.2. Dose-sem-efeito - ver definições gerais da Parte F.

3.3. Dose-resposta - ver definições gerais da Parte F.

3.4. DL_{50} cutânea - é definida como a dose única de uma determinada substância que causa a morte de até 50% dos animais tratados, dentro de 14 dias subsequentes à introdução da substância via cutânea.

3.5. Toxicidade cutânea aguda - constitui-se na soma de efeitos adversos, ocorrendo dentro de certo intervalo de tempo após aplicação cutânea de uma única dose da substância-teste.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de Experimentação

Usar ratos machos e fêmeas, adultos (cerca de 90 dias de idade), de raça perfeitamente definidas, com peso entre 200 e 300 g.

As fêmeas devem ser nulíparas e não-prenhes.

Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não tratadas e saudáveis.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Animais

Pelo menos 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) devem ser usados para cada dose. Os animais devem ser climatizados às condições do laboratório por pelo menos 5 dias antes do teste. Os pêlos dorsais são removidos por raspagem, 24 horas antes do teste, cuidando-se de não ferir a pele, o que altera sua permeabilidade. A área onde será aplicada a substância deve corresponder a pelo menos 10% da área total da superfície do corpo do animal.

A temperatura da sala de experimento deve ser de 22 $\pm$ 3°C e a umidade relativa de 30 a 70%. Quando a iluminação for artificial recomenda-se um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementaçao de água "ad libitum".

5.2. Doses

Pelo menos tres doses devem ser usadas, com diferenças adequadas de modo a produzir grupos com uma ampla faixa de efeitos tóxicos e de níveis de mortalidade.

5.3. Execução

O peso dos animais é medido e a quantidade da substância a ser aplicada calculada, considerando-se a dose desejada. A substância-teste será aplicada uniformemente sobre uma área de aproximadamente 10% da área total da superfície do corpo do animal.

A substância-teste deve ser mantida em contato com a pele usando-se um curativo de gaze porosa durante o período de 24 horas de exposição, impedindo que o animal possa ingerir a substância.
Ao final do período de exposição, resíduos da substância-teste devem ser removidos.
Os animais serão observados durante as 24 horas subsequentes à aplicação da substância e , posteriormente, durante 14 dias.
O tempo de morte deve ser anotado com a maior previsão possível. O peso individual dos animais será aferido antes da aplicação, semanalmente e na hora da morte. Alterações de peso devem ser calculadas quando a sobrevivência for maior que um dia.
Alterações na pele, olhos e mucosas, alterações do sistema respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo, devem ser observadas. Atenção particular deve ser dirigida à observação de tremores, convulsões, salivação, diarréia, letargia, sono e coma.
Deve-se realizar um exame macroscópico de todos os animais. Exames microscópicos dos órgãos que mostram alterações macroscópicas devem ser realizados.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os dados devem ser resumidos em tabelas, mostrando para cada grupo de animais o número com o qual o teste começou, o tempo de morte de cada animal, o número de animais que apresentaram outros sinais de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados anatomopatológicos.
A DL_{50} cutânea deve ser determinada por qualquer um dos métodos referidos no ítem 8.
O relatório final de teste deve conter:

- raça dos animais;
- tabelas com os resultados apresentados por sexo e dose usada;
- tempo de morte para cada dose;
- valor de DL_{50} para cada sexo, determinada após 14 dias, especificando o método usado:

- 95% de intervalo de confiança para DL_{50};
- curva de dose/mortalidade e velocidade de morte;
- resultado do exame anatomopatológico.

7. INTERPRETAÇAO DOS RESULTADOS

O valor da DL_{50} cutânea é uma medida preliminar usada como valor de referencia para propósitos classificatórios e é uma expressao do potencial de letalidade da substância-teste após exposiçao cutanea.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. BLISS, C. I. Quart J. Pharm. Pharmacol., 11: 192-216, 1938.

8.2. FINNEY, D. G. Probit Analysis. 3 rd. ed. London, Cambridge University Press, 1971.

8.3. LITCHFIELD, J. T. & WILLCOXON, F. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96: 99-113, 1949.

8.4. MILLER, L. C. & TAINTER, M. L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y., 57: 261-4, 1944.

8.5. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

8.6. THOMPSON, W. Bact. Rev., 11: 115-41, 1947.

8.7. WEIL, C. L. Biometrics, 8: 249-63, 1952.

F.3.2. TOXICIDADE CUTÂNEA A CURTO PRAZO COM DOSES REPETIDAS PARA RATOS (estudo de 28 dias)

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre efeitos adversos decorrentes de exposições repetidas de ratos a substâncias químicas, pela via cutânea durante um período de 28 dias. Além disto, o teste permite estabelecer as doses para estudos a médio e longo prazo.

2. FUNDAMENTO

A substância-teste é aplicada sobre a pele de vários grupos de animais, durante 28 dias, usando-se doses matematicamente relacionadas de substância, uma por grupo de animais.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Dose

ver definiçoes gerais da Parte F.

3.2. Dose-sem-efeito

ver definiçoes gerais da Parte F.

3.3. Toxicidade cumulativa

é o efeito adverso de doses repetidas que ocorre como resultado da açao prolongada, ou de concentrações crescentes da substancia em tecidos susceptíveis.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação

Usar ratos, machos e fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, de raças perfeitamente definidas. No início do experimento a variação de peso dos animais não deverá exceder 20% do peso médio.

As fêmeas devem ser nulíparas e não prenhes.
Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não tratadas e saudáveis. Da mesma forma, não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter história recente de exposição e anti-helmínticos ou tratamentos com qualquer outra substância.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais

Pelo menos 10 animais (5 machos e 5 fêmeas), devem ser usados para cada dose. Além disto, um grupo de 10 animais (5 por sexo) deve ser tratado com a maior dose por 28 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos durante 14 dias após o final do tratamento.
A temperatura da sala de experimentação deve ser de 22 ± 3ºC e a umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artificial, aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum". Os animais devem ser mantidos em gaiolas individuais.
Os animais serão climatizados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do teste. Os pêlos dorsais são removidos por raspagem 24 horas antes do teste, cuidadosamente para não ferir a pele, o que altera a sua permeabilidade. A área onde será aplicada a substância deve corresponder a pelo menos 10% da área total da superfície do corpo do animal.

5.2. Doses

Pelo menos 3 doses e um controle devem ser usados, sendo que os animais do grupo-controle devem receber o mesmo tratamento dos demais grupos, excetuando-se a substância-teste.
A dose mais elevada deve promover efeitos tóxicos, mas não produzir mais que 10% de mortalidade. A menor dose não deve produzir nenhum efeito tóxico.
Se a aplicação da substância-teste produzir severa irri-

tação da pele, a concentração pode ser reduzida apesar de que isto pode resultar na diminuição ou ausência de manifestação dos efeitos tóxicos promovidos por altas doses.

5.3. Execução

Os animais são tratados com substância-teste durante 28 dias, 5 dias por semana.

A substância-teste deve ser aplicada uniformemente sobre uma área de 10% da área total da superfície do corpo do animal.

A substância-teste deve ser mantida em contato com a pele usando-se um curativo de gaze porosa, protegida de modo a impedir que o animal possa ingerir a substância.

Os sinais de toxicidade devem ser anotados à medida que sejam observados, incluindo tempo de aparecimento, grau e duração.

Alterações na pele e pêlos, olhos e mucosas, bem como dos sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo, da atividade somatomotora e padrão comportamental devem ser observadas.

O consumo de ração, assim como o peso dos animais, deve ser medido semanalmente.

Hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem global e diferencial de leucócitos, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas devem ser medidos no final do período do teste.

A seleçao de outros testes específicos deverá ser influenciada por observações sobre o modo de ação da substância.

No final do período do teste os animais serão necropsiados e descritas as observações de todos os sistemas.

Os seguintes órgãos e tecidos devem ser preservados para análise histopatológica: pele normal e tratada, fígado, rins e órgãos-alvo, isto é, aqueles que mostrarem lesões macroscópicas ou modificações de tamanho.

O exame histopatológico será realizado nos órgãos e tecidos acima, para todos os animais do grupo-controle e dos tratados com maior dose. Órgãos-alvo de animais de grupos com doses intermediárias também devem ser examinados.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabela, mostrando, para cada grupo, o número de animais no início do experimento, o número de animais que apresentaram lesões, os tipos de lesões e o número de animais mostrando cada uma das lesões.

Todos os resultados observados, quantitativos ou incidentais, devem ser avaliados por método estatístico apropriado, selecionado durante o delineamento experimental.

Os achados de estudo de toxicidade cutânea com doses repetidas devem ser considerados em termos dos efeitos tóxicos observados e dos achados de necrópsia e histopatologia. A avaliação incluirá a relação entre a dose da substância-teste e a presença ou ausência, incidência e severidade de anormalidades incluindo alterações clínicas e de comportamento, lesões macroscópicas, identificação de órgãos-alvo, alterações de peso corpóreo, efeitos sobre a mortalidade e outros efeitos tóxicos.

O relatório final de teste deve conter:

- raça dos animais;
- dados de resposta toxicológica por sexo e dose;
- tempo de morte durante o experimento;
- efeitos tóxicos;
- tempo de observação de cada sinal anormal e sua evolução;
- dados de consumo de alimento e peso corpóreo;
- testes hematológicos utilizados e resultados relevantes;
- testes de bioquímica clínica utilizados e resultados relevantes;
- descrição detalhada das alterações macro e microscópicas dos órgãos e tecidos examinados;
- tratamento estatístico dos resultados, quando pertinente.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os estudos de exposição cutânea a doses repetidas fornecem informações sobre os efeitos de tal tipo de exposição à substância-teste. Os resultados podem fornecer informações sobre o modo de ação e grau de absorção cutânea da substância.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act. Test. Guidelines. Federal Register, 50 (188), 1985.

8.2. OECD. Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

8.3. WHO. World Health Organization. Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Environmental Health Criteria; 6, I, 1978.

F.3.3. TOXICIDADE CUTÂNEA A MÉDIO PRAZO PARA RATOS
(estudo de 90 dias)
Data da ravisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre efeitos adversos causados por exposições repetidas de ratos a substâncias químicas, pela via cutânea, num período de tempo limitado. O teste permite, também, obter informações sobre: órgãos-alvo, possibilidade de acúmulo, dose-sem-efeito, a qual será usada para selecionar doses para estudo a longo prazo e estabelecimento de critérios de segurança para exposição humana.

2. FUNDAMENTO

Vários grupos de animais são expostos durante 90 dias a doses da sustância-teste escolhidas a partir dos estudos de toxicidade cutânea a curto prazo com doses repetidas.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Dose
ver definições gerais da Parte F.

3.2. Dose-sem-efeito
ver definições gerais da Parte F.

3.3. Toxicidade cutânea a médio prazo
o efeito adverso resultante de exposição diária a uma substância química de animais em experimentação durante parte (não mais que 10%) do seu tempo de sobrevida.

3.4. Toxicidade cumulativa
é o efeito adverso de doses repetidas que ocorre como resultado da ação prolongada, ou de concentrações crescentes da substância em tecidos susceptíveis.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de Experimentação

Usar ratos, machos e fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, de raças perfeitamente definidas. No início do experimento a variação de peso dos animais não deverá exceder 20% do peso médio.

As fêmeas devem ser nulíparas e não-prenhes.

Os animais-teste devem ser nascidos de fêmeas não tratadas e saudáveis. Da mesma forma, não devem ter sido usados para outros estudos, nem ter história recente de exposição a anti-helmínticos ou tratamento com qualquer outra substância.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Animais

Pelo menos 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) devem ser usados para cada dose. Além disto, um grupo adicional de 20 animais (10 por sexo) deve ser tratado com a maior dose durante 90 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada dos efeitos tóxicos, durante 28 dias após o final do tratamento.

A temperatura da sala de experimentação deve ser de 22 $\pm$ 3°C e a umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artificial aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

Os animais devem ser mantidos em gaiolas individuais.

Os animais serão climatizados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do teste. Os pêlos dorsais serão removidos por raspagem 24 horas antes do início do teste e semanalmente, cuidando-se para não ferir a pele, o que altera a sua permeabilidade. A área onde será aplicada a substância deve corresponder a pelo menos 10% da área total da superfície do corpo do animal.

5.2. Doses

Pelo menos 3 doses e um controle devem ser usados, sendo

que os animais do grupo-controle devem receber o mesmo tratamento dos demais grupos, excetuando-se a substância-teste.

A dose mais elevada deve promover efeitos tóxicos mas não produzir mais que 10% de mortalidade. A menor dose não deve produzir nenhum efeito tóxico.

5.3. Execução

Os animais são tratados com a substância cinco dias por semana, durante 90 dias.

A substância-teste deve ser aplicada uniformemente sobre uma área de 10% da área total da superfície do corpo do animal.

A substância deve ser mantida em contato com a pele usando-se um curativo de gaze porosa, protegida de modo a impedir que o animal possa ingerir a substância.

Os sinais de toxicidade devem ser anotados à medida que sejam observados, incluindo tempo de aparecimento, grau e duração. Devem ser observadas alterações na pele e pêlos, olhos e mucosas, dos sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo, da atividade somatomotora e padrão comportamental.

Consumo de ração, assim como o peso dos animais, devem ser medidos semanalmente.

Exame oftalmológico deve ser realizado antes da exposição e no final do estudo pelo menos no grupo de dose mais elevada e no controle. Se forem detectadas mudanças nos olhos, todos os animais devem ser examinados.

Hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem global e diferencial de leucócitos, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e contagem de plaquetas devem ser medidos no final do período do teste.

Determinações bioquímicas no sangue devem ser realizadas no final do período do teste. Devem ser avaliadas as funções hepática e renal, equilíbrio eletrolítico e metabolismo de carboidratos. A seleção de outros testes específicos será influenciada por observações sobre o modo de ação da substância.

No final do experimento os animais serão necropsiados e as observações de todos os sistemas descritas. O fígado,

rins, adrenais e testículos serão pesados e preservados para exame histopatológico, juntamente com órgãos-alvo e aqueles que mostrarem alterações macroscópicas ou aumento de tamanho. O exame histopatológico será realizado nos órgãos e tecidos acima mencionados, para todos os animais do grupo-controle e do grupo-experimental que recebeu a dose mais elevada. Devem também ser examinados os órgãos-alvo de animais que foram tratados com doses intermediárias de substância-teste.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos em tabelas, mostrando, para cada grupo-teste, o número de animais que desenvolveram lesões e o percentual de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Os dados obtidos em estudos de toxicidade cutânea a médio prazo para ratos devem ser considerados em termos dos efeitos tóxicos e das alterações observadas em necrópsias e exames histopatológicos. A avaliação dos resultados incluirá a relação entre a dose da substância-teste e a presença ou ausência, a incidência e severidade de anormalidades, incluindo alterações comportamentais e clínicas, lesões macroscópicas, identificação de órgãos-alvo, alterações de peso corpóreo, efeitos sobre a mortalidade e qualquer outro efeito tóxico.

Este teste deve permitir uma estimativa satisfatória da dose-sem-efeito.

O relatório final do teste deve conter:

- raça dos animais;
- dados de resposta toxicológica por sexo e dose;
- número de animais por dose;
- tempo de morte durante o experimento ou se os animais sobreviveram até o final do experimento;
- efeitos tóxicos;
- tempo de observação de cada sinal anormal e sua evolução;
- dados de consumo de alimentos e peso corpóreo;
- alterações oftalmológicas;
- testes hematológicos utilizados e resultados relevantes;
- testes de bioquímica clínica utilizados e resultados relevantes;

- descrição detalhada das alterações macro e microscópicas dos tecidos e órgãos examinados;
- tratamento estatístico dos resultados, quando pertinentes.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os estudos de exposição cutânea a médio prazo fornecem informações sobre possíveis danos que surgirão após exposição repetida pela via cutânea por um período de tempo limitado.
Um teste de exposição a médio prazo pode fornecer uma estatística satisfatória de uma dose-sem-efeito.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic. Substances Control Act Test: Guidelines. Federal Register, 50 (188), 1985.

8.2. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

8.3. WHO. World Health Organization. Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Environmental Health Criteria, 6, I, 1978.

F.3.4. IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA A CURTO PRAZO (coelhos)
Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre os efeitos irritantes ou corrosivos decorrentes da exposição da pele de animais a uma substância.

2. FUNDAMENTO

A substância-teste é aplicada, em dose única, à pele de vários animais de experimentação, cada animal servindo como seu controle.

3. DEFINIÇÕES

Irritação cutânea: é a produção de alterações inflamatórias reversíveis na pele após aplicação de uma substância.
Corrosão cutânea: é a produção de lesão tecidual irreversível na pele após a aplicação de uma substância.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação

Usar coelhos albinos adultos e saudáveis.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais

Pelo menos 3 animais devem ser usados.
Os animais serão colocados em gaiolas individuais. A temperatura da sala de experimentação deve ser de 22 $\pm$ 3°C e a umidade relativa de 30 a 70%. Quando a luz for artificial, aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e 12 ho-

ras no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum". Vinte e quatro horas antes do teste, o pêlo dorsal do tronco dos animais é removido por corte e raspagem. Cuidados devem ser tomados para evitar danificar a pele dos animais.

5.2. Doses

As doses escolhidas devem estar contidas em até 0,5 ml, se líquido, ou 0,5 g , se sólido ou semi-sólido. Quando a substância-teste for sólida, ela deve ser dissolvida em água ou em veículo apropriado, para garantir contato com a pele. Quando se usam veículos, há que se garantir ausência de influência dos mesmos sobre a irritação provocada pela substância-teste. Substâncias fortemente ácidas ou alcalinas não necessitam ser testadas para irritação cutânea já que possuem propriedades corrosivas/irritantes características.

5.3. Execução

A substância-teste deve ser aplicada a pequena área da pele e coberta com gaze porosa, que será mantida no lugar com fita adesiva não-irritante, evitando-se que o animal faça ingestão ou inalação da substância contida no curativo. Áreas adjacentes não tratadas da pele servem como controle.

A duração da exposição é de 4 horas. No final do período de exposição resíduos da substância-teste são removidos usando-se água ou solvente apropriado, sem alterar a resposta existente ou a integridade da pele.

O período de observação deve ser suficiente para permitir a avaliação da reversibilidade ou irreversibilidade total dos efeitos observados. Em geral não há necessidade de exceder 14 dias após a aplicação.

Os animais serão examinados em 30 a 60 minutos após a aplicação, para presença de eritema e edema. Nova observação desses parâmetros deve ser realizada após 24, 48 e 72 horas, retirando-se o curativo.

