

PARTE C: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

INTRODUÇÃO GERAL: PARTE C

Os métodos de ensaio a seguir descritos destinam-se à determinação de algumas das propriedades ecotoxicológicas enumerados no Anexo VIII da Directiva 79/831/CEE. Os notificadores devem ter conhecimento de que não se encontram incluídos no texto os métodos para a determinação das seguintes propriedades previstas no Nível 1 do Anexo VIII:

- estudo de toxicidade prolongada com *Daphnia magna*,
- ensaio numa planta superior,
- estudo de toxicidade prolongada com peixes,

Logo que sejam incluídos os métodos de ensaio adequados para a determinação destas propriedades, não publicados sob a forma de uma nova adaptação ao progresso técnico. Entretanto, os notificadores devem utilizar métodos adequados, internacionalmente reconhecidos, que devem ser nomeados à autoridade competente.

C. 8

TOXICIDADE EM RELAÇÃO ÀS MINHOCAS

ENSAIO UTILIZANDO SOLO ARTIFICIAL

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Neste ensaio laboratorial, a substância de ensaio é adicionada a um solo artificial no qual são colocadas minhocas durante 14 dias. Após este período (e, facultativamente, após 7 dias) examina-se o efeito letal da substância nas minhocas. O ensaio fornece um método para a avaliação, num prazo relativamente curto, do efeito dos produtos químicos nas minhocas, por absorção via cutânea e alimentar.

1.2. Definição e unidade

CL₅₀: a concentração de uma substância que se considera responsável pela morte de 50 % dos animais de ensaio durante o período de ensaio.

1.3. Substância de referência

É utilizada periodicamente uma substância de referência com o objectivo de demonstrar que a sensibilidade do sistema de ensaio não variou significativamente.

Recomenda-se como substância de referência a cloroacetamida de pureza analítica.

1.4. Princípio do método

O solo constitui um meio variável e, por essa razão, é utilizado neste ensaio um solo franco artificial cuidadosamente definido. As minhocas adultas da espécie *Eisenia foetida* (ver nota em anexo) são mantidas num solo artificial, tratado com diferentes concentrações da substância de ensaio. O conteúdo dos recipientes é espalhado sobre um tabuleiro 14 dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio e contam-se as minhocas sobreviventes, para cada uma das concentrações.

1.5. Critérios de qualidade

Prende-se que o ensaio seja o mais reprodutível possível no que diz respeito ao substrato e ao organismo a ensaiar. A mortalidade nos controlos não deve exceder 10 % no termo do ensaio, caso contrário este não é válido.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. Materiais

1.6.1.1. Substrato para o ensaio

É utilizado como substrato de base para o ensaio um solo artificial de constituição bem definida.

- a) Substrato de base (as percentagens são expressas em termos de peso seco):
 - 10 % de turfa de esfagno (tão próximo quanto possível do pH 5,5—6,0, sem resíduos vegetais visíveis e finamente moído),
 - 20 % de argila caulínica, de preferência com mais de 50 % de caulinite,
 - cerca de 69 % de areia industrial com quartzo (predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria 0,05—0,2 mm). Se a substância não for suficientemente dispersível em água é necessário dispor de 10 g por recipiente de ensaio para misturar posteriormente com a substância de ensaio,
 - cerca de 1 % de carbonato de cálcio (CaCO₃) pulverizado e quimicamente puro para ajustar o pH a 6,0 ± 0,5;
- b) Substrato para o ensaio
O substrato para o ensaio contém substrato de base, a substância de ensaio e água desionizada. O teor em água deve corresponder a cerca de 25—42 % do peso seco do substrato de base. O teor em água do substrato determina-se por secagem da amostra a 105 °C até se obter um peso constante. O critério-chave é que o solo artificial seja humedecido até à sua saturação. Deve-se proceder à sua mistura cuidadosamente de modo a obter uma distribuição uniforme da substância de ensaio e do substrato. Deve ser referido o modo como é introduzida a substância de ensaio no substrato;
- c) Substrato de controlo
O substrato de controlo contém o substrato de base e água. Se se utilizar um aditivo, um substrato de controlo suplementar deverá conter idêntica quantidade do aditivo.

- 1.6.1.2. **Recipientes de ensaio**
Recipientes em vidro, com uma capacidade aproximada de um litro (adequadamente cobertos com tampas de plástico, discos ou filme de plástico perfurados para efeitos de ventilação) cheios com uma dada quantidade de substrato húmido para ensaio ou substrato de controlo, equivalente a 500 g de substrato seco.
- 1.6.2. **Condições do ensaio**
Os recipientes devem ser mantidos em câmaras climatizadas a uma temperatura de 20 ± 2 °C com luz contínua. A intensidade da luz deve situar-se entre 400 e 800 luz.
A duração do ensaio é de 14 dias, mas pode-se optar por avaliar a mortalidade após terem decorrido 7 dias desde o início do ensaio.
- 1.6.3. **Método de ensaio**
Concentrações de ensaio
As concentrações da substância de ensaio são expressas em peso de substância por unidade de peso seco do substrato de base (mg/kg).
Ensaio de determinação de concentrações
O intervalo de concentrações susceptível de provocar mortalidades de zero a 100% pode ser determinado num ensaio de determinação de concentrações, com o objectivo de fornecer informações relativas ao intervalo de concentrações a utilizar no ensaio definitivo.
A substância deve ser ensaiada nas seguintes concentrações: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg substância/kg de substrato de ensaio (peso seco).
Se se efectuar um ensaio definitivo completo, um meio de ensaio por cada concentração e um meio para o controlo não tratado, cada um dos quais com dez minhocas, pode ser suficiente para o ensaio de determinação de concentrações.
Ensaio definitivo
Os resultados do ensaio de determinação de concentrações são utilizados para escolher pelo menos cinco concentrações segundo uma série geométrica que provoquem uma mortalidade de 0 a 100%, diferindo entre si de um factor constante não superior a 1,8.
Um ensaio que utilize estas séries de concentração deve permitir avaliar com a maior precisão possível o valor de CL_{50} e os respectivos limites de confiança.
No ensaio definitivo utilizam-se pelo menos quatro meios de ensaio por concentração e quatro meios de controlo sem tratamento, cada um deles com dez minhocas. Os resultados das repetições destes meios são expressos em termos de média e desvio padrão.
Quando duas concentrações consecutivas, com uma razão de 1,8 entre si, dão apenas mortalidades de 0% e 100%, esses dois valores são suficientes para determinar o intervalo em que se situa a CL_{50} .
Mistura do substrato de base para o ensaio e da substância de ensaio
Sempre que possível, o substrato para o ensaio deve ser preparado sem quaisquer aditivos além de água. Prepara-se uma emulsão ou dispersão da substância de ensaio em água desionizada ou outro solvente e, imediatamente antes do início do ensaio, mistura-se com o substrato de base para o ensaio, ou pulveriza-se uniformemente sobre ele, com um dispositivo de pulverização para cromatografia fina ou outro semelhante.
Se a substância de ensaio for insolúvel em água, pode ser dissolvida num determinado volume, o mais pequeno possível, de um solvente orgânico adequado (por exemplo: hexano, acetona ou clorofórmio).
Para solubilizar, dispersar ou emulsionar a substância de ensaio apenas se podem utilizar agentes que se volatilizem facilmente. O substrato para o ensaio deve ser arejado antes de ser utilizado. A quantidade de água evaporada deve ser substituída. O controlo deve conter a mesma quantidade de qualquer aditivo.
Se a substância de ensaio não for solúvel, dispersível ou emulsionável, em solventes orgânicos, misturam-se 490 g de substrato de ensaio seco com 10 g de uma mistura de areia fina com quartzo e uma quantidade de substância de ensaio correspondente à dose necessária para tratar 500 g de solo artificial seco.
Para cada meio de ensaio, são colocados, em cada recipiente de vidro, uma dada quantidade de substrato húmido para o ensaio, equivalente a 500 g de peso seco e, sobre a superfície do substrato para o ensaio, 10 minhocas. Estas minhocas foram acondicionadas durante 24 horas num substrato de base húmido semelhante ao de ensaio, após o que foram rapidamente lavadas e a água em excesso absorvida com um papel de filtro antes da utilização.
Os recipientes são cobertos com tampas de plástico, discos ou filmes de plástico perfurados para evitar que o substrato seque e são mantidos nas condições de ensaio durante 14 dias.
A avaliação deve ser efectuada 14 dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio. O substrato é espalhado sobre uma placa de vidro ou aço inoxidável. Examinam-se então as minhocas e determina-se o número de sobreviventes. Considera-se que as minhocas estão mortas se não reagirem a um ligeiro estímulo mecânico aplicado na extremidade frontal.
Quando o exame é efectuado no 7º dia, o recipiente enche-se novamente com substrato e as minhocas sobreviventes são de novo colocadas na mesma superfície do substrato de ensaio.