A irritação dérmica é graduada e anotada de acordo com a Tabela 1. Outras observações podem ser necessárias para estabelecer a reversibilidade. Qualquer outra lesão e efeitos tóxicos devem ser descritos.

Tabela 1: Avaliação da Reação Dérmica

Eritema e cicatriz	Valor
Ausência de eritema	0
Eritema fraco (pouco perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado e severo	3
Eritema severo (vermelhidão) à formação de cicatrizes leves (lesões profundas)	4
Máximo possível	4
Formação de edema	
Ausência de edema	0
Edema muito fraco (pouco perceptível)	1
Edema fraco (extremidades da área do edema bem definidas)	2
Edema moderado (aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (mais de 1 mm, ultrapassando a área de exposição)	4
Máxima possível	4

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em tabelas, mostrando, para cada animal: a) o grau de irritação para eritema e edema nos tempos de 30-60 minutos, 24, 48 e 72 horas após remoção do curativo; b) lesões graves; c) descrição do grau e natureza da irritação, corrosão ou reversibilidade: d) outros efeitos tóxicos observados.

o relatório deve incluir:

- raça dos animais;
- natureza física, pH, concentração da substância, período de observação (30-60 minutos, 24, 48 e 72 horas);
- descrição das lesões graves;
- descrição dos outros efeitos tóxicos não-cutâneos;
- descrição da natureza da irritação observada.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A avaliação do grau de irritação dérmica deve ser considerada em conjunto com a natureza e reversibilidade das respostas observadas. Resultados individuais não representam um padrão para classificar as propriedades irritantes de um material e só podem ser vistos como valores de referência significativos se acompanhados de descrição completa e avaliação dos efeitos observados.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. DRAIZE, J.H.; NOODWARD, G.; CALVERY.; H.O.J.Pharmaco Exp. Ther., 83: 377-390,1944.

8.2. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

8.3. WHO. World Health Organization. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Environmental Health Criteria, 6, I, 1978.

F.4. AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR A CURTO PRAZO(COELHO)

F.4. AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR A CURTO PRAZO (coelhos)
Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

Fornecer informações sobre os efeitos corrosivos ou irritantes de uma substância em olhos de mamíferos.

2. FUNDAMENTO

A substância-teste é aplicada em dose única a um dos olhos de cada um dos animais de experimentação. O olho não-tratado é usado como controle.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Irritação Ocular: é a produção de alterações reversíveis no olho após a aplicação de uma substância à superfície anterior do olho.

3.2. Corrosão Ocular: é a produção de lesões teciduais irreversíveis no olho após aplicação de uma substância à superfície anterior do olho.

4. MATERIAL NECESSÁRIO

4.1. Animais de experimentação
Usar coelhos albinos, adultos e saudáveis.

4.2. Equipamentos
Lâmpadas de fenda, biomicroscópio ou lupa binocular.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Animais
Pelo menos 3 animais devem ser usados.

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. A temperatura da sala de experimentação deve ser de 20 ± 3°C e a umidade relativa entre 30 a 70%. Quando a luz for artificial aconselha-se um ciclo de 12 horas no claro e outro de 12 horas no escuro. Dietas convencionais de laboratório são indicadas, com suplementação de água "ad libitum".

Ambos os olhos dos animais serão examinados 24 horas antes do início do teste. Só devem ser utilizados animais sem lesões oculares.

5.2. Doses

No caso de substâncias líquidas, uma dose de 0,1 ml deve ser usada. No caso de substâncias sólidas, pastosas ou substâncias particuladas, a quantidade deve ser aproximadamente 100 mg e dissolvida em 0,1 ml. Se o material for sólido ou granuloso, deve-se macerá-lo até pó fino. Para testar substâncias em aerossol, o olho deve ser mantido aberto e a substância aplicada num único jato de cerca de um segundo de duração, a uma distância de 10 cm. Substâncias fortemente ácidas ou alcalinas, bem como as que demonstram efeitos corrosivos ou irritação em estudos de exposição cutânea, não requerem avaliações quanto à irritação ocular, pois têm provável ação corrosiva ou irritante.

5.3. Execução

A substância-teste deve ser colocada no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, após o afastamento suave da pálpebra inferior. As pálpebras são mantidas juntas por cerca de um segundo, logo após a instilação. O outro olho permanece não tratado e serve como controle. Se houver indícios de que a substância possa causar dor, um anestésico local pode ser usado antes da instilação da substância, cuidando-se para anestesiar também o olho-controle.

Os olhos dos animais-teste não devem ser lavados nas 24 horas seguintes à instilação. Se apropriado, após 24 horas, a lavagem dos olhos pode ser executada. Para algumas substâncias sabidamente irritantes oculares, testes adi-

cionais usando coelhos cujos olhos são lavados após instilação da substância podem ser indicados. Nestes casos recomenda-se o uso de 6 coelhos. Quatro segundos após a instilação os olhos de 3 coelhos são lavados e 30 segundos após a instilação os olhos de outros 3 coelhos são lavados. Em ambos os grupos, os olhos dos coelhos são lavados por 5 minutos. O período de observação deve ser suficiente para perceber-se a total reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados. Normalmente o mesmo não precisa ser superior a 21 dias após a instilação.

Os olhos serão examinados após 1, 24, 48 e 72 horas da instilação. Se não houver sinal de irritação após 72 horas o teste pode ser terminado.

Devem ser feitas observações de córnea, íris e conjuntiva. Os graus de reação ocular, de acordo com a Tabela 1, devem ser anotados. Outras alterações oculares significativas devem ser anotadas.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em tabelas, mostrando, para cada animal, o grau de irritação em cada tempo observado, a descrição do grau e da natureza da irritação, a presença de lesões graves e qualquer outro efeito não-ocular.

O relatório do teste deve incluir:

- raça dos animais;
- natureza física, concentração e pH da substância;
- tabulação dos resultados das respostas irritante/corrosivas de cada animal em cada tempo de observação (1,24,48 e 72 horas);
- descrição das lesões graves observadas;
- descrição do grau e natureza da irritação ou corrosão observada;
- descrição do método usado para avaliar a irritação em 1, 24, 48 e 72 horas (p.ex.: lâmpada de fenda, biomicroscópio. fluoresceína);
- descrição de qualquer outro efeito tóxico não-ocular.

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A soma das irritações oculares deve ser avaliada em conjunto com a natureza e reversibilidade das respostas observadas.

8. LITERATURA BÁSICA

8.1. DRAIZE, J.H.; WOODWARD, G.; CALVERYM; H.O.J. Pharmacol Exp. Ther., 83: 377-90, 1944.

8.2. LOOMIS; T.A. Essentials of Toxicology. 2nd. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974. p. 207-213.

8.3. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

8.4. WHO. World Health Organization. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Environmental Health Criteria, 6, I, 1978.

TABELA 1: GRAU DE LESÕES OCULARES

Córnea:

Opacidade: grau de intensidade (área mais densa usada para leitura)

- Sem ulceração	0
- Áreas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes de íris visíveis	1
- Áreas translúcidas facilmente perceptíveis, detalhes de íris levemente obscurecidos	2
- Áreas nacaradas, detalhes da íris invisíveis, tamanho da pupila pouco perceptível	3
- Córnea opaca, íris não perceptível através da opacidade	4

Íris:

Normal	0
Pregas profundamente marcadas, congestão, inchaço, hiperemia moderada ao redor da córnea, qualquer destas alterações ou combinações delas, íris com reação à luz (reação lenta é positiva)	1
Sem reação à luz, hemorragia, destruição total (qualquer uma ou todas)	2

Conjuntiva:

Avermelhamento (refere-se à conjuntiva palpebral e bulbar)

Vasos sangüíneos normais	0
Alguns vasos sangüíneos hiperêmicos	1
Coloração vermelha difusa, vasos individuais não facilmente perceptíveis	2
Coloração vermelho forte, difusa	3

Quemose (Pálpebra e/ou membrana nictitante)

Sem inchaço	0
Inchaço acima do normal (incluindo membrana nictitante)	1
Inchaço evidente com eversão parcial das pálpebra	2
Inchaço com pálpebras semicerradas	3
Inchaço com pálpebras mais que semicerradas	4

F.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE A LONGO PRAZO PARA MAMÍFEROS

F.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE A LONGO PRAZO PARA MAMÍFEROS

Data da revisão: 09/87

1. OBJETIVO

O objetivo dos estudos de toxicidade a longo prazo é caracterizar as ações e efeitos de uma substância em mamíferos após exposição repetida e prolongada. Estes testes permitem avaliar a maioria dos efeitos crônicos e determinar relações dose/resposta.

2. MATERIAL NECESSÁRIO

2.1. Animais

Se possível usar 2 espécies de animais, um roedor (rato) e um não roedor (cão). Entretanto, teste com uma só espécie pode ser suficiente.

Devem ser usados animais de raças bem definidas, resistentes a doenças e livres de alterações congênitas.

Deve-se empregar animais de ambos os sexos, jovens e sadios. Para ratos, o início do experimento deve ser feito com os animais recém-desmamados e aclimatados às condições do laboratório.

Controle das condições ambientais e utilização de técnicas de manejo adequadas são fundamentais para obtenção de resultados significativos.

Fatores como condições de alojamento, doenças intercorrentes, terapia com drogas, impurezas da dieta, ar, água e forragens podem influenciar significativamente o resultado dos experimentos.

O controle de infecções pode ser facilitado se os roedores são mantidos em condições livres de organismos patogênicos. A forragem deve ser esterilizada. Os animais devem ser colocados em gaiolas individuais.

A ração deve ser balanceada e livre de impurezas. Roedores são alimentados "ad libitum", com reposição do alimento pelo menos semanalmente. Os não roedores, como o cão, devem ser alimentados uma vez por dia.

3. PROCEDIMENTO

3.1. Animais

Para roedores cada dose e grupo-controle deve conter, pelo menos, 20 animais de cada sexo, enquanto que, para não-roedores um mínimo de 4 de cada sexo é recomendado.

3.2. Doses

Em estudos crônicos deve-se trabalhar com as relações dose/resposta bem como com a dose-sem-efeito tóxico.

Pelo menos 3 doses devem ser usadas além do controle. A maior dose deve promover alguns sinais de toxicidade sem causar mortalidade excessiva. A menor dose não deve produzir sinais de toxicidade.

3.3. Execução

A freqüência de exposição é diária, podendo variar com a via de administração escolhida.

A via de administração depende das características físico-químicas da substância e da forma como a exposição humana ocorre.

Se a substância for absorvida pelo trato gastro-intestinal, a via oral deve ser preferida. Os animais receberão a substância na dieta, dissolvida na água, ou comida sob a forma de cápsulas.

A exposição cutânea será escolhida para simular esta via quando ela for a principal para o homem, ou como modelo de indução de lesões de pele.

A exposição pela via inalatória pode ser intermitente ou contínua, dependendo dos objetivos do estudo ou da experiência humana que se queira simular. Em ambos os casos os animais são expostos a concentrações fixas da substância-teste. Os animais devem ser testados em câmaras de inalação desenhadas para permitir um fluxo dinâmico de 12 a 15 trocas de ar por hora para garantir o conteúdo de 19% de oxigênio e uma distribuição uniforme da atmosfera. O volume total dos animais não deve exceder 5% do volume da câmara.

Algumas medidas devem ser realizadas para prevenir maiores flutuações na concentração do ar ou maiores discrepâncias na operação das câmaras:

a - fluxo de ar: a velocidade do fluxo de ar através da câmara deve ser controlada continuamente;

b - concentração na câmara: durante o período de exposição a concentração real da substância deve ser mantida o mais constante possível;

c - temperatura e umidade: para roedores a temperatura deve ser mantida a 22 $\pm$ 2°C e a umidade entre 30 a 70%, e devem ser controladas continuamente;

d - medida do tamanho da partícula: as partículas de aerossóis devem ser de tamanho respirável para o animal utilizado. A amostra de ar deve ser representativa da distribuição das partículas às quais os animais são expostos. A análise do tamanho das partículas deve ser realizada frequentemente durante o desenvolvimento do sistema gerador para garantir a estabilidade do aerossol.

A duração da exposição deve ser de, pelo menos, 12 meses.

Exame clínico deve ser realizado diariamente. Sinais clínicos, incluindo alterações neurológicas e oculares, bem como mortalidade, devem ser anotados para todos os animais. O tempo de aparecimento e a progressão de condições tóxicas, incluindo tumores, devem ser avaliados.

O peso corpóreo deve ser tomado individualmente, para todos os animais, uma vez por semana nas primeiras 13 semanas do teste e pelo menos a cada 4 semanas até o término do experimento.

A ingestão alimentar deve ser determinada semanalmente durante as primeiras 13 semanas e então aproximadamente com intervalo de 2 meses, a não ser que alterações de saúde ou de peso corpóreo indiquem a necessidade de outras avaliações.

Exames hematológicos (conteúdo de hemoglobina, volume celular, contagem global de eritrócitos, leucócitos e plaquetas ou outras medidas de capacidade de coagulação) devem ser realizados aos 3 e 6 meses do início do teste e, posteriormente, com intervalos de 6 meses e no final do

experimento, para todos os não-roedores e para 10 ratos de cada sexo de todos os grupos de doses.

Se exames clínicos forem indicativos, a contagem diferencial de leucócitos deve ser realizada, principalmente nos animais com maior dose e nos controles.

Amostras de urina devem ser retiradas de todos não-roedores e de 10 ratos de cada sexo de todos os grupos, se possível dos mesmos ratos, no mesmo intervalo de tempo, utilizados para os exames hematológicos.

As seguintes determinações devem ser realizadas:

- aspecto físico, volume e densidade;
- proteína, glicose, corpos cetônicos, sangue oculto;
- sedimento microscópico.

Com intervalo de 6 meses e no final, amostras de sangue serão retiradas de todos não-roedores e 10 ratos de cada sexo de todos os grupos, se possível, dos mesmos ratos a cada intervalo. Uma amostra pré-teste deve ser coletada dos não-roedores.

As seguintes determinações no plasma devem ser realizadas:

- proteínas total;
- concentração de albumina;
- testes de função hepática (atividade de fosfatase alcalina, alanina - amino - transferase, aspartato - amino-transferase e medida da atividade da gama-glutamil transpeptidase e da ornitina decarboxilase);
- avaliação da glicemia em jejum;
- teste de função renal como determinação da uréia sangüínea.

O exame anatomopatológico, tanto macro como microscópico, é de fundamental importância nos estudos de toxicidade crônica.

Exames microscópicos devem ser realizados em todos os animais, incluindo os que morreram ou que foram sacrificados durante o experimento.

Todas as lesões macroscópicas, tumores ou lesões com suspeita tumoral devem ser preservadas.

Todos os órgãos e tecidos devem ser preservados para exame microscópico, a saber: cérebro, medula, córtex cerebelar e cerebral, pituitária, tireóide e paratireóide, ti-

mo, pulmão, traquéia, coração, aorta, glândula salivar, fígado, baço, rins, adrenais, esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, colo, reto, útero, bexiga urinária, linfonodos, pâncreas, gônadas, órgãos genitais acessórios, glândula mamária feminina, pele, musculatura, nervo periférico, medula espinhal (cervical, torácica e lombar), esterno com medula óssea, fêmur e olhos.

Inflação dos pulmões com fixador deve ser realizada em estudos de intoxicação crônica inalatória, além do estudo de todo trato respiratório, incluindo nariz, faringe e laringe. Cérebro, fígado, rins, adrenais, tireóide e paratireóide e gônadas devem ser pesados.

Todos os tumores visíveis macroscopicamente e outras lesões devem ser examinadas microscópicamente. Além disto, recomenda-se:

a - exame microscópico de todos os órgãos e tecidos preservados de todos os animais que morreram ou foram sacrificados durante o experimento, e dos animais do grupo tratado com a maior dose;

b - orgãos e tecidos que mostrarem anormalidades causadas, ou possivelmente causadas, pela substância-teste devem, também, ser examinados nos grupos tratados com doses menores;

c - no caso do resultado do experimento mostrar evidência de indução de efeitos que possam afetar a resposta tóxica, a dose menor deve ser examinada como no ítem b;

d - o conhecimento da incidência de lesões que ocorrem normalmente em raças dos animais usados é indispensável para a avaliação correta do significado das alterações observadas nos animais tratados.

Os laudos devem conter:

- o laboratório onde o teste foi realizado;
- os resultados obtidos;
- o responsável pela condução e relato do estudo.

O relatório deve incluir todas as informações necessárias para permitir uma descrição completa e precisa do procedimento do teste e uma avaliação dos resultados.

4. LITERATURA BÁSICA

4.1. EPA. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act Test: Guidelines Federal Register, 50(188), 1985.

4.2. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1981.

4.3. WHO. World Health Organization. Guidelines for Evaluation of Drugs for use in man. Technical Report Series 563, 1975.

PARTE G

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO EMBRIO-FETOTÓXICO E CARCINOGÊNICO

G.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO

G.1.1. TESTES DE MUTAGENICIDADE COM MICRORGANISMOS

G.1.1.1. Teste de mutação gênica reversa em Salmonella typhimurium (TESTE DE AMES)

Data de revisão: 10/87

1. OBJETIVO

Este ensaio microbiano tem por objetivo avaliar a capacidade que determinados compostos químicos possuem de causar mutações do tipo "frameshift" e substituição de bases no genoma de linhagens de Salmonella typhimurium, através da reversão do fenótipo $his^- \longrightarrow his^+$ (na presença e/ou ausência de sistemas metabólicos de ativação).

2. DEFINIÇÕES

2.1 O ensaio de mutação reversa em Salmonella typhimurium detecta mutações que ocorrem em um dos genes de cepas dependentes da histidina (his^-), produzindo uma cepa histidina independente (his^+).

2.2 Os compostos mutagênicos do tipo substituição de pares de bases são agentes que causam mudanças de bases no DNA. Em um ensaio de reversão essa troca pode ocorrer no ponto de mutação original ou em qualquer outro ponto do cromossoma.

2.3 Os compostos mutagênicos do tipo "frameshift" são agentes que causam adição ou deleção de um único ou mais pares de bases na molécula do DNA.

3. SUBSTÂNCIAS - PADRÃO

Podem ser incluídas como padrões de referências as seguintes

substâncias químicas, entre outras: azida sódica; 2-nitrofluoreno; 9-aminoacridina; 2-aminoantraceno; ou 2-acetamidofluoreno.

4. METODOLOGIA

Diversos métodos têm sido descritos para a realização do teste. Dentre eles os mais usados são:

. Método de incorporação direta em placa.
. Método de pré-incubação.
. Método de gradiente em placa.