- 1.6.4. **Organismos a utilizar no ensaio**
Os organismos a utilizar no ensaio devem ser adultos da espécie *Eisenia foetida* (ver nota em anexo) (pelo menos com 2 meses de vida e com clitelo), com peso húmido de 300 a 600 mg (ver método de reprodução em anexo).
2. **DADOS**
- 2.1. **Processamento e avaliação de resultados**
As concentrações da substância de ensaio apresentam-se em função das percentagens correspondentes de minhocas mortas.
Quando os dados são adequados, o valor CL_{50} e os limites de confiança ($p = 0,05$) devem ser determinados utilizando métodos padrão (*Litchfield e Wilcoxon, 1949*, ou método equivalente). O valor CL_{50} deve ser expresso em mg de substância de ensaio por kg de substrato de ensaio (peso seco).
Nos casos em que o declive da curva de concentrações é demasiado abrupto para permitir o cálculo da CL_{50} , é suficiente uma estimativa gráfica deste valor.
Quando duas concentrações consecutivas com uma razão de 1,8 entre si provocam 0% e 100% de mortalidade, estes dois valores são suficientes para indicar o intervalo entre o qual se situa a CL_{50} .
3. **RELATÓRIO**
- 3.1. **Relatório do ensaio**
O relatório do ensaio deve incluir, se possível, as seguintes informações:
— referir se o ensaio foi efectuado de acordo com os critérios de qualidade acima mencionados,
— tipo de ensaio (ensaio de determinação de concentrações c/ou ensaio definitivo),
— descrição exacta das condições de ensaio ou referir se o ensaio foi efectuado de acordo com o método; devem ser referidos todos os desvios em relação ao método indicado,
— descrição exacta do modo como a substância de ensaio foi misturada com o substrato de base para o ensaio,
— informações relativas aos organismos utilizados no ensaio (espécie, idade, peso médio e intervalo de variação do peso, condições de reprodução e manutenção, fornecedor),
— método utilizado na determinação da CL_{50} ,
— resultados dos ensaios, incluindo todos os dados utilizados,
— descrição dos sintomas ou alterações do comportamento observados nos organismos utilizados no ensaio,
— mortalidade nos controlos,
— CL_{50} ou a mais elevada concentração ensaiada que não provocou mortalidade e a concentração ensaiada mais baixa que provocou uma mortalidade de 100%, catorze dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio,
— representação gráfica da curva concentração-resposta,
— resultados obtidos com a substância de referência quer em relação ao presente ensaio quer provenientes de anteriores ensaios de controlo de qualidade.
4. **BIBLIOGRAFIA**
(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Decisão C (81) 30 final do Conselho.
(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R. *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pp.
(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, p. 99.
(5) Comissão das Comunidades Europeias, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicology of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.
(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden»*, in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed. Landsberg, 1986.

Apêndice

Reprodução e manutenção das minhocas antes do ensaio

Para reproduzir os animais, colocar 30 a 50 minhocas adultas numa caixa de reprodução com substrato fresco e removê-las ao fim de 14 dias. Estes animais podem ser utilizados para futuros lotes de reprodução. As posturas são utilizadas no ensaio quando atingirem a maturidade (nos termos das condições determinadas, ao fim de 2 a 3 meses).

Condições de reprodução e manutenção

Câmara climatizada: temperatura 20 ± 2 °C, de preferência dispor de luz contínua (de intensidade 400 a 800 lux).

Caixas de reprodução: recipientes adequados de pequena profundidade, com um volume de 10 a 20 l.

Substrato: *Eisenia foetida* pode ser criada em vários excrementos animais. Recomenda-se como meio de reprodução a utilização de uma mistura de 50% de turfa e 50% de estrume de cavalo ou vaca. O meio deve ter um pH de aproximadamente 6 a 7 (ajustado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (inferior a 6 mmhos ou 0,5% de concentração de sais).

O substrato deve ser húmido, mas não demasiado molhado.

Além do método acima referido, podem ser utilizados com êxito outros processos.

Nota: Eisenia foetida existe sob a forma de duas subespécies que alguns taxonomistas separaram em espécies (Bouche, 1972). São morfológicamente semelhantes mas uma delas, a *Eisenia foetida foetida*, apresenta como característica listas ou bandas transversais sobre os segmentos e a outra, a *Eisenia foetida andrei*, não possui tal característica, apresentando uma coloração avermelhada matizada. Sempre que possível, deve-se utilizar a *Eisenia foetida andrei*. Podem ser utilizadas outras espécies desde que se disponha da necessária metodologia.

C. 9

BIODEGRADAÇÃO

ENSAIO DE ZAHN E WELLENS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo do presente método é a avaliação da biodegradação final potencial de substâncias orgânicas, não voláteis, solúveis em água quando são expostas a concentrações relativamente elevadas de microrganismos num ensaio estático.