O procedimento descrito a seguir é o do método de incorporação direta em placa descrito por Ames e col. (1975) e Maron e Ames (1983).

4.1 - Princípios

As bactérias são expostas ao produto químico em teste com e sem sistema de ativação metabólica e plaqueadas em um meio mínimo. Após um determinado período de incubação, as colônias revertentes são contadas e comparadas ao número de revertentes espontâneas de uma amostra controle (solvente). Dada à composição do meio, só formarão colônias as células prototróficas para a histidina, provenientes de mutações espontâneas ou originadas de mutações provocadas pela substância química ou amostra em teste. Controles positivos e negativos são sempre incluídos em cada ensaio.

4.2 - Método de Incorporação Direta em Placas

A amostra (0,1 ml) é misturada a uma cultura ("pernoite") de bactérias que é adicionada a 2,0 ml de agar "overlay" ou "top agar" (agar de superfície). Para o teste com ativação metabólica adiciona-se também 0,5 ml da mistura S9 ao agar "overlay" ou "top agar". O conteúdo de cada tubo deve ser homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo meio de agar mínimo seletivo. Após o período de incubação as colônias revertentes devem ser contadas.

Uma variante do teste que tem fornecido bons resultados

consiste na incubação prévia da amostra misturada com as bactérias na presença ou não de S9-mix durante 20 a 30 minutos, seguindo-se do plaqueamento em meio mínimo seletivo.

4.3 - Meio de Cultura

Um meio de cultura mínimo seletivo apropriado deve ser usado em conjunto com um agar de superfície ("overlay" ou "top agar") adequado.

4.4 - Condições de incubação

As placas devem ser incubadas à temperatura de 37ºC, durante um período de 48 a 72 horas.

4.5 - Número de placas

Todas as placas devem ser feitas em duplicata ou triplicata.

4.6 - Seleção da Cepa

4.6.1. Organismo indicador

As cepas de Salmonella typhimurium (dependentes da histidina = his^-) utilizadas no teste foram especialmente desenvolvidas por Ames, sendo as cepas TA98, TA100, TA1535 e TA1537 as mais comumente utilizadas. Dependendo do objetivo, condições do teste e quantidade da amostra, também poderão ser empregadas as cepas TA102, TA104 e TA97a.

Características genéticas das cepas de Salmonella typhimurium:

Mutações Adicionais					
Cepa	Gene afetado	Reparo	LPS	Fator R	Tipo de Mutação detectada
TA-1535	his G	Δ uvrB	rfa	-	Substituição de bases
TA-1537	his G	Δ uvrB	rfa	-	Frameshift
TA-98	his G	Δ uvrB	rfa	pKM101	Frameshift
TA-100	his G	Δ uvrB	rfa	pKM101	Substituição de bases

- LPS= permeabilidade da camada lipopolissacarídica

- his= mutação no gene responsável pela síntese da histidina

- Fator R= Resistência à ampicilina.

4.6.2. Preparo e armazenamento das culturas bacterianas: Diversos métodos de preparo e armazenamento das culturas podem ser utilizados.
A dependência da histidina de cada cepa deve ser sempre verificada, bem como outras características fenotípicas, como sensibilidade ao cristal-violeta (rfa) e resistência à ampicilina (Fator R), sensibilidade à radiação ultra-violeta germicida (UV). A taxa de reversão espontânea deve ser sistematicamente verificada e deverá estar na média esperada tal como relatada na literatura por Ames e col. (1975) e Maron e Ames (1983), ou estabelecida no laboratório sob controle de valores históricos. A placa "master" para cada cultura deve ser preparada à partir de cepas congeladas e testadas quanto às características genéticas.

4.6.3. Crescimento bacteriano

Devem ser utilizadas culturas recentes (pernoite) de bactérias no fim da fase exponencial ou no início da fase estacionária da curva de crescimento (aproximadamente 10^8 - 10^9 células/ml).

4.7 - Ativação metabólica

As bactérias são expostas à substância ou amostra em teste na ausência e na presença de um sistema de ativação metabólica. O sistema mais comumente usado é a fração microssomal S9-mix homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial) suplementado com um cofator, preparado a partir de fígado de roedores, tratados com agentes indutores de enzimas. Outras espécies, tecidos ou técnicas podem também ser empregados. A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica.

4.8 - Grupos-controle

4.8.1. Controles

Controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada ensaio. Os controles positivos devem assegurar a capacidade de resposta da cepa ao mutágeno e a eficácia do sistema de ativação metabólica.

4.8.2. Controles positivos específicos para as cepas

Um controle positivo específico para cada cepa deve ser incluído no ensaio. Exemplos de controles positivos específicos para cada cepa são:

. cepa TA1535 e TA100: azida sódica
. cepa TA98: 2-nitrofluoreno
. cepa TA1537: 9-aminoacridina

4.8.3. Outros controles positivos

Outras substâncias de referência podem ser usadas como controle positivo, entretanto devem ser selecionadas de acordo com o tipo de sistema de ativação usado no ensaio.

4.9 - Ensaio da amostra

4.9.1. Solvente

As substâncias químicas e/ou amostra em teste e o controle positivo padrão devem ser dissolvidos em um solvente adequado.

4.9.2. Concentração de exposição

O teste deve ser inicialmente realizado com uma variação ampla de concentrações. Quando necessário, os testes positivos podem ser confirmados usando-se pequenas variações de concentrações.

Dentre os critérios levados em consideração sobre a concentração limite da substância química em teste podem ser mencionadas a citotoxicidade e a solubilidade. A citotoxicidade da substância química pode ser alterada na presença do sistema de ativação metabólica. A toxicidade pode ser evidenciada pela redução do número de cepas revertentes espontâneas, pela ausência de "background" ou pelo declínio de sobrevivência das culturas expostas à ação da amostra em teste. Para produtos químicos solúveis e não tóxicos a maior concentração testada deve ser determinada em cada caso. Geralmente uma concentração máxima de 5 mg por placa é considerada aceitável. Pelo menos 5 (cinco) concentrações diferentes da substância em teste devem ser usadas. As amostras aquosas ambientais (água, esgoto ou efluentes industriais) poderão ser testadas diretamente. Entretanto, recomenda-se concentrar as amostras através de métodos apropriados (ex: através de resinas XAD2/XAD4 ou extração líquida x líquida com diclorometano, etc.). O volume da amostra a ser concentrado é variável, pois vai depender do tipo da amostra e ao fim a que se destina (normalmente o volume concentrado varia de 2 a 10 litros para águas brutas e de 20 a 100 litros para águas tratadas). O volume de extrato orgânico ou amostra concentrada a ser testada poderá variar de 0,1 a 1,0 ml. Caso seja necessário pode-se diluir o extrato orgânico para se determinar a concentração mínima efetiva (CME).

5. RESULTADOS

5.1 - Apresentação

Os resultados devem ser apresentados como número de colônias revertentes por placa, para cada concentração. O número de colônias revertentes, tanto no controle negativo (solvente) como no controle positivo devem ser também apresentados.

A contagem individual das placas e a média de colônias revertentes por placa e o desvio padrão também poderão ser apresentados, tanto nos controles negativos como nos positivos e na amostra.

5.2 - Avaliação estatística

Várias técnicas estatísticas são aceitas na avaliação dos resultados do teste de Ames (MARON & AMES, 1983).

5.3 - Interpretação

Considerando-se que os procedimentos utilizados na avaliação da mutagenicidade de um produto são semi-quantitativos, os critérios utilizados para se determinar os efeitos positivos merecem cuidadosa análise.

5.3.1. Resultado positivo

Existem vários critérios para a determinação de um resultado positivo. Um deles é através da demonstração do aumento estatisticamente significante do número de colônias revertentes em relação à curva dose-efeito, ou seja, se ocorrer aumento do número de mutantes em função de concentração da substância, para. no mínimo, duas concentrações, desde que o número de revertentes seja igual ou superior ao dobro da taxa de reversão espontânea.

Um outro critério seria através da detecção de uma resposta positiva reprodutível e estatisticamente significante para pelo menos uma das concentrações da amostra.

Os resultados, usualmente, são expressos através da CME (concentração mínima efetiva) da amostra

que produz mutação em qualquer uma das cepas de Salmonella typhimurium utilizadas no ensaio ou, simplesmente, através da demonstração de atividade mutagênica em uma ou mais cepas, de acordo com o critério estabelecido.

Uma amostra é considerada mutagênica quando o número de colônias revertentes induzidas for igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo (solvente). O fator 2 deve ser usado apenas como guia, pois quando uma cepa apresentar taxa de mutação espontânea muito baixa, o número de revertentes deve ser igual ou superior ao triplo, a fim de assegurar significância.

A freqüência de mutações para prototrofia em relação à histidina pode ser expressa em relação à massa do produto sólido ou extrato orgânico em micrograma por placa (CME em ug/placa) e em relação a amostras líquidas, em microlitros por placa (CME em ul/placa).

Para amostras aquosas o critério utilizado é ligeiramente diferente do aplicado para amostras sólidas ou líquidas não aquosas. Usualmente os resultados dos ensaios de mutagenicidade são expressos através da razão da mutagenicidade (RM).

RM = E/C, onde E = número de colônias revertentes na placa-teste (revertentes espontâneas + revertentes induzidas)

C = número de colônias revertentes na placa, do controle negativo (revertentes espontâneas).

Quando a razão de mutagenicidade for igual ou superior a 2, geralmente considera-se que a amostra apresenta atividade mutagênica, entretanto outros critérios poderão ser utilizados. A curva dose - resposta poderá também ser feita.

O volume exato do extrato orgânico ou amostra aquosa testada deve ser informado, para que se possa calcular o volume correspondente à amostra de água original.

5.3.2. Resultado negativo

Em geral considera-se um resultado negativo quando o número de colônias revertentes da amostra e do controle negativo padronizado for inferior ao dobro da taxa de reversão das colônias revertentes espontâneas.

Os critérios descritos são os mais comumente utilizados, entretanto, não são absolutos e uma série de outros fatores poderão ser considerados na avaliação e interpretação final dos resultados. No caso de obtenção de resultados duvidosos ou aberrantes recomenda-se realizar novo ensaio.

O teste de Ames é bastante sensível e reprodutível. Entretanto, cuidados especiais devem ser tomados com relação à padronização da metodologia, verificação das características genéticas das cepas empregadas, atividade da fração S9, bem como ao controle de qualidade dos meios de cultura e vidraria utilizados no ensaio, a fim de se assegurar a confiabilidade dos resultados.

5.4 Avaliação do ensaio

5.4.1. - Resultados positivos

Indicam que, sob as condições do ensaio, o produto químico ou amostra em teste induz mutações de ponto por substituição de bases ou do tipo "frasmeshift" no genoma desses microrganismos.

5.4.2. - Resultados negativos

Indicam que, sob as condições do ensaio, o produto químico ou amostra não apresenta atividade mutagênica em Salmonella typhimurium.

Todas as avaliações e interpretações dos resultados apresentados no laudo final devem basear-se unicamente na demonstração da presença ou ausência de atividade mutagênica.

A decisão final, entretanto, deve ficar a cargo de especialistas de reconhecida competência na área.

5.5 Laudo Técnico

O laudo técnico sobre o teste deve incluir as seguintes informações:

. Tipos de cepas empregadas.
. Sistema de ativação metabólica utilizada.
. Concentração da amostra ou substância química empregada e a dose selecionada.
. Teste de toxicidade do produto químico ou amostra em teste.
. Controles positivos e negativos utilizados.
. Contagem individual das placas e média aritmética do número de colônias revertentes por placa e o desvio padrão.
. Curva dose-resposta (se aplicável).
. Avaliação estatística (se aplicável).
. Descrição dos resultados obtidos.
. Interpretação dos resultados.

6. REFERÊNCIAS E BIBLIOGRAFIA

6.1 AMES, B.N; McCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res., 31: 347-364, 1975.

6.2 BRUSICK, D.J. & YOUNG, R.R. IERL-RTP. Procedures Manual: Level 1. Environmental Assessment Biological Tests. Washington, EPA, 1981. p.138 (EPA 600/8-81-024).

6.3 BRUSICK, D.J; YOUNG, R.R.; MYHR,B.C & JAGANNATH, D.R. Quality control and quality assurance procedures for Level 1. Health effects bioassays. Washington, EPA, 1983.p. 112 (EPA-600/8-83-034).

6.4 De SERRES, F.J.. & SHELBY, M.D. The Salmonella mutagenicity assay: recomendations. Science, 203: 563-565, 1979.

6.5 DRESSLER, M. Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers. Chromat. Rev., 119: 168-206, 1979.

6.6 JUNK, G.A. et alii. Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. J.Chromat., 99: 745-762, 1974.

6.7 ISO. Concentration procedures for liquid samples for mutagens testing-liquid/liquid extraction. Feb., 1980 (ISO/TC 147/SC5/WG7-N50).

6.8 MARON, D. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215, 1983.

6.9 McMAHON, R.E.; CLIVE, J.C. & THOMPSON C.Z. Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. Cancer Res., 39: 682-693, 1979.

6.10 THOMPSON, E.D. & MELAMPY, P.J. An examination of the quantitative suspension assay for mutagenesis with strains of Salmonella typhimurium. Environ. Mutag., 3: 453-465, 1981.

6.11 VOGEL, H.J. & BONNER, D.M. Acetylorinithinase of E.coli: partial purification and some properties. J.Biol. Chem., 218: 97-106, 1956.

G.1 1.2. TESTE DE CONVERSÃO GÊNICA MITÓTICA, MUTAÇÃO REVERSA E RECOMBINAÇÃO MITÓTICA - "crossing over" em Saccharomyces cerevisiae

Data da revisão: 10/87

1. OBJETIVO

O teste tem por objetivo avaliar agentes químicos quanto à sua atividade mutagênica, utilizando-se cepas de S. cerevisiae, na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação.

Diversas linhagens podem ser empregadas. Entretanto, a linhagem D7 tem-se mostrado bastante apropriada na pesquisa de mutagênese provocada por agentes químicos, inclusive amostras ambientais, sendo um dos poucos organismos eucarióticos adequados ao estudo de indução de recombinação mitótica, conversão gênica e mutação reversa.

Os ensaios com leveduras têm grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade com bactérias.

2. DEFINIÇÕES

2.1 Conversão gênica mitótica

O ensaio de conversão gênica mitótica na levedura Saccharomyces cerevisiae mede a conversão de alelos inativos diferenciais para alelos do tipo selvagem pela ação de agentes mutagênicos. Os alelos envolvidos são: trp5-12 e trp5-27. As cepas de levedura diplóide heterozigótica têm dois alelos inativos diferentes no mesmo locus do gene. A presença desses alelos causa uma dependência nutricional, isto é, essas células crescem somente em meio suplementado com um nutriente específico, no caso o triptofano. Quando ocorre a conversão do gene, um fenótipo do tipo selvagem muito ativo é produzido a partir desses alelos inativas através de uma recombinação intragênica.

Essas colônias do tipo selvagem crescem em meio carente do nutriente específico (meio seletivo).

2.2 Mutações reversas

Essas mutações envolvem alterações dentro de um gene, incluindo mutações do tipo substituição de pares de bases ou do tipo "frameshift" no DNA da célula. A mutação pode ser detectada pelo aparecimento de colônias que não são dependentes de isoleucina em meio mínimo seletivo.

A linhagem D7 é homozigota para um defeito no locus ilvI-92, sendo, por esse motivo, incapaz de crescer na ausência de isoleucina. Uma mutação reversa nesse locus torna a célula prototrófica para a isoleucina, podendo ser selecionada em meio mínimo e suplementado com adenina e triptofano.

2.3 Recombinação mitótica ou "crossing-over" mitótico

O ensaio avalia o dano primário no DNA induzido por determinados compostos químicos, através do estímulo à recombinação. O "crossing-over" mitótico pode ser visualizado através do aparecimento de colônias rosas ou vermelhas devido à formação de células homozigotas do genótipo ade2-40/ade2-40 (vermelha) e ade2-119/ade2-119 (rosa), a partir de cepas originalmente heterozigotas que formam colônias brancas ade2-40/ade2-119.

A linhagem diplóide D7 combina dois diferentes alelos do locus ade2, ou seja, é heterozigota quanto à ade2. Mutantes defectivos do locus ade2 exigem adenina e acumulam pigmento vermelho. A linhagem D7 possui o alelo defectivo ade2-40, que causa exigência absoluta de adenina para o crescimento e formação de colônias vermelhas em meio com baixa concentração de adenina. O outro alelo defectivo ade2-119 causa uma leve exigência de adenina, e na ausência desta substância há uma certa taxa de crescimento celular, com a formação de colônias rosas. O diplóide que contém esta combinação heterozigota ade2-40/ade2-119 forma colônias brancas, uma vez que estes dois alelos se completam. O "crossing-over" mitótico recíproco entre o locus ade2 e o centrômero conduz, em 50% dos casos, à segregação de núcleos filhos dos tipos homozigótico para ade2-40 e homozigótico para ade2-119, o que leva à formação de colônias com setores vermelhos e rosas.

3. SUBSTÂNCIAS-PADRÃO

Dependendo do ensaio e das amostras a serem analisadas, diferentes padrões de referência poderão ser utilizados, como: sulfato de hidrazina; 2-acetilaminofluoreno; 5-etil metano sulfonato; dietil nitrosamina. Outros padrões adequados poderão ser empregados.

4. METODOLOGIA

4.1 Princípio

As cepas de S. cerivisiae D7 são expostas ao produto químico ou plaqueadas em meios seletivos mínimos carentes do nutriente específico (triptofano para o ensaio de conversão gênica mitótica, isoleucina para o ensaio de mutação reversa ou adenina para o ensaio de "crossing-over" mitótico). A linhagem D7 permite monitorar vários tipos de alterações genéticas; no entanto, apenas o "crossing-over" mitótico pode ser demonstrado de forma inequívoca sem análise genética adicional. As colônias do tipo selvagem ou aberrantes que crescerem no meio seletivo correspondente, resultantes da conversão gênica, "crossing-over" mitótico ou mutação reversa, são contadas.

4.2 Seleção da cepa

4.2.1. Cepas de leveduras utilizadas

Até a presente data, a cepa de S.cerevisiae D7 é a mais recomendada para este ensaio. Entretanto outras cepas apropriadas também poderão ser utilizadas.

4.2.2. Meio de cultura

O meio glicose YEP completo e meio mínimo enriquecido com o fator de crescimento apropriado podem ser utilizados para o crescimento e manutenção das culturas. Entretanto outros meios apropriados também poderão ser utilizados.

4.2.3. Preparo e armazenamento das culturas de leveduras

Diversos métodos de preparo e armazenamento das culturas podem ser utilizados. As características fenotípicas específicas devem ser sempre verificadas e documentadas.