Pode-se verificar adsorção físico-química sobre os sólidos em suspensão, o que deve ser tomado em consideração na interpretação dos resultados (ver 3.2).

As substâncias a estudar são utilizadas em concentrações que correspondem a valores de COD que vão de 50 a 400 mg/litro ou a valores de CQO situados entre 100 e 1 000 mg/l (COD = carbono orgânico dissolvido; CQO = carência química de oxigénio). Estas concentrações relativamente elevadas asseguram uma boa confiança analítica. Os compostos dotados de propriedades tóxicas podem atrasar ou inibir o processo de degradação.

No presente método, utiliza-se a medição da concentração do carbono orgânico dissolvido ou a carência química de oxigénio para avaliar a biodegradação final da substância de ensaio.

A utilização simultânea de um método analítico específico pode permitir a avaliação da biodegradação primária da substância (desaparecimento da estrutura química inicial).

O método apenas se aplica às substâncias orgânicas que, na concentração utilizada no ensaio:

- são solúveis em água nas condições do ensaio,
- têm uma pressão de vapor negligenciável nas condições do ensaio,
- não exercem efeitos inibidores sobre as bactérias,
- não sofrem uma adsorção importante pelo equipamento de ensaio,
- não desaparecem da solução de ensaio devido à formação de espuma.

Na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que estes resultados são baixos ou marginais, é útil conhecer as proporções relativas dos principais elementos constituintes da substância de ensaio.

Na interpretação de resultados pouco elevados e na selecção das concentrações de ensaio adequadas, é desejável dispor de informações relativas à toxicidade da substância em relação aos microrganismos.

1.2. Definições e unidades

A taxa de degradação alcançada no final do ensaio constitui a 'Biodegradação no ensaio de Zahn e Wellens':

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

em que:

D_T = biodegradação (%) no instante T,

C_A = Valores do COD (ou da CQO) da mistura de ensaio medidos três horas após o início do ensaio (mg/l)
(COD = carbono orgânico dissolvido, CQO = carência química do oxigénio),

C_T = valores do COD ou da CQO na mistura do ensaio no momento da colheita da amostra (mg/l),

C_B = valor do COD ou da CQO do ensaio em branco no momento da colheita da amostra,

C_{BA} = valor do COD ou da CQO do ensaio em branco, medido três horas após o início do ensaio (mg/l).

A taxa de degradação obtida é arredondada até ao valor inteiro da percentagem mais próxima.

A percentagem de degradação é definida como sendo a percentagem de remoção de COD (ou da CQO) da substância de ensaio.

A diferença entre o valor medido após 3 horas e o valor inicial calculado ou de preferência, medido, pode fornecer informações úteis relativas à eliminação da substância (ver 3.2, Interpretação dos resultados).

1.3. Substâncias de referência

No estudo de novas substâncias, podem por vezes ser úteis substâncias de referência; contudo, ainda não podem ser recomendadas substâncias de referência específicas.

1.4. Princípio do método de ensaio

Colocam-se num recipiente de vidro de 1 a 4 litros de capacidade, munido de um agitador e de um arejador, uma solução aquosa de lamas activadas, substâncias nutritivas minerais e a substância de ensaio que constituem a única fonte de carbono. A mistura é agitada e arejada a uma temperatura de 20 a 25°C, sob uma iluminação difusa ou numa câmara escura durante um período que pode ir até vinte e oito dias. Acompanha-se o processo de degradação determinando o valor do COD (ou da CQO) na solução filtrada, diariamente ou segundo uma outra periodicidade adequada. Após cada período, o COD (ou a CQO) eliminado é referido ao valor verificado três horas após o início do ensaio e expresso em percentagem de biodegradação; isto constitui a medida da taxa de degradação nesse momento. O resultado é representado graficamente em função do tempo, o que permite obter a curva de biodegradação.

Se se utiliza um método analítico específico, podem-se medir as variações da concentração da molécula original atribuíveis à biodegradação (biodegradação primária).

1.5. Critérios de qualidade

A reprodutibilidade do presente método foi provada num ensaio de intercalibração.

A sensibilidade do método é largamente determinada pela variabilidade do ensaio em branco e, em menor extensão, pela precisão da determinação do carbono orgânico dissolvido e da concentração da substância de ensaio no meio.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. Preparações

1.6.1.1. Reagentes

Água utilizada no ensaio: água de beber contendo menos de 5 mg/l de carbono orgânico. A concentração total de iões, cálcio e magnésio não deve ultrapassar 2,7 mmol/l; se não for o caso, corrigir a diluição com a necessária quantidade de água desionizada ou destilada.