4.3 Seleção das culturas

As células devem crescer até a fase estacionária com aeração em meio líquido enriquecido com fatores de crescimento. Em seguida devem ser semeadas em meio seletivo para se determinar a taxa de conversão espontânea.

Culturas com uma alta taxa de conversão espontânea devem ser descartadas.

4.4 Ativação metabólica

As leveduras devem ser expostas ao produto químico ou amostra em teste na ausência ou presença de um sistema de ativação metabólica apropriado.

O sistema mais comumente utilizado é a fração microssomal S9-mix homogeneizado de fígado de rato, fração pós mitocondrial, suplementado com um cofator preparado a partir de fígado de roedores, tratados com agentes indutores de enzimas.

A fração S9 revela se o produto químico ou amostra é mutagênica em sua forma original, ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica.

4.5 Grupos-controle

4.5.1. Controles

Controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada ensaio. Os controles positivos devem assegurar a capacidade de resposta de cepa ao agente mutagênico e a eficácia do sistema de ativação metabólica.

4.5.2. Controles positivos de ação direta

O sulfato de hidrazina é um exemplo de controle positivo para ensaios sem ativação metabólica.

4.5.3. Controles positivos que asseguram a eficácia do sistema de ativação.

O controle positivo padrão deve ser selecionado com base no tipo de sistema de ativação metabólica

usado no teste. O 2-acetilaminofluoreno é um exemplo de controle positivo em ensaios onde se utiliza a fração pós-mitocondrial de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas tais como o Aroclor 1254. Outros controles positivos poderão também ser utilizados.

4.6 Ensaio da Amostra

4.6.1. Solvente

Os compostos químicos e/ou amostras em teste e os controles positivos padrões devem ser dissolvidos em um solvente adequado para o uso no ensaio (acetona, etanol ou dimetil-sulfóxido).

4.6.2. Concentração de exposição

O teste deve ser inicialmente realizado com uma variação ampla de concentrações. Quando necessários, os testes positivos podem ser confirmados usando-se pequenas variações de concentrações.

Dentre os critérios levados em consideração para a determinação da concentração limite do composto químico em teste podem ser mencionadas a citotoxicidade e a solubilidade. A citotoxicidade de um produto químico pode ser alterada na presença do sistema de ativação metabólica. A toxicidade pode ser evidenciada pela redução do número de cepas revertentes espontâneas, pela ausência de "back-ground" ou pelo declínio de sobrevivência das culturas expostas à ação da amostra em teste. Para produtos químicos solúveis e não tóxicos, a maior concentração testada deve ser determinada em cada caso.

As amostras ambientais (água, esgoto, ar, sedimento ou resíduos sólidos) poderão ser testadas diretamente, entretanto recomenda-se concentrá-las através de métodos apropriados (ex.: através de resinas XAD2 ou XAD4, extração líquida x líquida com diclorometano, etc.). O volume da amostra a ser concentrado é variável, pois vai depender do tipo da amostra e ao fim a que se destina (normalmente o volume concentrado varia de 2 a 10 litros para águas brutas e de 20 a 100 litros para águas tratadas).

O volume de extrato orgânico ou amostra concentrada a ser testada poderá variar de 0,1 a 3,0 ml. Caso seja necessário pode-se diluir o extrato orgânico.

4.7 Execução do teste

As culturas devem ser tratadas em uma suspensão líquida. As culturas com baixa frequência de convertentes (trp5+) e de revertentes espontâneas devem ser centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em meio líquido até a densidade apropriada (3×10^7 células/ml). As células ressuspendidas devem ser expostas ao produto químico ou amostra em teste na presença de um sistema de ativação metabólica. O tratamento é interrompido adicionando-se água gelada, e, ao final, as células devem ser centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em água destilada antes de serem plaqueadas.

Procede-se ao plaqueamento de 0,1 ml de cada concentração da amostra nas seguintes condições:

- em meio completo (SCM7) para a determinação das sobreviventes e da indução de recombinantes por "crossing-over";
- em meio mínimo suplementado faltando triptofano ou isoleucina para a determinação de indução de recombinantes por conversão gênica e de revertentes para a mutação homozigótica respectivamente. Ao final do período de incubação as placas são contadas, fazendo-se a diferenciação dos vários tipos presentes: sobreviventes, revertentes, convertentes ou aberrantes (colônias vermelhas, rosas ou com setores vermelhos e rosas).

4.8 Número de culturas

Devem ser usadas pelo menos 10 placas individuais por concentração testada e também para os controles.

4.9 Meio de cultura

Meio de cultura mínimo ou completo apropriado.

4.10 Condições de incubação 28ºC

4.10.1 Mutação reversa: 4 à 6 dias para as sobreviventes,
6 a 10 dias para os revertentes.

4.10.2 "Crossing-over": 4 a 6 dias para as sobreviventes, 6 a 8 dias para as colônias setorizadas ou aberrantes.

4.10.3 Conversão gênica: 4 a 6 dias para as convertentes e sobreviventes.

5. RESULTADOS

5.1 Apresentação

Devem ser apresentadas contagens individuais das placas da amostra em teste e controles para as colônias convertentes, sobreviventes e aberrantes. A média das colônias por placa e o desvio padrão, bem como a frequência de sobreviventes, revertentes, convertentes e aberrantes para cada diluição e controle devem ser apresentados.

5.2 Avaliação estatística

Várias técnicas estatísticas são aceitas na avaliação deste ensaio. O teste mais utilizado é o teste "T" de Student. Entretando, outros testes apropriados poderão ser utilizados.

5.3 Interpretação dos resultados

Existem vários critérios para a determinação de um resultado positivo: um deles é através da demonstração do aumento estatisticamente significante do número de colônias convertentes, revertentes, sobreviventes ou aberrantes em relação à curva dose-efeito. O outro critério pode ser baseado na detecção de uma resposta positiva reprodutível e estatisticamente significante para pelo menos uma das concentrações da amostra.

O teste será considerado positivo quando as frequências de revertentes de recombinantes mitóticos ("crossing-over" e conversão gênica) estiverem significativamente acima das frequências espontâneas.

A concentração do produto químico e o volume exato do

extrato orgânico ou amostra a ser testada deve ser informado, para que se possa calcular o volume correspondente à amostra original.

5.4 Avaliação do teste

5.4.1. Resultados positivos

Indicam que, nas condições do ensaio, o produto químico ou amostra em teste causa conversão gênica mitótica e /ou "crossing-over" e/ou mutação reversa na levedura S.cerevisiae.

5.4.2. Resultados negativos

Indicam que, sob as condições do ensaio, o produto químico ou amostra em teste não causa conversão gênica mitótica e/ou "crossing-over" e/ou mutação reversa na levedura S.cerevisiae.

5.5 Laudo técnico

O laudo técnico sobre o ensaio deve incluir as seguintes informações:

- Tipos de cepas empregadas.
- Sistema de ativação metabólica utilizado.
- Concentração da amostra empregada e dose selecionada.
- Teste de toxicidade da amostra.
- Controles negativos e positivos.
- Curva dose-resposta (se aplicável).
- Avaliação estatística.
- Descrição dos resultados.
- Interpretação dos resultados.

6. REFERÊNCIAS E BIBLIOGRAFIA

6.1 AMES, B. N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for dettecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31: 347-364. 1975.

6.2 CALLEN, D.F. & PHILPOT, R.M. Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res., 45: 309-324, 1975.

6.3 ISO. Saccharomyces D7/mammalian microsome mutagenesis assay for sterile aquous mixtures. August, 1980. (ISO/TC147/SC5/WG7).

6.4 ZIMMERMANN; F. K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeart Saccharomyces cerevisiae. Handbook of mutagenicity test procedures. In: KILBY, B.J.; LEGATOR, M.; RAMEL, C. Eds. Amsterdam; Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. p. 119-34.

6.5 ZIMMERMANN, F. K.; KERN, R. & ROSENBERGER, H. A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation. Mutat.Res., 28: 381-388, 1975.

G.1.1.3 CROMOTESTE (Teste baseado na indução das funções SOS)

Data da revisão: 10/87

O Cromoteste fundamenta-se na avaliação quantitativa de uma das funções SOS, a filamentação bacteriana. Para facilitar a medida da amplitude deste fenômeno, o gene estrutural que codifica para a síntese da enzima beta-galactosidase foi colocado, mediante o emprego de técnicas de biotecnologia do DNA recombinante, sob o controle do operador de um gene do qual depende a filamentação. Assim, a determinação da quantidade desta enzima acumulada no interior de bactérias tratadas com a substância em análise permite determinar a intensidade da filamentação e, consequentemente, a atividade genotóxica de um componente químico.

As cepas de E.coli. empregadas neste teste apresentam as seguintes características:

- O gene estrutural da beta-galactosidase, lacZ, foi introduzido no cromossomo bacteriano, ficando sob controle do operador do gene sulA, também designado como sfiA, um dos responsáveis pela filamentação.
- Uma deleção foi criada na região do gene lacZ, previamente existente no cromossomo da célula, de tal forma que a síntese da enzima beta-galactosidase é inteiramente dependente da transcrição do gene controlado pelo operador da sulA.
- As bactérias produzem a enzima fosfatase alcalina de forma constitutiva, permitindo utilizar o teor intracelular desta enzima como um indicador da biossíntese total de proteínas, o que torna muito importante, visto esta poder ser afetada pela ação tóxica de diversas drogas.
- As células são portadoras da mutação rfa, razão de serem bastante permeáveis a diversos compostos químicos.
- Algumas das cepas empregadas são deficientes em reparação por excisão, por possuírem uma mutação no locus uvrA.

O teste resume-se em determinar, após tratamento com determinada concentração da substância química, as quantidades de beta-galactosidase e de fosfatase alcalina sintetizadas. Quando necessário, o tratamento das bactérias com o composto deve ser feito em presença de mistura metabolizante, isto é, de S9.

1. TIPOS DE CROMOTESTE

Testes qualitativos podem ser realizados mediante a adição, ao meio de cultura gelosado, de um composto, o 5-bromo 4-cloro 3-inodolil-beta-D-galactosídeo, cuja hidrólise pela beta-galactosidase gera o aparecimento de cor azul. Para a realização do ensaio, uma alíquota da cultura bacteriana é espalhada na superfície livre do meio gelosado contido em uma placa de Petri, com ou sem S9. Em seguida, um pequeno volume de solução da substância-teste é colocado no centro da placa, a qual é incubada a 37ºC, por cerca de 18 horas. O surgimento de um anel corado em torno da zona de inibição da formação de colônias indica tratar-se de um composto capaz de induzir as funções SOS, isto é, mutagênico e/ou potencialmente oncogênico.

Para a realização de testes quantitativos, uma cultura em fase exponencial de crescimento é diluída em meio adequado ou em uma preparação de S9. Alíquotas são incubadas com diferentes concentrações da substância, por 2 horas a 37ºC, com agitação. Após o término da incubação, as atividades de beta-galactosidase e de fosfatase alcalina são determinadas espectrofotometricamente.

Se o composto for capaz de interferir no desenvolvimento da cor necessária às dosagens, a cultura deverá ser centrifugada. Os substratos empregados para as dosagens das duas enzimas são respectivamente, o o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosídeo (ONPG) e o p-nitrofenil fosfato dissódico (PNPP).

Em todos os testes devem ser empregados controles positivos e negativos adequados, tais como o solvente utilizado e substâncias capazes de induzir as funções SOS.

Dentre as variações do cromoteste, o procedimento aqui descrito é o referente aos ensaios realizados mediante incubação, em meio líquido das células bacterianas com o agente em estudo, seguindo-se a determinação das quantidades acumuladas das duas enzimas. Outras técnicas têm sido igualmente utilizadas, algumas visando, essencialmente, à realização de ensaios quantitativos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas utilizadas

As cepas de E.coli usualmente empregadas no cromoteste são a PQ35 e PQ37, esta última deficiente em reparo por excisão. Além destas, as linhagens PQ30 e PQ33 podem ser eventualmente utilizadas, embora suas aplicações sejam limitadas, por não serem portadoras da mutação rfa. As demais características genéticas destas duas cepas são equivalentes às de PQ35 e PQ37, respectivamente.

2.2 Conservação, cultivo e verificação das características genéticas das cepas

As cepas são conservadas, geralmente, sob a forma de preparação glicerinada a 20ºC, obtidas a partir de uma cultura em fase estacionária ("pernoite"), em meio La.

Um volume da cultura é misturado com igual volume de glicerol estéril, a 90%, sendo recomendada a elaboração de várias amostras de cada cepa.

A verificação das características genéticas das cepas utilizadas deve incluir:

- Análise de mutação rfa, que pode ser feita pela medida da sensibilidade da cultura ao cristal violeta. Para tal, alíquotas de 0,1 ml de uma cultura estacionária são espalhadas em placas contendo meio La solidificado, pelo método da gelose mole ou "top agar" e , após o tempo necessário ao endurecimento da camada gelosada, 10 ul de solução de cristal violeta (1 mg/ml) são adicionados no centro da placa. Após secagem, a placa é incubada em estufa à 37ºC, por cerca de 18 horas. Um halo de inibição de crescimento deve ser observado no centro da placa.
- Análise da mutação uvrA, cuja presença é confirmada pela sensibilidade da cultura à radiação ultra violeta germicida (UV germicida). Para tal, se um dosímetro não for disponível, estrias de culturas estacionárias de cepas proficientes ou não nos mecanismos de reparação por excição (PQ 35 e PQ37, respectivamente) são feitas em placas de meio L ou La, deixadas secar e em seguida,

irradiadas por 6 segundos, a uma distância de 33 cm de uma lâmina UV-germicida de potencial 15W. Em seguida, as placas são incubadas em estufa a 37ºC por um período de 18 horas, aproximadamente, para a observação de colônias formadas.

- Análise de indutibilidade da beta-galactosidase, que pode ser evidenciada pelo ocorrência de indução da enzima por um agente genotóxico conhecido, como a 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO). Para tal, pode ser realizado o cromoteste com incubação, descrito a seguir, ou empregado o "spot test" no qual 10 ul de uma solução de 4NQO, na concentração de 10 mg/ml, são adicionados no centro de uma placa de meio STA, contendo 100ul de cultura em fase estacionária de cepa a ser testada. Em seguida, a placa é incubada em estufa a 37ºC, por cerca de 18 horas, sendo posteriormente verificada a presença de um anel de indução de enzima, caracterizada pela cor azul, em torno de uma zona de inibição da formação de colônias.
- Análise da síntese constitutiva de fosfatase alcalina, para o que colônias isoladas de placas de meio La são transferidas para papel de filtro impregnado com solução de p-nitrofenilfosfato dissódico (PNPP) a 4mg/ml em tampão Tris em pH 8,8. Após alguns segundos o surgimento de cor amarelada clara no papel de filtro indica a existência de produção constitutiva de fosfatase alcalina.

  As cepas empregadas nas diferentes modalidades de cromoteste costumam ser cultivadas em meio La, a 37ºC, com aeração adequada.

2.3. Meios de cultura, tampões e outras soluções

Informações detalhadas sobres os meios de cultura, tampões e outras soluções empregadas nas diferentes modalidades de cromoteste podem ser obtidas de QUILLARDET & HOFNUNG (1985).

2.4. Preparação de S9

A fração microssomal (S9) pode ser adquirida em alguns fornecedores de reagentes finos ou obtidos no próprio laboratório, usualmente a partir de fígado de rato, conforme MARON & AMES (1983).

2.5. Controles utilizados

São empregados como controles positivos, geralmente, a 4NQO e a aflatoxina B1, esta última em presença de S9.

Outros produtos, como por exemplo a mitomicina C e o benzo (a) pireno podem igualmente ser utilizados. Como solventes (e como controles negativos), a água e o dimetilsulfoxido são apropriados para a maioria dos compostos, podendo, entretanto, haver necessidade de emprego de outras substâncias tais como a dimetilformamida e o etanol.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do cromoteste, uma alíquota de uma cultura em fase estacionária é diluída em 50 vezes em meio La, sendo esta nova cultura incubada a 37ºC, com agitação por 2 horas, tempo necessário para ser atingida a fase exponencial (cerca de $2x10^8$ bactérias/ml). Em seguida, esta cultura é diluída 10 vezes em S9, ou meio L, conforme a ativação metabólica seja ou não empregada. Alíquotas de 0,6 ml da cultura diluída são distribuídas em uma série de tubos contendo 20 microlitros de diferentes concentrações do produto a ser testado e dos respectivos controles, sendo, a seguir, incubadas a 37 C, com agitação por 2 horas. Após este tempo, alíquotas de 0,3 ml, são retiradas de cada tubo e transferidas para uma série de tubos, sendo as duas baterias assim utilizadas para determinação das atividades de beta-galactosidase e de fosfatase alcalina, como descrito a seguir.

3.1 Ensaio para beta-galactosidase

2,7 ml, de tampão B são acrescentados a cada tubo da série correspondente, sendo estes incubados por cerca de 10 minutos a 37ºC e, posteriormente, adicionados 0,6 ml de ONPG (4 mg/ml), para a realização do ensaio enzimático. Após o tempo necessário do desenvolvimento da cor amarela, que pode variar de 10 a 90 minutos, o ensaio é terminado pela adição de 2 ml de solução 1M de Na_2CO_3 a cada tubo. A cor amarela permanece estável por algumas horas, devendo neste tempo ser realizada a leitura da absorbância em 420 nm.

3.2. Ensaio para fosfatase alcalina

2,7 ml, de tampão P são adicionados a cada tubo da série correspondente, sendo estes incubados por cerca de 10 minutos a 37ºC e , em seguida, 0,6 ml de PNPP (4 mg/ml) são acrescentados a cada tubo.

Após o tempo necessário ao desenvolvimento de cor amarela que pode variar de 10 a 90 minutos, a reação é paralisada pela adição de 1 ml de HCl 2,5M a cada tubo, o que causa desaparecimento da cor. Cerca de 5 minutos após esta etapa, o pH do meio é novamente alterado pela adição aos tubos, de 1ml de Tris 2 M, acarretando ressurgimento da cor amarela, que permanece estável por várias horas, período em que deverá ser realizada leitura de absorbância em 420 nm.

Determinados compostos podem interferir na cor desenvolvida, tornando imprecisos os resultados obtidos. Nestes casos, é necessária uma etapa de centrifugação após a incubação das bactérias com as substâncias. A inclusão de um tubo em cada série, o branco colorimétrico, que consiste na substituição por meio L ou S9, do volume empregado da cultura (0,6 ml), é imprescindível.

4. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As atividades de beta galactosidase e de fosfatase alcalina são expressas em unidades enzimáticas (U beta-gal e U p-ase, respectivamente, avaliadas por leituras da absorbância de 420nm, sendo aplicada a fórmula: U=1000 x A 420/t, na qual A420 é o valor da leitura da absorbância em 420nm e t, o tempo, em minutos, necessário ao aparecimento da cor amarela.

A relação R é igual a U beta-gal/U p-ase e serve de indicadora de desrepressão do gene sulA. Para fins de normalização dos gráficos obtidos, é usual dividir o valor de R, para uma determinada concentração (Rc), pelo valor de R encontrado em células não tratadas (Ro) sendo a relação Rc/Ro denominada fator de indução (FI).

A potência indutora das funções SOS por um dado composto químico costuma ser expressa por meio do SOSIP ("SOS-inducing potency"), que equivale ao FI avaliado por unidade de massa da substância-teste (em microgramas ou em nanomols). O valor do SOSIP pode ser facilmente obtidos pela inclinação da porção retilínea da curva dose-resposta.

O adequado controle da agitação dos tubos durante o tratamento com a substância é bastante importante para assegurar a reprodutibilidade dos resultados, pois a atuação de alguns compostos, como a aflatoxina B1 e o benzo (a) pireno, é dependente do teor de oxigênio.

5. LAUDO TÉCNICO

O laudo técnico referente ao ensaio deve incluir as seguintes informações:

5.1 cepas bacterianas empregadas;

5.2 condições de obtenção da mistura metabolizante;

5.3 concentrações empregadas da substância;

5.4 utilização, em cada ensaio, de controles positivos e negativos, incluindo sempre um composto que permita aferir a eficiência da mistura matabolizante;

5.5 apresentação dos resultados obtidos em, no mínimo, três ensaios distintos, indicados separadamente, assim como dos valores médios e respectivos desvios-padrão;

5.6 curva dose-resposta;

5.7 descrição dos resultados;

5.8 interpretação dos resultados.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 D'ARI, R. The SOS system. Biochimie, 67: 343.347, 1985.

6.2 FRIEDBERG, E.C. DNA Repair. New York, W.H. Freeman, 1985. 614 p.

6.3 FRIEDBERG, E. C. HANAWALT, P.C. (eds). DNA Repair, Vol 1 part A,B. New York, Marcel Dekker Inc. 1981. 637 p.

6.4 HYMMAN, J.; LEIFER, Z.; ROSENKRANZ, H.S. The E.Coli polA assay: a quantitative procedure for diffusible and nondiffusible chemicals. Mutat.Res., 74: 107-111, 1980.

6.5 LARSEN, K.H. et alii. DNA repair assays as tests for environmental mutagens. A report of the US EPA GENE-TOX program. Mutat.Res., 98: 287-318, 1982.

6.6 LEGATOR, M.S. & MALLING, H.V. The host-mediated assay: a pratical procedure for evaluating potential mutagenic agents in mammals. In; HOLLAENDER, A. ed. Chemicals Mutagens. vol 2. Plenun press, 1971.

6.7 MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat.Res., 113: 173-215, 1983.

6.8 MOREAU, P. DEVORET, R. Potencial carcinogens tested by induction and mutagenesis of prophage lambda in Escherichia coli K12. In: HIATT, H., WATSON, J.D., WINSTEN, J.A. eds. Origins of human cancer. vol 4. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. p. 1451-1472.

6.9 QUILLARDET, P. et. alii. SOS Cromotest a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli to measure genotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 79: 5971-5975, 1982.

6.10 QUILLARDET, P. & HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res, 143: 65-78, 1985.

6.11 SIDEROPOULOS, A.S., SPECHT, SM. & JONES, M.T. Feasibility of testing DNA repair inhibitors for mutagenicity by a simple method. Mutat. Res., 74: 95-105,1980.

6.12 SLATER E.E.; ANDERSON, M.D. & ROSENKRANZ, H.S. Rapid detection of mutagens as carcinogens. Cancer Research, 31: 970-973, 1971.

G.1.2. TESTES DE MUTAGENICIDADE COM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

G.1.2.1 TESTE COM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Data da revisão: 10/87

1. OBJETIVO E FUNDAMENTO

Os leucócitos do sangue circulante de mamíferos, inclusive o homem, podem ser usados para testar uma substância quanto à sua capacidade de produzir aberrações cromossômicas. Esta técnica também pode ser empregada "in vivo". Quando colocados em cultura, na presença de um agente mutagênico - a fito-hemaglutinina - os linfócitos entram em divisão.

Colocando-se na cultura a substância a ser testada, determina-se a frequência de aberrações cromossômicas induzidas. O teste baseia-se num aumento dessas frequências em relação a culturas-controle. No caso do estudo "in vivo" o controle é constituído de indivíduos não expostos à substância em questão.

As substâncias químicas, quanto à ação sobre o DNA, podem ser divididas em duas classes: as que dependem da síntese de DNA (S-dependentes) para exercer seu efeito e as que não dependem (S-independentes). As S-dependentes produzem aberrações na fase S , ou quando as células passam por uma fase S entre a exposição ao agente químico e a observação do efeito. As S-independentes produzem aberrações em todas as fases do ciclo celular.

Como os linfócitos humanos estimulados pela fito-hemaglutinina são capazes de reparar o dano causado ao DNA com muita eficiência, a grande maioria das aberrações causadas pelos agentes S-dependentes por linfócitos "in vivo" será reparada em cultura após o estímulo da fito-hemaglutinina e antes da célula entrar em fase de síntese. Assim, não serão detectadas aberrações produzidas após uma exposição a agentes químicos S-dependentes. O dano induzido nos linfócitos por agentes químicos (S-independentes) poderá ser transformado em uma aberração após o estímulo em cultura.

O dano induzido numa célula-mãe na medula tem alta probabilidade de ser perdido nas sucessivas divisões celulares.

Indivíduos estudados alguns meses após uma exposição vão apresentar uma população de células normais em sua maioria devido à contínua substituição dos linfócitos em circulação.

2. MÉTODO

2.1 Princípio

Os linfócitos são colocados em meio de cultura contendo fito-hemaglutinina e expostos à substância a ser testada. As lâminas são preparadas e coradas, analisando-se as metáfases quanto à presença de aberrações cromossômicas.

2.2 Descrição

O método emprega amostras de sangue de indivíduos que serão expostos ao agente químico "in vitro". No caso de estudo "in vivo" utiliza-se sangue de indivíduos expostos ao agente.

2.3 Seleção da amostra quanto à idade, número e sexo

2.3.1. Estudo "in vitro"

Deve-se usar sangue de doadores de ambos os sexos, adultos, saudáveis, não fumantes, não expostos especialmente a nenhum agente químico, que não estejam em tratamento quimioterápico ou por radiação. Pelo menos 5 indivíduo de cada sexo.

2.3.2. Estudo "in vivo"

Indivíduos de ambos os sexos, sem exposição a outros agentes químicos que não aquele em estudo.
O tamanho da amostra vai depender da disponibilidade e vai determinar a validade das conclusões.

2.4 Controles

2.4.1. Controle negativo

Nos estudos "in vitro" deve-se usar o veículo da substância-teste. Nos estudos "in vivo" os controles devem ser escolhidos dentro da mesma faixa etária, nível sócio-econômico, raça, hábitos alimentares, consumo de álcool e hábito de fumar, não devem estar expostos a nenhum agente químico especialmente, e não devem estar em tratamento quimioterápico ou por radiação

2.4.2. Controle positivo (só no estudo "in vitro")

Um composto reconhecidamente capaz de produzir aberrações cromossômicas "in vitro" deve ser empregado.

2.5 Substâncias a serem testadas

2.5.1. Veículo ("in vitro")

Substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em água, solução salina ou no meio de cultura. Substâncias insolúveis podem ser dissolvidas ou suspensas em veículo apropriado. O veículo não deve interferir com a substância-teste nem produzir efeitos tóxicos.

2.5.2. Doses ("in vitro")

Pelo menos 3 doses devem ser usadas, sendo a de concentração mais elevada 10 vezes maior que a menos elevada.

Além disso, a dose mais alta deve ser, aproximadamente, a metade de uma que causar um efeito tóxico significante.

2.5.3. Exposição ("in vitro")

As culturas devem ser expostas em todas as fases do ciclo celular, isto é, G_0, G_1, S e G_2.

3. PROCEDIMENTO

3.1 Exposição e tempo de coleta

3.1.1. Estudo "in vitro"

As culturas devem ser expostas em G_0, G_1, S e G_2. Depois do tratamento, as células devem ser cultivadas em meio sem a substância-teste. Devem ser feitas duas réplicas para cada tratamento. Quando as células são tratadas em G_0 ou G_1, a fixação deve ser feita de modo que a grande maioria das células esteja em sua primeira divisão "in vitro". O tempo de fixação deverá ser no máximo 52 horas após o início da cultura, a menos que tenha sido verificado que o tratamento produza atraso mitótico. Havendo esse atraso, a coleta deve ser feita em um tempo adequado e que corresponda à primeira divisão celu-

lar. Os estágios S e G_2 podem ser testados quanto à sua sensibilidade acrescentando-se a substância-teste à cultura entre 36-48 horas e fixando-se 52 horas após o início da cultura. Neste caso, havendo, também, atraso mitótico, a fixação deverá ser mais tardia.

3.1.2. Estudo "in vivo"

No caso de acidente, recomenda-se que a coleta de sangue seja feita logo após a exposição ao agente; outras coletas devem ser feitas 1,3 e 6 meses depois. No caso de exposição crônica, deve ser especificado, para cada indivíduo, o tempo de exposição.

3.2 Material

As células são colocadas em cultura e após um intervalo apropriado faz-se a coleta, preparando-se e corando-se as lâminas.

3.3 Análise

Analisam-se 100 metáfases de cada indivíduo, para cada uma das doses estudadas. Conta-se o número de células normais e de células anômalas, bem como a frequência de aberrações por célula. A análise das aberrações cromossômicas deve seguir o critério de PRESTON et alii, (1981).

4. TRATAMENTO DOS RESULTADOS E RELATÓRIOS

4.1 Apresentação dos resultados

Os dados individuais devem ser apresentados em tabelas, incluindo os grupos controle positivo e negativo e os grupos experimentais. As tabelas devem apresentar, para cada animal, a frequência de células com aberrações e a frequência de aberrações por célula, em números absolutos.

4.2 Análise estatística

A escolha do teste estatístico deve levar em conta o

esquema experimental e as transformações necessárias para que se façam comparações múltiplas.

4.3 Interpretação dos resultados

Para se considerar que uma substância deu uma resposta positiva no teste "in vitro" é necessário que se encontre:

- um aumento relacionado com a dose, estatisticamente significante ao nível de 5%, no número de células com aberrações ou na frequência de aberrações por célula, em relação ao controle negativo.
- uma resposta positiva e reprodutível, estatisticamente significante ao nível de 5%, para pelo menos uma das concentrações testadas.

Para se considerar que uma substância deu uma resposta positiva no teste "in vivo" é necessário que se encontre um aumento significante ao nível de 5% no número de células com aberrações ou na frequência de aberrações por célula no grupo exposto em relação ao controle.

A decisão final, entretanto, deve ficar a cargo de um grupo de especialistas na área.

4.4 Avaliação do teste

O resultado da análise das metáfases dos linfócitos do sangue periférico, tanto "in vivo" como "in vitro", fornecem informações quanto à capacidade clastogênica da substância-teste, isto é, sua capacidade de induzir aberrações cromossômicas.

Um resultado positivo obtido "in vivo" em indivíduos expostos é indicativo de exposição à substância clastogênica e dano genético, que pode aumentar o risco para câncer.

A ausência desse aumento, entretanto, não quer dizer que a substância seja isenta de risco. Essas ressalvas não diminuem o valor do sistema como um teste "in vivo". No caso de se utilizarem exposições "in vivo", recomenda-se o uso paralelo de experimentos "in vitro" para se evitar os falsos resultados negativos devido às substâncias S-dependentes.

Resultados negativos "in vitro" indicam que, sob as condições testadas, a substância não induz a produção de aberrações cromossômicas nos linfócitos do sangue periférico.

4.5 Relatório do teste

O relatório deve conter as seguintes informações:

4.5.1. Número, sexo, idade, raça, informação quanto a hábito de fumar e consumo de álcool dos indivíduos escolhidos para o teste "in vitro". No caso de estudo "in vivo", devem ser prestadas informações quanto à natureza e tempo de exposição à substância em estudo, bem como exposição a outras substâncias, à quimioterapia e à radioterapia.

4.5.2. Veículo da substância-teste, doses usadas, critérios para escolha das doses.

4.5.3. Descrição do tratamento das culturas e coleta de amostras, dados toxicológicos, controles negativos e positivos.

4.5.4. Detalhes do protocolo usado no preparo das culturas e lâminas.

4.5.5. Critério para identificação das aberrações cromossômicas.

4.5.6. Relação dose-efeito, se houver.

4.5.7. Análise estatística.

4.5.8. Discussão dos resultados.

4.5.9. Interpretação dos resultados.

G.1.2.2. TESTE DE ALTERAÇÕES NO LOCUS DA HIPOXANTINA-GUANINA-FOSFORRIBOSIL-TRANSFERASE (TESTE CHO/HGPRT)

Data da revisão: 10/87

1. OBJETIVO

Células de mamíferos cultivadas "in vitro" podem ser usadas para detectar mutações induzidas por produtos químicos. Entre os sistemas mais usados destaca-se a avaliação de alterações no locus da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) em células de ovário de hamster chinês (CHO).

2. MÉTODO

2.1 Princípio

O ensaio tem como base a seleção de células resistentes aos análogos de purina 6-tioguanina e 8-azaguanina, como resultado de mutações no locus hgprt. A enzima HGPRT usa o 5-fosforribosil-pirofosfato e a hipoxantina ou a guanina para catalisar a formação de inosina ou guanosina. A 6-tioguanina e a 8-azaguanina são também substratos para a enzima, e a seleção de mutantes baseia-se no fato de que as células que apresentam a sua atividade são capazes de converter os análogos nos nucleotídeos correspondentes, que são letais para as células. Os mutantes deficientes na atividade da HGPRT não têm capacidade para formar estes nucleotídeos, podendo, portanto, se multiplicar na presença dos análogos.

2.2 Descrição

As células são expostas ao produto, na presença ou não de um sistema de ativação metabólica, por um período determinado. Os efeitos citotóxicos são determinados pela capacidade de formação de colônias após este período. As células tratadas são mantidas por um intervalo de tempo suficiente para permitir a expressão fenotípica das mutações induzidas. A frequência de mutação ao final do período de expressão fenotípica é determinada semeando-se um número conhecido de células em meio com e sem o análogo

de purina. Após um período de incubação adequado, as colônias são contadas. O número de colônias mutantes formadas na presença do meio seletivo é calculado em relação ao número de colônias formadas em meio não seletivo.

2.3 Células

CHO ou outras células que apresentam sensibilidade à ação de agentes químicos mutagênicos, alta eficiência de clonagem e baixa frequência de mutação espontânea.

2.4 Tratamento com o produto

As células devem ser tratadas quando na fase exponencial de crescimento, com pelo menos 3 (três) concentrações do produto que produzem 100, 50 e 10% de sobrevivência em relação às células não tratadas, usadas como controle. O tratamento pode ser feito na presença ou não de um sistema de ativação metabólica como o S9.

2.5 Controles positivos e negativos

Devem ser usados controles positivos cuja estrutura química seja similar a do composto testado. Em caso de não se dispor deste tipo de produto, podem ser usados o metanosulfonato de etila (EMS) para os testes sem sistema de ativação metabólica e o 7,12-dimetilbenz (a) antraceno, benzo (a) pireno, dimetilnitrosamina e 2-acetilaminofluoreno para os testes com sistema de ativação metabólica.

3. PROCEDIMENTO

Células na fase exponencial de crescimento devem ser expostas ao produto com ou sem sistema de ativação metabólica.
Na presença deste sistema o tempo de tratamento não deve ser superior a 5 horas; na sua ausência este período pode ser superior a um ciclo de divisão celular.
Ao final do período de tratamento as células devem ser removidas, diluídas em concentrações adequadas, semeadas e incubadas a 37ºC. Após este período as colônias são fixadas, coradas e contadas para a determinação da citotoxicidade.

Para a expressão do fenótipo mutante, as células devem ser cultivadas por um período adequado e a seguir expostas a tioguanina. A eficiência de clonagem da seleção deve ser determinada em meio sem o agente seletivo. Após incubação por um período adequado, as colônias devem ser fixadas, coradas e contadas para a determinação da seleção de mutantes e da eficiência de clonagem.

4. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

4.1 Apresentação dos resultados

Os dados sobre a frequência de mutação e o efeito citotóxico podem ser apresentados sob a forma de tabelas ou gráficos, de maneira a permitir uma avaliação crítica adequada. O número médio de colônias por placa e o desvio padrão devem ser apresentados. A frequência de mutação deve ser expressa como o número de células clonáveis.

4.2 Análise estatística

Vários tipos de análise estatística são aceitáveis.
A escolha do método deve ser feita em função do delineamento experimental e das transformações necessárias para que sejam feitas comparações.

4.3 Interpretação dos resultados

4.3.1. Resultados positivos indicam que o produto testado causa mutação em células somáticas de mamíferos "in vitro".

4.3.2. Resultados negativos indicam que, sob as condições experimentais estabelecidas, a substância testada não é mutagênica para células somáticas de mamíferos "in vitro".

4.4 Relatório sobre o teste

Devem ser incluídas as seguintes informações:

4.4.1. Células usadas, número de passagens, número de células.

4.4.2. Condições de manutenção das células.

4.4.3. Concentrações do produto, solvente usado.
4.4.4. Controles.
4.4.5. Sistema de ativação.
4.4.6. Período de expressão fenotípica.
4.4.7. Relação dose-resposta.
4.4.8. Análise estatística.
4.4.9. Discussão dos resultados.
4.4.10. Interpretação dos resultados.

A decisão final deve ficar a cargo de especialistas na área.

G.1.2.3. TESTE DE METÁFASES DA MEDULA ÓSSEA

Data da revisão: 10/87

1. OBJETIVO

Já é fato conhecido que muitos mutagênicos físicos, químicos e biológicos também induzem aberrações cromossômicas. Daí a necessidade de se incluir, em uma bateria de testes de mutagenicidade, os testes citogenéticos, "in vivo".
O teste de metáfases da medula óssea utiliza o animal vivo, um mamífero (camundongo ou rato) e detecta substâncias clastogênicas, isto é, substâncias que quebram cromossomos, produzindo aberrações cromossômicas estruturais.