Ácido sulfúrico de pureza analítica (P.A.):	50 g/l.
Solução de hidróxido de sódio P.A.:	40 g/l.
Solução nutritiva mineral: dissolver num litro de água desionizada:	
cloreto de amónio, NH ₄ Cl, P.A.:	38,50 g,
dihidrogenofosfato de sódio, NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, P.A.:	33,40 g,
dihidrogenofosfato de potássio KH ₂ PO ₄ , P.A.:	8,50 g,
monohidrogenofosfato de dipotássio K ₂ HPO ₄ , P.A.:	21,75 g.

A mistura serve simultaneamente de meio nutritivo e solução tampão.

1.6.1.2. Equipamento

Recipientes de vidro com uma capacidade de 1 a 4 litros (por exemplo, recipientes cilíndricos).

Dispositivos de agitação com um agitador em vidro ou em metal fixado a uma haste adequada (o agitador deve descrever um movimento rotativo a cerca de 5 a 10 cm do fundo do recipiente). Pode-se utilizar igualmente um agitador magnético com 7 a 10 cm de comprimento.

Tubo de arejamento em vidro com 2 a 4 mm do diâmetro interno. A abertura do tubo deve situar-se cerca de 1 cm acima do fundo do recipiente.

Centrífuga (cerca de 3 550 g).

Potenciómetro.

Aparelho para a medição do oxigénio dissolvido.

Papéis de filtro.

Aparelho de filtração por membrana.

Membranas filtrantes de porosidade 0,45 µm. As membranas filtrantes são adequadas se não libertarem carbono e não absorverem a substância na fase da filtração.

Material de análise para a dosagem do carbono orgânico e a determinação da carência química de oxigénio.

1.6.1.3. Preparação do inóculo

Lavar as lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento biológica por sucessivas centrifugações ou decantações com água do ensaio (ver acima).

As lamas activadas devem possuir as características adequadas. Esta lama pode ser obtida numa estação de tratamento de águas residuais em boas condições de funcionamento. Para dispor do maior número possível de diferentes espécies ou de estirpes de bactérias, pode ser preferível misturar os inóculos provenientes de diferentes fontes (por exemplo, de diferentes estações de tratamento, extractos de solo, água de rios, etc.). A mistura deve ser tratada tal como é acima indicado.

Para o controlo da actividade das lamas activadas, ver abaixo «Controlo funcional».

1.6.1.4. Preparação das soluções de ensaio

Num recipiente de ensaio, adicionar 500 ml de água de ensaio, 2,5 ml/l de solução mineral nutritiva e uma quantidade de lamas activadas correspondente a 0,2 a 1,0 g/l de matéria seca na mistura final. Adicionar uma quantidade suficiente de solução de reserva da substância de ensaio de modo a obter, na mistura final, uma concentração de COD de 50 a 400 mg/l. Os valores correspondentes de CQO são 100 a 1 000 mg/l. Adicionar água até um volume total de 1 a 4 litros. O volume total escolhido depende do número de amostras a colher para a determinação do COD ou da CQO e do volume necessário para a análise.

Normalmente consideram-se dois litros como o volume satisfatório. Para cada série de ensaios, preparar pelo menos um recipiente controlo (branco) contendo apenas as lamas activadas e a solução mineral nutritiva, diluídas com água de ensaio, até se dispor de um volume total idêntico ao dos recipientes de ensaio.

1.6.2. Execução do ensaio

Agitam-se os recipientes de ensaio com agitadores magnéticos ou agitadores a hélice, sob iluminação difusa ou numa câmara escura, a uma temperatura de 20 a 25 °C. O arejamento processa-se por injeção de ar comprimido purificado por um filtro de algodão em rama e, se necessário, por um frasco de lavagem. Deve-se garantir que a lama não se deposite e que a concentração de oxigénio não desça abaixo de 2 mg/l.

O valor de pH deve ser verificado a intervalos regulares (por exemplo, diariamente) e ajustado a pH 7 a 8, se necessário.

As perdas devidas à evaporação são compensadas, imediatamente antes de cada colheita de amostras, com água desionizada ou destilada nas quantidades adequadas. Um bom método consiste em marcar o nível do líquido no recipiente antes de dar início ao ensaio. Após cada colheita, marcam-se de novo os recipientes (sem arejamento nem agitação). As primeiras amostras são sempre colhidas três horas após o início do ensaio, de modo a permitir detectar uma adsorção da substância de ensaio pelas lamas activadas.

À degradação da substância de ensaio segue-se a dosagem do COD ou da CQO, diariamente, ou a outro intervalo regular. Filtrar as amostras provenientes do recipiente de ensaio e do recipiente de controlo (branco) através de um papel de filtro cuidadosamente lavado. Rejeitar os primeiros 5 ml do filtrado da solução de ensaio. As lamas dificilmente filtráveis podem ser previamente eliminadas por uma centrifugação de 10 minutos. As determinações do COD e da CQO efectuam-se pelo menos em duplicado. A duração dos ensaios prolonga-se até 28 dias.

Observação: As amostras que permanecem turvas são filtradas através de filtros de membrana. Estes não devem libertar nem adsorver matérias orgânicas.

Controlo funcional de lamas activadas

Por cada série de ensaios é necessário prever um recipiente que contenha uma substância conhecida de forma a poder verificar a capacidade funcional de lamas activadas. O dietilenoglicol revelou-se útil para este efeito.

Adaptação

Se as análises são efectuadas a intervalos relativamente curtos (por exemplo diariamente), a curva de degradação pode fazer salientar claramente um fenómeno de adaptação (ver figura 2). O ensaio não deverá, portanto, ser iniciado imediatamente antes de um fim-de-semana.

Se a adaptação tem lugar nos últimos dias do ensaio, este deve ser prolongado até à degradação completa.

Observação: Se for necessário um melhor conhecimento do comportamento da lama, as mesmas lamas activadas são expostas de novo à mesma substância de ensaio de acordo com o seguinte processo:

Parar o agitador e o arejador e deixar precipitar as lamas activadas. Retirar o sobrenadante, encher com água de ensaio até perfazer dois litros, agitar durante 15 minutos e deixar de novo precipitar. Retirar de novo o sobrenadante e utilizar as restantes lamas para repetir o ensaio com a mesma substância, em conformidade com os pontos 1.6.1.4 e 1.6.2 anteriores. As lamas activadas podem igualmente ser separadas por centrifugação em vez de precipitação.

As lamas adaptadas podem ser misturadas com as lamas frescas para atingir 0,2 a 1 g de matéria seca/litro.

Análises

De um modo geral as amostras são filtradas através de um papel de filtro cuidadosamente lavado com água desionizada.

As amostras que permanecem turvas são filtradas através de filtros de membrana (0,45 µm).

Determinar a concentração de COD em duplicado nos filtrados das amostras (rejeitar os primeiros 5 ml) com o auxílio de um aparelho de medição do TOC. Se a análise do filtrado não puder ser efectuada no próprio dia, conservá-la no frigorífico até ao dia seguinte. Não é aconselhável conservá-la mais tempo.

Determinar a concentração da CQO nos filtrados das amostras com o auxílio do dispositivo de análise da CQO, em conformidade com o procedimento descrito no ponto 2 seguinte.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

Proceder a, pelo menos, duas determinações da concentração do COD e da CQO nas amostras, em conformidade com as indicações acima fornecidas em 1.6.2. Calcular a percentagem de degradação no instante T de acordo com a fórmula (com as suas definições) dada no ponto 1.2 anteriormente indicado.

Arredondar a taxa de degradação até à unidade de percentagem mais próxima. A taxa de degradação atingida no final do ensaio constitui a «Biodegradação no ensaio de Zahn-Wellens».

Observação: Se se realiza a degradação completa antes do final da duração do ensaio e se este resultado for confirmado por uma segunda análise efectuada no dia seguinte, pode-se dar o ensaio por concluído.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

- a concentração inicial da substância,
- quaisquer outras indicações e os resultados experimentais relativos à substância ensaiada, à substância de referência eventualmente usada e ao ensaio de controlo (branco),
- a concentração após três horas,
- a curva de biodegradação com a respectiva descrição,
- a data e o local de colheita dos organismos de ensaio, fase de adaptação, concentração utilizada, etc,
- as razões científicas de eventuais alterações ao método de ensaio.

3.2. Interpretação dos resultados

A eliminação do COD (ou da CQO) que se produz gradualmente durante um determinado número de dias ou de semanas indica que a substância ensaiada se degrada biologicamente.

Contudo, uma adsorção físico-química pode desempenhar um papel em determinados casos, o que é indicado quando se verifica uma remoção total ou parcial da substância desde o início, durante as primeiras três horas, e a diferença entre os licores sobrenadantes de ensaio e de controlo permanecem a um nível inesperadamente baixo.

São necessários ensaios suplementares se se pretender estabelecer a distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção.