2. MÉTODO

2.1. Princípio

Os animais são expostos à substância a ser testada, por uma via apropriada. Após o sacrifício, retira-se a medula óssea e fazem-se preparações que são coradas e observadas ao microscópio. Analisam-se células em metáfase e contam-se as aberrações estruturais, tais como falhas, quebras, rearranjos, aneis dicêntricos e fragmentos acêntricos.

2.2. Descrição

O teste emprega a medula óssea de animais de laboratório expostos à substância a ser testada.

2.3. Seleção dos animais

2.3.1. Espécie e linhagem

Recomenda-se o uso de camundongos. Pode-se, também, usar rato ou outra espécie apropriada.

2.3.2. Idade

Recomenda-se o uso de animais jovens, adultos e saudáveis. No caso de camundongos, entre 7 a 12 semanas de idade.

2.3.3. Número e sexo

Pelo menos 5 de cada sexo para cada grupo experimental e para o grupo controle, para cada dose a ser testada.

2.3.4 Distribuição em grupos

Os animais devem ser sorteados e distribuídos entre os grupos controle e experimental.

2.3.5. Condições de manutenção e alimentação

Os animais devem ser mantidos em dieta equilibrada, recebendo alimento e água "ad libitum". Temperatura, umidade e ciclos de luz devem ser controlados segundo as boas normas de biotério.

2.4. Grupos-controle

2.4.1. Controle negativo

A substância usada como controle negativo deve ser o veículo da substância a ser testada, quando for o caso.

2.4.2. Controle positivo

Uma substância já estabelecida como clastogênica "in vivo" deve ser usada.

2.5. Substâncias a serem testadas

2.5.1. Veículo

Substâncias sólidas e líquidas devem ser dissolvidas ou suspensas em salina isotônica. Substâncias insolúveis devem ser dissolvidas em veículo apropriado, que não interfira com a substância em teste nem produza efeitos tóxicos. Deve-se usar sempre preparações frescas da substância a ser testada.

2.5.2. Doses

Pelo menos 3 doses. Preconiza-se que a dose mais alta seja a dose máxima tolerada (DMT). Sugere-se o uso de 0,75; 0,50; e 0,25 da DL50.

2.5.3. Via de administração

Recomenda-se a exposição intraperitonial ou oral. Quando possível, usar as vias a que o homem está exposto (exposição dérmica, inalação, endovenosa).

3. PROCEDIMENTO

3.1. Tratamento

Geralmente a substância a ser testada é administrada uma

única vez. No entanto, dependendo das informações toxicocinéticas e toxicodinâmicas, pode-se usar um tratamento múltiplo, quando a substância não exibir efeitos citotóxicos na medula nas concentrações empregadas.

3.2. Tempo de coleta das amostras

Deve ser levado em conta o metabolismo do composto e seu efeito na divisão celular. Coletas múltiplas aumentam a probabilidade de detectar um efeito, por exemplo, 3 horas, 6-8 horas, 12-16 horas e 24 horas após a administração da substância.

3.3. Material

A medula óssea é obtida dos fêmures de animais recém-sacrificados. As lâminas são preparadas e coradas.

3.4. Análise

As lâminas devem ser codificadas para a análise. De cada animal analisam-se 100 células. Devem ser seguidos os critérios de PRESTON et alii. (1981) para a classificação das aberrações cromossômicas.

4. TRATAMENTO DOS RESULTADOS E RELATÓRIO

4.1. Apresentação dos resultados

Os dados individuais devem ser apresentados em tabelas, incluindo os grupos-controle positivo, negativo e os grupos experimentais. As tabelas devem apresentar, para cada animal, a frequência de células com aberrações e a frequência de aberrações por célula, em números absolutos.

4.2. Análise estatística

A escolha do teste estatístico deve levar em conta o esquema experimental e transformações necessárias para que se façam comparações múltiplas.

4.3. Interpretação dos resultados

Para se considerar que uma substância deu uma resposta positiva é necessário que se encontre:

- Um aumento relacionado com a dose, estatisticamente

significante ao nível de 5%. no número de células com aberrações ou na frequência de aberrações por célula, em relação ao controle negativo.

- Uma resposta positiva e reprodutível, estatisticamente significante ao nível de 5%, para, pelo menos, uma das concentrações testadas.

A decisão final, entretanto, deve ficar a cargo de um grupo de especialistas na área.

4.4. Avaliação do teste

4.4.1. Os resultados do teste de metáfases da medula óssea fornecem informações sobre a capacidade da substância de produzir aberrações cromossômicas estruturais em células da medula óssea da espécie testada. Sabe-se que a maioria das substâncias que produzem tais aberrações são capazes de induzir o câncer.

4.4.2. Resultados negativos indicam que, sob as condições do teste, a substância em questão não causou dano cromossômico às células da medula óssea da espécie em que foi feito o teste.

4.5. Relatório sobre o teste

O relatório deve conter as seguintes informações:

4.5.1. Espécie, linhagem, idade, peso, número e sexo dos animais em cada grupo tratado e controle.

4.5.2. Veículo da substância testada, doses usadas, critérios para escolha das doses.

4.5.3. Critério para escolha e descrição do tratamento, tempos de coleta das amostras, dados de citotoxicidade, controles positivos e negativos.

4.5.4. Detalhes de protocolo usado para o preparo das lâminas.

4.5.5. Critérios para a identificação das aberrações cromossômicas.

4.5.6. Relação dose-efeito, se houver.

4.5.7. Análise estatística.

4.5.8. Discussão dos resultados.

4.5.9. Interpretação dos resultados.

G.1.2.4. TESTE DO MICRONÚCLEO

Data da revisão: 10/87

1. OBJETIVO E FUNDAMENTO

O teste do micronúcleo é um teste realizado em mamíferos, "in vivo", e detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas), ou interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição eqüitativa dos cromossomos durante a divisão celular. Utilizam-se os eritrócitos policromáticos (EP) da medula óssea de roedores.

Os micronúcleos (MN) - um ou vários por células - resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasaram em relação aos demais em sua migração para os polos do fuso na anáfase. Quando os eritroblastos expelem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócito, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Durante 10 a 24 horas os eritrócitos jovens são policromáticos, isto é, coram-se em azul e não em vermelho. Contam-se os MN apenas dos eritrócitos policromáticos, que se formaram na última mitose por indução da substância mutagênica administrada ao animal. A taxa espontânea de EP com MN é muito baixa, em torno de 3 por mil. O teste se baseia num aumento da frequência de EP com MN na medula de animais tratados.

2. MÉTODO

2.1. Princípio

Os animais são expostos à substância a ser testada por uma via apropriada. Após o sacrifício, retira-se a medula óssea e preparam-se esfregaços que são corados e observados ao microscópio. Conta-se o número de EP com MN em relação a um total de EP.

2.2. Descrição

O método emprega a medula óssea de animais de laboratório expostos à substância a ser testada.

2.3. Seleção dos animais

2.3.1. Espécie e linhagem

Recomenda-se o uso de camundongos. Pode-se, também, usar ratos ou outra espécie apropriada.

2.3.2. Idade

Recomenda-se o uso de animais jovens, adultos e saudáveis. No caso de camundongos, entre 7 a 12 semanas de idade.

2.3.3. Número e sexo

Pelo menos 5 de cada sexo para cada grupo experimental e para o grupo controle, para cada dose a ser testada.

2.3.4. Distribuição em grupos

Os animais devem ser sorteados e distribuídos. entre os grupos controle e experimental.

2.3.5. Condições de manutenção e alimentação

Os animais devem ser mantidos em dieta equilibrada recebendo alimento e água "ad libitum". Temperatura, umidade e ciclos de luz devem ser controlados segundo as boas normas de biotério.

2.4. Controles

2.4.1. Controle negativo

A substância usada como controle negativo deve ser o veículo da substância a ser testada, quando for o caso.

2.4.2. Controle positivo

Uma substância que já se sabe ser indutora de MN "in vivo" deve ser usada.

2.5. Substâncias a serem testadas

2.5.1. Veículo

Substâncias sólidas e líquidas devem ser dissolvidas ou suspensas em salina isotônica. Substâncias insolúveis devem ser dissolvidas em veículo apropriado que não interfira com a substância em teste, nem produza efeitos tóxicos. Deve-se usar sempre preparações frescas da substância a ser testada.

2.5.2. Doses

Pelo menos 3 doses. A dose mais alta deverá ser a

dose máxima tolerada (DMT), aproxidamente 80% da $DL_{50/7}$ ou $DL_{50/4}$.

2.5.3. Via de administração

Recomenda-se a exposição intraperitonial ou oral. Quando possível, usar as vias a que o homem está exposto (dérmica, inalatória, endovenosa).

3. PROCEDIMENTO

3.1. Tratamento

Em geral, os animais são tratados uma única vez. As coletas devem ser feitas de modo a obter uma resposta máxima, o que varia de substância para substância.

Dependendo das informações toxicocinéticas e metabólicas, um tratamento múltiplo é indicado, a 0 hora e 24 horas.

3.2. Tempo de coleta das amostras

No caso de tratamento único, a primeira coleta deve ser pelo menos 12 horas após tratamento. Outras coletas devem se seguir, a intervalos apropriados, sendo a última no máximo 72 horas após o tratamento.

No caso de tratamento múltiplo, a primeira coleta deve ser feita 12 horas após o último tratamento. Outras coletas podem ser feitas após 24 e 72 horas.

3.3. Material

A medula óssea é obtida dos fêmures dos animais logo após o sacrifício. Preparam-se e coram-se os esfregaços.

3.4. Análise

As lâminas devem ser codificadas para análise. De cada animal contam-se 1000 EP. A proporção entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos deve ser determinada para cada animal, contando-se um total de 1000 eritrócitos.

4. TRATAMENTO DOS RESULTADOS E RELATÓRIO

4.1. Apresentação dos resultados

Os dados individuais devem ser apresentados em tabelas incluindo os grupos-controle positivo e negativo e os grupos experimentais. As tabelas devem apresentar, para cada animal, o número de EP contados, o números de EP com MN, a frequência absoluta e a percentagem de células com MN, e, quando for o caso, a proporção entre eritrócitos normo e policromáticos.

4.2. Análise estatística

A escolha do teste estatístico deve levar em conta o esquema experimental e transformações necessárias para que se façam comparações múltiplas.

4.3. Interpretações do resultados

Para se considerar que uma substância deu uma resposta positiva é necessário que se encontre:

- Um aumento relacionado com a dose, estatisticamente significante ao nível de 5%, no número de EP com MN em relação ao controle negativo;
- Uma resposta positiva e reprodutível, estatisticamente significante ao nível de 5%, para, pelo menos, uma das concentrações testadas.

A decisão final, entretanto, deve ficar a cargo de especialistas na área.

4.4. Avaliação do teste

4.4.1. Os resultados do teste do MN dão informação quanto à capacidade de uma substância de induzir a formação de MN em EP na medula óssea da espécie em que foi testada, refletindo o potencial clastogênico ou de perturbação do fuso, da substância em questão.

4.4.2. Resultados negativos indicam que, sob as condições do teste, a substância em questão não produziu MN na medula óssea da espécie utilizada.

4.5. Relatório do teste

O relatório deve conter as seguintes informações:

4.5.1. Espécie, linhagem, idade, peso, número e sexo dos animais em cada grupo tratado e controle.

4.5.2. Veículo da substância testada, doses usadas, critério para escolha das doses.

4.5.3. Critério para escolha e descrição do tratamento, tempos de coletas das amostras, dados de citotoxicidade, controles positivo e negativo.

4.5.4. Detalhes do protocolo usado para o preparo das lâminas.

4.5.5. Critério para a identificação dos EP com MN.

4.5.6. Relação dose-efeito, se houver.

4.5.7. Análise estatística.

4.5.8. Discussão dos resultados.

4.5.9. Interpretação dos resultados.

O teste do micronúcleo pode ser utilizado, também, no controle de populações humanas. Nesse caso , o material pode ser retirado de células epiteliais da mucosa bucal ou de linfócitos do sangue periférico.

G.1.2.5. TESTE DO LETAL DOMINANTE

Data da revisão: 10/87

1. OBJETIVO E FUNDAMENTO

O teste do letal dominante é um dos poucos que avalia o potencial mutagênico de um composto ao tecido gamético de um mamífero intacto. Daí sua grande vantagem, pois mesmo se conhecendo o dano que um agente pode causar às células somáticas, não há informação sobre qual a relação entre esse dano e o causado pela mesma dose nas células germinativas do mesmo animal.
A mutação letal dominante é uma lesão genética que ocorre em um gameta e, embora não interfira com a viabilidade deste, é letal para o embrião. O letal dominante resulta de anomalias cromossômicas estruturais e/ou numéricas. As mutações letais dominantes são eliminadas na primeira geração e não são herdadas. Como, entretanto, as substâncias mutagênicas produzem tanto eventos cromossômicos letais como não letais, o teste é indicativo da ocorrência de ambos e é relevante para qualquer discussão de mutações no homem, já que muitas mutações humanas são devidas a caracteres autossômicos dominantes.

2. MÉTODO

2.1. Princípio

Os machos são expostos à substância em teste e cruzados com fêmeas virgens. A meio termo da prenhez sacrificam-se as fêmeas e determina-se o número de embriões vivos e mortos no útero. Compara-se a proporção entre embriões mortos e vivos nos grupos tratados e de controle.

2.2. Descrição

Existem dois tipos principais de protocolo para o teste. No tratamento agudo (a curto prazo), machos adultos são submetidos a uma única dose ou a poucas doses durante alguns dias, usando-se concentrações sub-letais do agente em estudo. Esses animais são cruzados seqüencialmente a cada semana com grupos de fêmeas não tratadas. Os resultados dos cruzamentos semanais vão indicar que

estágio da gametogênese foi afetado e é responsável pela mortalidade embrionária.

No tratamento crônico (a longo prazo), os machos são tratados durante toda a duração da espermatogênese e espermiogênese (8 semanas nos camundongos e 10 semanas nos ratos). Esses machos são cruzados com fêmeas virgens não tratadas durante 2 semanas. Como no protocolo anterior, as fêmeas são sacrificadas a meio termo da prenhez, isto é, entre o 13º e 17º dias da gestação, e examinadas quanto à presença de mortes "in utero".

2.3. Seleção dos animais

2.3.1. Espécie

Recomenda-se camundongo ou rato.

2.3.2. Idade

Animais saudáveis, sexualmente maduros.

2.3.3. Número

Geralmente cada macho é cruzado com várias fêmeas não tratadas, identificando-se cada casal. O parâmetro crítico neste teste é o número de fêmeas prenhes por dose testada.

Embora esse número seja determinado pelo número de machos tratados, ele também depende de fatores como relação de cruzamentos entre machos tratados e fêmeas não tratadas, capacidade reprodutiva das linhagens usadas, tamanho da prole e o efeito da substância sobre a capacidade reprodutiva do macho. O ideal seria que o número de fêmeas prenhes fosse tal que permitisse detectar, com 95% de probabilidade, uma duplicação na frequência espontânea de mutações letais dominantes na espécie e na linhagem usada.

2.3.4. Distribuição em grupos

Os animais devem ser sorteados e distribuídos entre os grupos controle e experimental.

2.3.5. Condições de manutenção e alimentação

Os animais devem ser mantidos em dieta equilibrada, recebendo alimento e água "ad libitum". Temperatura, umidade e ciclos de luz devem ser controlados segundo as boas normas de biotério.

2.4. Controles

2.4.1. Controle negativo

A substância usada como controle negativo deve ser o veículo da substância a ser testada, quando for o caso. Tal controle é indispensável, visto que a frequência espontânea de mortes "in utero" varia de espécie para espécie, conforme a linhagem e, também, conforme a época do ano.

2.4.2. Controle positivo

Uma substância que já se sabe ser indutora de letais dominantes deve ser usada para assegurar que as condições experimentais são adequadas para a detecção do efeito. Ex: trietilenomelanina, ciclofosfamida e etilmetanossulfonato.

2.5. Substâncias a serem testadas

2.5.1. Veículo

Substâncias sólidas e líquidas devem ser dissolvidas ou suspensas em salina isotônica. Substâncias insolúveis devem ser dissolvidas em veículo apropriado, que não interfira com a substância em teste, nem produza efeitos tóxicos. Deve-se usar sempre preparações recentes da substância a ser testada.

2.5.2. Doses

Pelo menos 3 doses. A mais alta deve produzir sinais de toxicidade ou redução na fertilidade, mas não provocar a morte ou esterilidade total. Esta dose pode ser determinada em um estudo piloto, ser selecionada com base em efeitos biológicos descritos na literatura ou ainda escolhida de acordo com os níveis de exposição humana. Se um composto não tiver efeito tóxico detectado, uma concentração de 5 g/kg p.c. pode ser considerada como dose máxima tolerada (DMT), dada de uma só vez, ou em repetidas administrações até 1 g/kg/dia.

2.5.3. Via de administração

Diferentes vias têm sido usadas: inalatória, gástrica, intraperitonial ou endovenosa. Não se costuma usar aplicação dérmica.

3. PROCEDIMENTO

3.1. Tratamento

Os machos são tratados pela via apropriada, durante o intervalo de tempo escolhido (tratamento agudo ou toda a espermatogênese e espermiogênese).

3.2. Cruzamento

Após o período de tratamento, cada macho deve ser cruzado com uma ou duas fêmeas virgens. As fêmeas devem ser deixadas com os machos pelo menos um estro ou até que ocorra o acasalamento, fato que é determinado pela presença do "plug" vaginal ou presença de espermatozóides na vagina. Essas fêmeas são, então, substituídas por uma ou duas outras e assim por diante, de modo que o acasalamento cubra todo o ciclo espermatogênico.

3.3. Sacrifício e análise

As fêmeas devem ser sacrificadas a meio termo da prenhez. Examina-se o conteúdo uterino e determina-se o número de fêmeas prenhes e de implantações vivas e mortas. O dia de sacrifício não deve ultrapassar o 17º dia de prenhez.

A determinação do número de corpora lútea e a estimativa de perdas de pré-implantação ficam a critério do investigador.

4. TRATAMENTO DOS RESULTADOS E RELATÓRIO

4.1. Apresentação dos resultados

Os resultados cruciais para este teste são o número de implantações vivas e mortas para cada fêmea.

Os resultados devem ser apresentados em tabelas, mostrando, para cada dose testada, os seguintes dados:

4.1.1. Número de fêmeas prenhes/número de fêmeas acasaladas.

4.1.2. Número de machos férteis/número de machos cruzados.

4.1.3. Número médio total de implantações por fêmea prenhe.

4.1.4. Número médio de perdas de pré-implantação por fêmea prenhe, quando determinada.
A perda de pré-implantação pode ser determinada de dois modos: no rato, devido à maior facilidade de observação, ela é definida com a discrepância entre o número de corpora lútea e o número de implantes; no camundongo, ela é detectada através da redução no número médio de implantes por útero em relação aos cruzamentos-controle.

4.1.5. Número médio de implantações mortas por fêmea prenhe.
Se forem classificadas como precoces e tardias, mostrar isso na tabela.

4.1.6. Número de implantações mortas/total de implantações.

4.2. Análise estatística

A escolha do teste estatístico deve levar em conta o esquema experimental e as transformações necessárias para que se façam comparações múltiplas. Pode-se usar o teste "t" de Student, análise de variância ou testes não paramétricos correspondentes. O Qui-quadrado só se aplica para o índice de fertilidade.

4.3. Interpretação de resultados

4.3.1. Para se considerar que uma substância deu uma resposta positiva, é necessário que se encontre:
- um aumento relacionado com a dose, estatisticamente significante a um nível de 5%, no número de implantações mortas (letais dominantes);
- uma resposta positiva e reprodutível, estatisticamente significante ao nível de 5%, para, pelo menos, umas das concentrações testadas.

4.3.2. Para se considerar que o resultado é negativo, é necessário ter-se um número de fêmeas prenhes, tal que se permita a detecção, com 95% de probabilidade, da duplicação de frequência espontânea de letais dominantes na mesma espécie e linhagem.
Nessas condições, uma substância que não produza

nenhum aumento estatisticamente significante ao nível de 5% no número de letais dominantes, nenhum resultado positivo, estatisticamente significante, reprodutível em nenhuma concentração testada, é considerada não mutagênica neste sistema.
A decisão final, entretanto deve ficar a cargo de especialistas na área.

4.4. Avaliação do teste

4.4.1. Um resultado positivo sugere que a substância em estudo é genotóxica às células germinativas da espécie testada.

4.4.2. Resultados negativos indicam que, sob as condições do teste, a substância em questão pode não ser genotóxica às células germinativas da espécie em que foi feito o teste.

4.5. Relatório sobre o teste

O relatório deve conter as seguintes informações:

4.5.1. Espécie, linhagem e idade dos animais usados, número de machos e fêmeas em cada grupo tratado e controle.

4.5.2. Veículo da substância testada, doses usadas, critério para escolha das doses, controles positivo e negativo, dados de toxicidade.

4.5.3. Via e duração da exposição.

4.5.4. Esquema de cruzamento.

4.5.5. Método usado na determinação de ocorrência de acasalamento.

4.5.6. Tempo de sacrifício.

4.5.7. Critério de contagem das mutações letais dominantes.

4.5.8. Relação dose-efeito, se houver.

4.5.9. Análise estatística.

4.5.10. Discussão dos resultados.

4.5.11. Interpretação dos resultados.

G.1.2.6. BIBLIOGRAFIA DO ITEM G.1.2

1. AMES BN, McCANN J, YAMASAKI E. Methods for detecting carginogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31: 347-364, 1975.
2. ASTM Standards. Standard method of test the detection of bacterial mutagens in water-formed deposits. Belvedere, 1981. (Draft, 3).
3. BATEMAN AJ, EPSTEIN SS. Dominant lethal mutations in mammals. In: Hollaender, A. (ed.), Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Vol 2. Plenun, New York, 1971. p. 541-68.
4. BRADLEY MO; et alii. Mutagenesis by chemical agents in V-79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature: a report of the Gene-Tox Program. Mutat Res., 87 :81-141, 1981.
5. BREWEN JG, PAYNE HS, JONES KP, PRESTON RJ. Studies on chemically induced dominant lethality.I.The cytogenetic basis o MMS-induced dominant lethality in pos-meiotic germ cells. Mutat. Res., 33: 239-250, 1975.
6. CALLEN DF; PHILPOT RM. Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res., 45: 309-324, 1975.
7. CONNOR, TH, MAYNE J, MOLINA L. LEGATOR MS. A combined testing protocol approach for mutagenicity testing. Mutat. Res., 64: 19-26, 1979.
8. D'ARI R. The SOS system. Biochimie, 67: 343-347, 1985.
9. DE SERRES FJ & SHELBY MD. The Salmonella mutagenicity assay: recommendations. Science, 203: 563-565, 1979.
10. EHLING UH et alii. Standard protocol for the dominant lethal test on male nice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics. Archiv. Toxicol., 39: 173-185, 1978.
11. FRIEDBERG EC. DNA Repeair. WR Freeman Co., New York, 1985. 614p.
12. FRIEDBERG EC, HANAWAL PC (eds.). DNA Repair. vol.1, part A,B. Marcel Dekker Inc., New York, 1981. 637p.

13. HEDDLE JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat. Res., 18: 187-190. 1973.
14. HOLLAENDER A (org.). Chemical mutagens: principles and methods for their detection. New York, Plenum Press, V.1-7, 1971-82.
15. HSIE AW, et alii. The use of chinese hamster ovary cells to quantity specific locus mutation and to determine mutagenicity of chemicals. A report of the Gene-Tox Program. Mutat. Res., 86: 193-214, 1981.
16. HSIE AW & SCHENLEY RL. Utilization of chinese hamster cells "in vitro" and "in vivo" in genetic toxicology. Envision. Nut., 5: 733-744, 1983.
17. HSU TC. Bone marrow preparations for chromosome studies. In: BENIRSCHKE, K. Comparative mammalian cytogenetics. Springer-Verlarg, New York Inc., 1969.
18. HYMAN J, LEIFER Z; ROSENKRANZ HS. The E. Coli polA assay: a quantitative procedure for diffusible and nondiffusible chemicals. Mutat. Res., 74: 107-111, 1980.
19. ISO. Concentration procedures for liquid samples for mutagens testing-liquid/liquid extraction. Feb., 1980. (ISO/TC 147/SCS/WG7-NSC).
20. ISO. Saccharomyces D7/mammalian-microsome mutagenesis assay for sterile aquous mixtures. August, 1980. (ISO/TC 147/SC5/WG7).
21. LARESEN KH, et alii. DNA repair assays as tests for environmental mutagens. A report of the US. EPA Gene-Tox Program. Mutat.Res., 98: 287-318, 1982.
22. LATT SA. Sister chromatid exchange formation. Ann. Rev. Gen., 15: 11-55. 1981.
23. LEE MR. A widely appliacable technic for direct processing of bone marrow for chromossomes of vertebrates. Stain Technol., 44: 155-158, 1969.
24. LEGATOR MS & MALLING HV. The host-mediated assay: a pratical procedure for evaluating potential mutagenic agents in mammals. In: Hollaender, A. (ed). Chemical Mutagens, Vol. 2. Plenum Press, 1971.
25. London Conference of the Normal Human Karyotype. Cytogenetics, 2:264-268, 1963.

26. MacMAHON RE; CLIVE JC; THOMPSON CZ. Assay of 855 test chemicals in ten tester straing using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. Cancer Res., 39: 682-693, 1979.

27. McGREGOR JT; WEHR CM; GOULD DH. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. Environ.Mutagen., 2: 509-514, 1980.

28. MAHNA SK & RHAESE HJ. Transfection assays: a new test System for studying mutation induction. Experientia, 39: 530-532, 1983.

29. MARON DM & AMES BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215, 1983.

30. MOREAU, P.L. Mecanisme des fonctions cellulaire induites chez Escherichia coli par les lesions de l'ADN. Tese de Doutorado em Ciencias, Universidade de Paris-Sul, 1981. 276p.

31. MOREAU P; BAILONE A; DEVORET R. Prophage lambda induction in Escherichia coli K12 envAuvrB: a highly sensitive test for potencial carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 73 :3700-3704, 1976.

32. MOREAU, P., & DEVORET, R. Potencial carcinogens tested by induction and mutagenesis of prophage lambda in Escherichia coli K12. In: H Hiatt, JD Watson, JA Winten (eds). Origins of human cancer. v. 4. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1977,p. 1451-1472.

33. PRESTON, RJ. et. alii. Mammalian "in vivo" and "in vitro" cytogenetic assays: a report of the US EPA's Gene-Tox Program. Mutat. Res., 87: 143-188, 1981.

34. QUILLARDET,P & HOFNUNG,M. The SOS Choromotest, a bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res., 143: 65-78. 1985.

35. QUILLARDET,P et elii. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli to measure genotoxicity. Proc. Natl.Acad. Sci., (USA) 79: 5971-5975, 1982.

36. RUSSEL,WL. The effect of radiation dose and fractionation on mutation in mice. In: Sobels, F.H. (ed). Repair from genetic radiation damage. Oxford, Pergamon Press, 1975. p. 205-18.

37. SALAMONE,M. et alii. Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. Mutat. Res., 74: 347-356, 1980.
38. SAN RHC & STICH HF. DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carsinogenesis. Int. J.Canc., 16: 284, 1975.
39. SCHIMID, W. The micronucleus test. Mutat. Res., 31: 9-15. 1975.
40. SEARLE, AG. The specific locus test in the mouse. Mutat. Res., 31: 277-290, 1975.
41. SEDGWICK SG. Stability and change through DNA repair. In: DJ GALAS, TBL KIRKWOOD, RF ROSENBERGER. (eds). Accuracy in molecular process. Chapman and Hall, Londres, em publicação.
42. SIDEROPOULOS AS; SPECHT SM; JONES MT. Feasibility of testing DNA repair inhibitors for mutagenicity by a simple method. Mutat Res., 74: 95-105, 1980.
43. SLATER EE, ANDERSON MD, ROSENKRANZ HS, Rapid detection of mutagens as carcinogens. Cancer Res., 31: 970-973, 1971.
44. SPARROW AH; UNDERBRINK AG; ROSSI HH. Mutations induced in tradescantia by small doses of X-ray and neutrons. Science, 176: 916-918, 1977.
45. STICH HF et alii. Unsecheduled DNA synthesis of human cells as a short-term assay for chemical carcinogens. In: HH IATT, GD WATSON AND GA WINSTEN (eds). Origin of human cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1977.p. 1499-512.
46. THOMPSON ED & MELAMPY PJ. An examination of the quantitative suspension assay for mutagenesis with strains of Salmonella typhimurium. Environ. Mutag., 3: 453-465, 1981.
47. TICE RR. et alii. A review of the International Symposium on sister chromatid exchange: 25 years of experimental research. Environ. Mutag., 6: 737-752, 1984.
48. UNDERBRINK AG; SCHAIERER LA; SPARROW AH. Tradescantia stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: HOLLAENDER, A (ed). Chemical Mutagens: principles and methods for their detection. vol. 3 Plenum Press, New York, 1973.
49. VOGEL HJ & BONNER DM. Acetylorinithinase of E. coli: partial purification and some properties. J. Biol. Chem., 218: 97-106, 1956.

50. VOGEL F. & ROHRBORN G. (org). Chemical Mutagenesis in Mammalian and Man. Springen-Verlag-Beriln, Heidelberng, New York, 1970.

51. VOGEL E & SOBELS, FH. The function of Drosophila in genetic toxicology testing. In: HALLAENDER, A. ed. Chemical mutagens principles and methods for their detection. vol. 4. Plenum Press, New York and London, 1976.

52. WALKER, GC. Mutagenesis and inductible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli. Microbiol.Rev., 48: 60.93, 1984.

53. WILLIAMS; GM. Detection of chemical mutagens-carcinogens in liver cultures. In: HOLLAENDER, A. ed. Chemical mutagens: principles and methods for their detection. vol.6. 1980. p.61-69.

54. WYROBEK AJ, et alii. An evaluation of mouse sperm morphology test and other sperm tests in nom-human animals. A report for the US EPA Gen-Tox Program, Mutat. Res., 115: 1-72, 1983.

55. WYROBEK AJ, et alii. an evaluation of human sperm as incicators of chemically induced alterations of spermatogenetic functions. A report for the US.EPA, Gen-Tox Program. Mutat. Res., 115: 73-148, 1983.

56. WYROBEK AJ, et alii. Human sperm morphology testing description of a reliable method and its statistical power. In. BA BRIDGES; BE BUTTERWORTH; IB WEINSTEIN (eds). Bandury Report 13. Indicators of Genotoxic Exposure. Cold Spring Harbor Laboratories, 1982. p. 527-41.

57. WYROBEK AJ, et alii.. Genetic control of human sperm shaping. Human Genetics, 5: 123a, 1984.

58. WYROBEK AJ; WATCHMAKER G; GORDON L. Sperm morphology testing on mice. In: BJ KILBEY, MS LEGATOR, W NICHOLS, C RAMEL. eds. Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Scientific Publishing Co., New York, 1984. p. 739-50.

59. ZAMBRANO MA; TARGA HJ; RABELLO-GAY MN. Physiological saline solutions as a usefull tool in micronucleus and metaphase slide preparations. Stain Tech., 57: 48-49, 1982.

60. ZIMMERMANN FK. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In: BJ KILBY, M LEGATOR, W NICOLS, C RAMEL (eds). Handbook of mutagenicity test procedures. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. p. 119-34.

61. ZIMMERMANN FK: KERN R & ROSENBERGER H. A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing-over, mitotic gene conversion and reserve mutation. Mutat. Res., 28: 381-388, 1975.

G.1.3. CONCLUSÕES

G.1.3. CONCLUSÕES

Para o caso do ser humano não há, no momento, um consenso sobre a avaliação quantitativa do risco mutagênico. No entanto, pode-se fazer uma estimativa através de relações dose-efeito determinadas em ensaios citogenéticos. Para isso, com as devidas reservas e cautela, são necessárias extrapolações dos efeitos obtidos em células somáticas para células germinativas com o objetivo de avaliar as alterações nas frequências gênicas induzidas por esses eventos. A avaliação deve levar em conta a dose que produziu o efeito no sistema utilizado em relação à dose máxima de exposição humana.

Diferentes eventos mutagênicos podem ser detectados através de diversos testes. Sendo assim, inúmeras baterias têm sido propostas para avaliar o potencial mutagênico de uma substância. A seleção dessas baterias deve procurar satisfazer os seguintes critérios:

- capacidade de detectar todos os tipos de lesões genéticas;
- capacidade de detectar produtos metabólicos do composto em estudo;
- possibilidade de avaliação do risco para o homem.

Com base no que foi exposto, sugere-se a seguinte bateria:

- Mutagênese "in vitro":
  1. Testes que detectem mutações gênicas usando bactérias ou fungos e células de mamíferos, com sistemas de ativação.
  2. Testes que detectem aberrações cromossômicas em células de mamíferos.
- Mutagênese "in vivo":
  3. Testes de indução de aberrações cromossômicas "in vivo", através da análise citogenética direta da medula óssea.
  4. Teste do letal dominante.

Quando os resultados de todos os testes acima mencionados forem negativos, a substância é considerada como não potencialmente mutagênica para o homem.

Se pelo menos um teste "in vitro" com microrganismo der resultado positivo, outros testes são necessários para determinar se a substância é mutagênica para o homem.

Se qualquer teste "in vivo" for positivo, a substância é considerada mutagênica para o homem, qualquer que seja o resultado dos testes "in vitro".

Uma substância é considerada como possível mutagênica para o homem se pelo menos dois testes "in vitro" forem positivos, sendo um deles em um sistema eucarioto.

A probabilidade de um composto ser mutagênico para o homem estará bem fundamentada quando testes citogenéticos e mutação de ponto forem positivos.

G.2.1. ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Data da revisão: 10/87

Informar no relatório os ítens seguintes:

1. DESCRIÇÃO DO TESTE

1.1. Tipo de estudo
Estudos "in vivo" não são incluídos.

1.2. Tipo e características físico-químicas da substância testada e do solvente/veículo utilizado.

1.3. Grau de pureza e/ou porcentagem de impurezas da substância testada e do veículo utilizado nos expostos e controles .

1.4. Características toxicológicas da substância testada e do veículo utilizado nos animais expostos e controles.
Devem ser referidas as características toxicológicas conhecidas da substância em teste, obtidas através de outros tipos de estudos em espécie animais.
Devem ser utilizadas como veículos substâncias com propriedades toxicológicas conhecidas, que não afetem a reprodução e que não sejam tóxicas para organismos em desenvolvimento.

1.5. Caracterização da espécie e/ou linhagem dos animais expostos e controles.
Somente mamíferos devem ser incluídos neste tópico, sendo as espécies mais comumente testada os camundongos, ratos, coelhos e hamsters. Outras espécies poderão, também, ser utilizadas quando existirem similaridades toxicocinéticas com o homem.

1.6. Idade dos animais expostos e controles.

A idade dos animais expostos e controles refere-se à idade das mães. Os animais utilizados deverão ser jovens e saudáveis.

1.7. Número de animais expostos e controles.

os estudos experimentais devem empregar pelo menos 20 fêmeas grávidas de roedores ou 12 coelhas, por dose utilizada.

1.8. Via de administração.

A via de administração preferencial deve corresponder àquela em que ocorre a exposição humana. Na impossibilidade de se seguir este procedimento, a via deverá ser escolhida de acordo com a literatura pertinente à substância em teste. Quando a administração for pela via inalatória deve ser especificado se o animal foi exposto como um todo ou se foi utilizada alguma forma de exposição direta somente através das vias respiratórias. As câmaras de inalação utilizadas deverão ser descritas em detalhe e as concentrações deverão ser confirmadas através de métodos analíticos adequados.

1.9. Frequência de exposição.

A frequência de exposição à substância em teste deve ser especificada.

1.10. Concentração e doses de exposição.

Em geral pelo menos 3 doses devem ser testadas no tratamento materno, sendo que a dose máxima deve induzir toxicidadade materna leve mas perceptível, tal como ligeira perda de peso, e não mais que 10% de morte materna. A dose mínima não deve induzir efeitos observáveis, e a dose intermediária deve situar-se geometricamente entre a máxima e a mínima. Além disso, devem ser obtidas a dose mínima que cause efeitos sobre o concepto, e a máxima que causa efeito sobre o mesmo, mas que é tolerada sem efeitos tóxicos sobre a mãe.

2.5. Vias de administração e dieta basal

Devem ser adotadas aquelas que antecipam vias de exposição humana, a menos que razões técnicas a(s) impeça(m).

Ex:

- Oral = na dieta, na água ou gavagem
- Cutânea = aplicação tópica após tricotomia.
- Inalação = em câmaras adequadas, permitindo avaliação da concentração aérea.