Existem diversos métodos para estabelecer tal distinção, sendo o melhor a utilização do sobrenadante como inóculo num ensaio preliminar (de preferência um ensaio respirométrico).

As substâncias de ensaio que conduzem a uma elevada remoção neste ensaio, não associada à adsorção do COD (ou do CQO), devem ser consideradas como potencialmente biodegradáveis. Uma eliminação parcial, não associada à adsorção, indica que o produto químico é, pelo menos, biodegradável em determinada extensão. Uma eliminação baixa ou nula de COD (ou de CQO) pode ser atribuída à inibição dos microrganismos pela substância ensaiada, o que pode ser também revelado pela lise e perda de lamas, dando origem a sobrenadantes turvos. O ensaio deve ser repetido utilizando uma menor concentração da substância de ensaio.

A utilização de um método analítico específico em relação a um composto ou de uma substância de ensaio marcada com ^{14}C pode permitir uma maior sensibilidade. No caso dos compostos marcados com ^{14}C , a recuperação do $^{14}\text{CO}_2$ confirmará que se verificou biodegradação.

Quando os resultados se exprimem em termos de biodegradação primária, deve ser dada, se possível, uma explicação relativa à modificação de estrutura química que conduz a uma diminuição da resposta da substância original.

A validade do método analítico deve ser acompanhada da indicação da resposta encontrada no ensaio de controlo (branco).

4. REFERÊNCIAS

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Decisão C(81) 30 final do Conselho.
- (2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Directiva 84/449/CEE da Comissão, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* n.º L 251 de 19. 9. 1984.

Apêndice

EXEMPLO DE UMA AVALIAÇÃO

Composto orgânico: ácido 4-etoxibenzóico
 Concentração teórica no ensaio: 600 mg/l
 COD teórico: 390 mg/l
 Inóculo: estação de tratamento de águas residuais de . . .
 Concentração: 1 grama matéria seca/litro
 Estado de adaptação: não adaptado
 Análise: determinação do COD
 Volume da amostra: 3 ml
 Substância de controlo: dietilenoglicol
 Toxicidade do composto: sem efeitos tóxicos para valores inferiores a 1 000 mg/l
 Ensaio realizado: ensaio em tubos de fermentação

Instante do ensaio	Substância de controlo				Substância de ensaio		
	Branco COD (1) mg/l	COD (1) mg/l	COD líquido mg/l	Degradação %	COD (1) mg/l	COD líquido mg/l	Degradação %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 horas	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dia	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dias	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dias	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dias	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dias	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dias	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dias	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dias	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valores médios de três determinações.

Figura 1

Exemplos de curvas de biodegradação

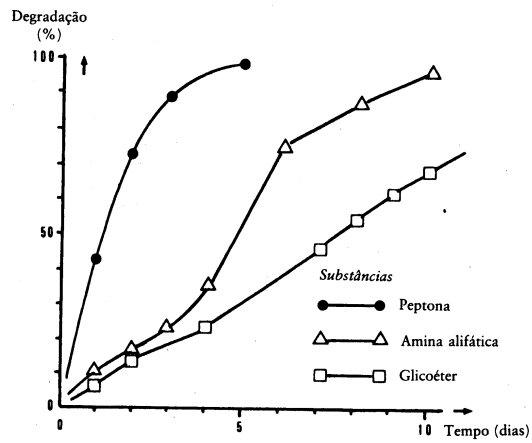
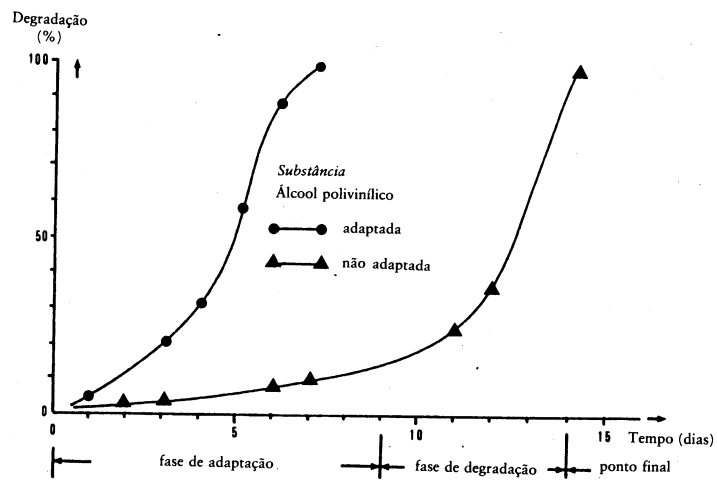


Figura 2

Exemplos de adaptação das lammas



C. 10

BIODEGRADAÇÃO

ENSAIOS DE SIMULAÇÃO DE LAMAS ACTIVADAS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

1.1.1. Observações gerais

Este método aplica-se apenas às substâncias orgânicas que nas concentrações utilizadas no teste:

- são suficientemente solúveis em água para permitir a preparação das soluções de ensaio,
- têm uma pressão de vapor negligenciável nas condições do ensaio,
- não provocam um efeito inibidor sobre as bactérias.