Formas atípicas de administração devem ser evitadas: gavagem, intraperitonial, subcutânea, intramuscular, endovenosa. A dieta pode ser comercial, mas adequadamente balanceada, com seu aporte de nutrientes conhecido.

2.6. Veículo

Dependerá da hidro ou lipofilidade do agente. Na administração da dieta deve-se considerar o eventual papel dos óleos na digestibilidade, absorção e efeitos bioquímicos gerais de óleos saturados ou insaturados na fisiologia gastrointestinal.

2.7. Biotério

Padronizados: corredores "limpos" e "sujos"; ventilação; luminosidade e temperatura controladas; vestimentas descartáveis para o pessoal técnico (luvas, máscaras, aventais); gaiolas limpas com forração trocadas semanalmente.

3. PROCEDIMENTO

3.1. Início e duração do estudo

Início duas semanas após o desmame, em seguida a período de adaptação à dieta basal ou dieta-teste. Duração de 24 meses para ratos e 18 meses para camundongos e hamsters, a menos que ocorra excessiva mortalidade antes da centésima semana (65% no grupo de dose baixa). Nenhum estudo deverá prosseguir além de 130 semanas de idade em ratos, 120 em camundongos e 100 em hamsters.

3.2. Condução do experimento

Os animais devem ser verificados duas (2) vezes ao dia. Os moribundos devem ser sacrificados. Sintomas clínicos de mortalidade devem ser registrados individualmente.

Além disso:

- o peso corporéo deve ser registrado semanalmente nos três primeiros meses e depois mensalmente;
- o desenvolvimento de tumores superficiais (pele, mama) deve ser anotado (localização) e as dimensões e progressão idem;
- eventualmente são colhidas amostras (sangue, urina) para testes hemato-bioquímicos.

3.3. Patologia

Necrópsia completa de todos os animais sacrificados no final do experimento, daqueles que morreram durante o teste e dos moribundos sacrificados. Durante o experimento "sacrifícios intermediários" podem ser feitos, embora não rigorosamente necessário.

Além da análise macroscópica feita durante a necrópsia, fragmentos representativos de lesões visíveis e de pelo menos 33 órgãos são submetidos à análise histológica: massas tumorais, nódulos linfáticos, glândula salivar, esterno e fêmur (incluíndo medula óssea), esôfago, estômago completo, intestino delgado (as 3 porções), ceco, colo-reto, fígado, vesícula biliar (quando presente), testículo-epidídimo, próstata-vesícula seminal, útero, cavidade nasal e turbinetos, traquéia, pulmões-brônquios, prepúcio-clitóris (ratos), coração, cérebro (córtex frontal-gânglios basais; córtex parietal-tálamo e cerebelo-ponte), timo, pâncreas, adrenais, hipófise, tireóide, paratireóide, baço, rim, bexiga, medula espinhal (quando há sinais neurológicos), olhos (se macroscópicamente anormais), glândulas mamárias, pele (dependendo do protocolo).

A análise histológica inicia-se pelos tecidos dos animais tratados com dose mais alta e seus respectivos controles. Se não há diferença entre estes grupos, a análise histológica retringe-se às lesões observadas macroscópicamente nos animais de dose baixa e naqueles locais onde ocorreram lesões significantes nos animais com dose alta.

G.2. TESTES PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIO-FETOTÓXICO DO AGENTE QUÍMICO

1.11. Período de exposição.

Nos estudos experimentais, o período de exposição deve cobrir, pelo menos, o tempo de organogênese e se estender a todo tempo de gestação até um dia antes da data provável de expulsão do concepto. No caso do efeito ocorrer somente em dias específicos de exposição, este(s) dia(s) deve(m) ser mencionado(s).

1.12. Observações e comentários sobre a exposição.

Comentários que eventualmente possam facilitar a interpretação do relatório deverão ser adicionados.

1.13. Condições de realização do teste e métodos empregados na avaliação da prole dos animais expostos e controles.

Durante a gestação os animais devem ser mantidos em gaiolas individuais. A temperatura ambiente, a umidade relativa e a iluminação devem ser controladas e referidas. As condições e a composição da dieta e o estado nutricional do animais deverão ser descritos, tanto no grupo experimental quanto nos controles. A ração deve garantir os requisitos mínimos necessários para a manutenção e reprodução normal dos animais. O método empregado na avaliação da prole deve ser descrito detalhadamente.

1.14. Tipo de condições de término da prenhez.

Na avaliação do desenvolvimento pós-natal o término da prenhez será espontâneo, enquanto que a avaliação de defeitos estruturais e perdas gestacionais requer o término cirúrgico da prenhez.

2. RESULTADOS DO TESTE

2.1. Taxa de gestação.

Taxa de gestação = número de grávidas/número de inseminadas x 100.

2.2. Taxa de eficiência de implantação.

Taxa de eficiência de implantação = número total de implantes/número total de corpos lúteos x 100.

2.3. Taxa de viabilidade fetal.

Taxa de viabilidade fetal = número de fetos vivos/número total de implantes x 100.

2.4. Taxa de viabilidade no período de amamentação.
Taxa de viabilidade no período de amamentação = número de filhotes vivos no dia examinado/número de filhotes vivos ao nascimento x 100.

2.5. Razão sexual nos animais expostos e controles.
Razão sexual nos animais expostos e controles = número de machos/número de fêmeas, ou o índice de masculinidade ou feminilidade = número de machos ou fêmeas/número total de filhotes.

2.6. Marcos do desenvolvimento no período de amamentação.
O desenvolvimento físico é avaliado registrando-se os dias em que se observam pela primeira vez os seguintes parâmetros:
2.6.1. Desdobramento das orelhas.
2.6.2. Crescimento de pelos.
2.6.3. Erupção dentária.
2.6.4. Abertura dos olhos.
2.6.5. Abertura vaginal.
O desenvolvimento neuro-motor pode ser acompanhado registrando-se o dia em que são observados, pela primeira vez, os reflexos característicos da espécie em estudo. O desenvolvimento sensorial envolve a avaliação olfatória, auditiva e visual.

2.7. Peso da prole dos expostos e controles.
Deverão ser registrados os pesos de nascimento de toda a prole de animais expostos e controles, assim como, também, a evolução ponderal, a intervalos regulares até o desmame, quando da avaliação do desenvolvimento pós-natal.

2.8. Duração da gestação (dias) nos animais expostos e controles.

2.9. Órgão(s), sistema(s) e/ou tecido(s) afetado(s) na prole dos animais expostos e controles.

2.10. Tipo de efeito, com descrição pormenorizada das alterações estruturais e funcionais encontradas.
A descrição pormenorizada das alterações estruturais e funcionais deve ser acompanhada do relato detalhado do método utilizado para tal verificação.
Quando encontrados, devem ainda ser comentados os seguintes fatos: deciduoma (reabsorção precoce) e fetos mortos na gestação tardia.

2.11. Número de expostos afetados e controles afetados.
O número de expostos ou controles afetados refere-se ao número de embriões ou fetos e ao número de ninhadas em que foram observadas estas alterações.

2.12. Sexo afetado.
Deve-se considerar o sexo dos embriões e fetos afetados.

2.13. Reversibilidade/irreversibilidade do efeito.
Os efeitos embrio-fetotóxicos funcionais podem ser de natureza reversível, enquanto que os teratogênicos "stritu sensu" são permanentes. Portanto, todo comentário referente à reversibilidade ou irreversibilidade de um efeito ou anomalia é de importância fundamental.

2.14. Efeitos maternos.
Durante o tratamento devem ser observados e registrados sinais de toxicidade materna (início, grau e duração).

2.15. Observações e comentários sobre os efeitos encontrados.

2.16. Apreciações e avaliações gerais sobre o teste e efeitos.

3. BIBLIOGRAFIA

3.1. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles for evaluating health risk to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy. Enviro. Health Criteria 30, Geneva, WHO, 1984.

3.2. BARRON, W.V. & TAYLOR, W.J. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. J. Morph., 127: 291-306, 1969.

3.3. JOHNSON, E.M. Screening for teratogenicity hazards: nature of the problems. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21: 417-429, 1981.

3.4. WILSON, J.G. Critique of currente methods for teratogenicity testing in animals and suggestions for their improvement In: SHEPARD, T.H. et. alii. eds Methods for detection of environmental agents that produce congenital defects. North Holland, p. 29-48., 1975.

3.5. CHRISTIAN, M.S. & HOBERMAN, A.M. Current in vivo reproductive toxicology and teratology methods. IN: HOMBURGER. ed. Safety Evaluation and regulation of Chemicals 2. 2nd. Int. Conf., Cambridge, Mass., 1983. p. 78-88 (Karger, Base 1985).

G.3. TESTES PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DO AGENTE QUÍMICO

G.3.1. TESTE DE LONGA DURAÇÃO COM ROEDORES

Data da revisão: 10/87

De todos os testes sobre carcinogenicidade de substâncias químicas, o teste prolongado em roedores é o único cujo ponto-final é o desenvolvimento do câncer. Isto não o protege de uma série de críticas, as quais, no fim, têm levado o delineamento destes testes a um progressivo aperfeiçoamento.

Trinta e duas substâncias químicas ou grupos químicos, com suficientes dados para uma comparação válida, forneceram uma boa correlação qualitativa entre os efeitos carcinogênicos no homem e em animais de experimentação. Além disso, para algumas substâncias (4-aminobifenil, aflatoxina-B1, dietilestilbestrol, gás mostarda e cloreto de vinila) a evidência experimental precedeu as verificações das evidências epidemiológicas. Estas observações indicam que os resultados dos testes a longo prazo podem ser de valor na predição de efeitos similares no homem.

Isto não significa necessariamente que todas as substâncias químicas que são carcinogênicas em animais de experimentação o sejam em humanos. Quando os estudos experimentais são conduzidos de maneira rigorosa, seus resultados positivos devem ser tomados como evidência de que o composto em questão apresenta risco de carcinogenicidade para o homem. O delineamento do teste de longa duração, que é apresentado a seguir, baseia-se no Programa Nacional de Toxicologia (NTP) dos EUA. Protocolo similar é adotado pela Agência Internacional de Pesquisa Contra o Câncer (IARC).

1. OBJETIVO

1.1. Determinar se a exposição ao agente em questão aumenta ou antecipa a incidência de tipos específicos de neoplasias

relacionadas à idade do animal.

1.2. Fornecer informações relevantes sobre a potência do agente que possam ser úteis para a definição de eventual risco humano.

2. MÉTODO

2.1. Identificação da substância química.
Sinônimos e nomes comerciais; fórmula química e propriedades físico-químicas; método(s) analítico(s) de caracterização; usos; fonte e número do lote; método(s) de síntese e de armazenamento; toxicocinética; nível de exposição diária para seres humanos; outras informações que forem julgadas de interesse.

2.2. Espécies e sexos.
No mínimo duas espécies e os dois sexos (endógamos, híbridos F1 ou exógamos). Os ratos mais usados são o F-344 e o Sprague-Dawley; camundongos, o B6C3F1; e, eventualmente, o hamster sírio.

2.3. Doses
São usadas no mínimo duas. A maior dose é a "dose máxima tolerada" (DMT), definida como a maior dose que não causa mais que 10% de perda de peso corporéo, nem induz mortalidade ou sinais clínicos de toxicidade em estudos sub-crônicos. A menor dose é uma fração da DMT, geralmente sua metade. Variações desta recomendação (em estudos geracionais ou uso de substâncias não-tóxicas) devem ser justificadas.

2.4. Grupos e controles
Cada grupo experimental é composto por, pelo menos, 50 animais que recebem igual tratamento. Os grupos controle são pareados a cada grupo experimental e geralmente não são tratados, ou só recebem o veículo (se for o caso).

4. RESULTADOS

4.1. Análise estatística

Os dados analisados incluem informações descritivas sobre a taxa de sobrevivência, peso dos animais e resultados patológicos individuais. A probabilidade de sobrevivência é estimada pelo procedimento de Kaplan-Meier e é apresentada na forma de gráficos. A incidência de lesões neoplásicas é dada pela razão do número de animais com lesão em determinado local sobre o número de animais que tiveram aquele local examinado. Há que se distinguir entre tumores "induzidos" quimicamente e os "espontâneos", e entre os "incidentais" e os "fatais". Grupos tratados e não tratados são comparados adequadamente entre si pelo teste exato de Fisher para se detectar diferença e/ou eventuais tendências na incidência dos tumores.

A determinação da correlação dose-resposta é feita pelo teste de Cochram-Armitage para proporções.

4.2. Apresentação

Sob a forma de relatório, que incluira: descrição do problema; resultado sob a forma de texto; tabelas e gráficos, com as análises estatísticas dos parâmetros relevantes; conclusão suscinta sobre o resultado, segundo as categorias adotadas; listagem dos responsáveis por cada etapa de execução do experimento (toxicólogo, patologista, estatístico e bioterista).

5. ALTERAÇÕES NO MÉTODO E NO PROCEDIMENTO

São aceitáveis, desde que mantenham a capacidade do experimento detectar:

- aumento na incidência de neoplasias;
- neoplasias raras;
- redução no tempo de aparecimento da neoplasia;
- lesões tóxicas diretas ou indiretas;
- aumento da incidência e/ou de severidade de lesões relacionadas ao agente em teste, mas dependentes da idade.

6 ARQUIVO DO MATERIAL

O relatório do experimento, os registros individuais dos animais, as lâminas histológicas, os laudos diagnósticos, e os testes estatísticos devem estar arquivados e disponíveis no laboratório que executou o teste.

7. QUALIDADE E RAZÕES PARA INVALIDAR O TESTE

A qualidade do teste deve ser julgada por sistema adequado.
Invalidam o teste:

- Relatório incompleto, obscuro ou inadequado.
- Número insuficiente de animais por nível de risco.
- Doses muito altas ou relação incerta entre a dose dada e a DMT.
- Tratamento e/ou experimento muito curto em relação à longevidade das espécies usadas.
- Descrição insatisfatória dos achados anatomopatológicos.
- Controles inadequados (tamanho dos grupos e ocorrência de tumores "espontâneos").
- Resultados estatísticos de significância duvidosa.
- Dúvidas a respeito da composição real da substância usada.

8. CATEGORIAS DE CONCLUSÕES OBTIDAS EM ESTUDOS DE LONGA-DURAÇÃO

8.1. Segundo o Programa Nacional de Toxicologia dos E.U.A.

8.1.1. Evidência clara de carcinogenicidade;

É demonstrada por estudos que são interpretados como:

- mostrando aumento da incidência, relacionado à substância em teste, de neoplasias malignas;
- mostrando aumento significante de neoplasias benignas;
- exibindo aumento dose-dependente substancial da incidência de neoplasias malignas e benignas.

8.1.2. Evidência parcial de carcinogenicidade

É demonstrada por estudos que são interpretados como:

- mostrando aumento da incidência de neoplasias benignas, relacionado à substância em teste;
- exibindo aumento marginal (tendência) de neoplasias em vários órgãos e tecidos.
- demonstrando leve aumento de neoplasias raras malignas ou benignas.

8.1.3. Evidência duvidosa de carcinogenicidade

É demonstrada por estudos que são interpretados como mostrando aumento (tendência) da incidência de neoplasia, relacionado à substância em teste.

8.1.4. Nenhuma evidência de carcinogenicidade

É demonstrada por estudos que são interpretados como não mostrando qualquer aumento da incidência de neoplasias benignas ou malignas, relacionado à substância em teste.

8.1.5. Estudo inadequado de carcinogenicidade

É o que, devido à limitação qualitativa ou quantitativa relevante, não pode ser interpretado como válido para mostrar tanto a presença como a ausência de efeito carcinogenético.

8.2. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer (IARC)

8.2.1. Evidência suficiente de carcinogenicidade

Indica que há um aumento da incidência de tumores malignos em diferentes espécies ou linhagens, ou em diferentes experimentos (com diferentes doses e/ou vias de administração), ou em relação à incidência, local ou tipo de tumor ou idade de início.

Evidências adicionais podem ser fornecidas por estudos da relação dose-resposta, por testes de curta-duração ou por estudos sobre a estrutura química.

8.2.2. Evidência limitada de carcinogenicidade

Os dados sugerem efeito carcinogênico, mas são limitados porque o estudo tratou de uma só espécie, linhagem ou experimento, ou os experimentos são limitados pela impropriedade de doses, vias de exposição, duração, segmento, registro, mortalidade, número de animais e laudos diagnósticos, ou ainda as neoplasias observadas ocorrem espontaneamente e a diferenciação histológica entre benignas e malignas é difícil.

8.2.3. Evidência inadequada de carcinogenicidade

- idem aos ítens pertinentes de 8.1, ou
- dentro dos limites dos testes usados, a substância testada não é carcinogenética;
- quando o número de estudos publicados é pequeno, já que, em geral, estudos com resultados negativos não são divulgados, tanto quanto os que sugerem carcinogenicidade.

8.2.4. Nenhum dado:

Não há informações disponíveis.

9. BIBLIOGRAFIA

9.1. CABRAL, JR. Análise crítica de testes a longo prazo com vistas a carcinogenicidade. In: PAOLA, D. de. ed. Câncer e Meio Ambiente. Rio de janeiro, Medsi editora. 1985.

9.2. GART JJ; CHU KC; TARONE RE. Statistical issues in interpretation of chronic biopsy test for carcinogenicity. J.N.C.I., 62: 957-975, 1979.

9.3. GRALLA EJ. Scientific considerations in monitoring and evaluating toxicological research. New York, McGraw-Hill. 1982.

9.4. HILIENFELD, & HILIENFELD, J. Foundations of Epidemiology. 2and.ed. - Oxford - New York, Oxford University Press, 1980.

9.5. HOTTENDORF GH & PACHTER IJ. An Analysis of the carcinogenesis testing experience of the Nacional Cancer Institute. Toxicologic Pathology, 10:22-26, 1982.

9.6. IARC MONOGRAPH. Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. Supplement 2. Lyon, France, 1980.

9.7. IARC MONOGRAPH. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Supplement 4. Lyon, France, 1982.

9.8. Interdisciplinary panel on carcinogenicity (IPC). Criteria for evidence of chemicals carcinogenicity. Science, 225: 682-687, 1984.

9.9. Report of the NPT ad hoc Panel on Chemicals Carcinogenesis Testing and Evaluation. Board of Scientific Conselors. National Toxicology Program (NTP), IS Departament of Health and Human Service, 1984.

9.10. WHO. World Health Organization. Guidelines on Studies in Environmental Epidemiology. Environmental Health Criteria, 27, 1983.

9.11. WHO. World Health Organization. Summary reporty on the evaluation of short-tests for carcinogens. (Collaboration sutdy on "in vitro" tests) Environmental Health Criteria, 47, 1985.