Na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que os resultados são pouco elevados ou marginais, serão úteis as informações respeitantes às proporções relativas dos principais componentes da substância de ensaio.

Para a interpretação dos resultados pouco elevados e na selecção das adequadas concentrações de ensaio, são desejáveis informações relativas à toxicidade da substância para os microrganismos.

1.1.2. Determinação da biodegradação final (análises COD/CQO)

O objectivo do presente método é determinar a biodegradação final medindo a remoção da substância e quaisquer metabolitos num modelo de uma estação de lamas activadas a uma concentração correspondente a mais de 12 mg COD/l (ou aproximadamente 40 mg de CQO/l). Parece ser 20 mg COD/l o valor óptimo. (COD = carbono orgânico dissolvido; CQO = carência química de oxigénio).

Deve ser determinado o teor em carbono orgânico (ou a carência química de oxigénio) de uma substância a ensaiar.

1.1.3. Determinação da biodegradação primária (análise específica)

O objectivo do método é determinar a biodegradação primária de uma substância num modelo de uma estação de lamas activadas, a uma concentração de cerca de 20 mg/l, utilizando um método analítico específico (podem utilizar-se concentrações maiores ou menores se o método analítico e as características de toxicidade o permitirem), o que torna possível a avaliação da biodegradação primária de uma substância (desaparecimento da estrutura química inicial).

O objectivo do presente método não é a determinação da mineralização da substância de ensaio.

Deve ser possível dispor de um método analítico adequado para a determinação da substância de ensaio.

1.2. Definições e unidades

1.2.1. Análise COD/CQO

A taxa de remoção de uma substância é dada pela fórmula:

$$TR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 (a)]$$

em que:

TR = taxa de remoção em percentagem de COD (ou de CQO) ao longo de um dado tempo de retenção médio da substância de ensaio,

T = concentração da substância de ensaio no afluente, em mg de COD/l (ou mg de CQO/l),

E = concentração de COD (ou CQO) no efluente da unidade de ensaio, em mg de COD/l (ou em mg de CQO/l),

E₀ = concentração de COD (ou CQO) no efluente da unidade em branco, em mg COD/l (ou CQO/l).

A degradação é expressa em termos de percentagem de remoção de COD (ou de CQO) no decurso de um dado tempo de retenção da substância de ensaio.

1.2.2. *Análise específica*

A percentagem de eliminação da substância de ensaio da fase aquosa (R_w) durante um dado tempo de retenção médio é dada pela fórmula:

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100\% \quad [1 (b)]$$

em que:

C_i = concentração da substância no afluente da unidade de ensaio (mg de substância/l, determinada por análise específica),

C_o = concentração da substância no efluente da unidade de ensaio (mg de substância/l, determinada por análise específica).

1.3. **Substâncias de referência**

Quando se estuda uma nova substância, podem, por vezes, revelar-se úteis substâncias de referência; contudo, ainda não podem ser recomendadas substâncias de referência especiais.

1.4. **Princípios dos métodos de ensaio**

Para a determinação da biodegradação final utilizam-se em paralelo duas unidades-piloto de lamas activadas (ensaio de confirmação OCDE ou unidades de vasos porosos). A substância de ensaio é adicionada ao afluente (águas residuais sintéticas ou domésticas) de uma das unidades, enquanto a outra recebe apenas as águas residuais. Para a determinação da biodegradação primária, com uma análise específica do afluente e do efluente, apenas se utiliza uma unidade.

As concentrações de COD (ou de CQO) são medidas nos efluentes, ou recorre-se a análises específicas para determinação das concentrações da substância.

O COD atribuível à substância de ensaio não é determinado, mas simplesmente referido.

Quando se efectuam medições do COD (ou de CQO), considera-se que a diferença entre as concentrações médias do efluente do ensaio e do efluente do controlo é devida à substância de ensaio não degradada.

Quando se efectuam análises específicas, podem ser medidas variações de concentração da molécula mãe (biodegradação primária).

As unidades podem funcionar segundo o «método das unidades interligadas», através de um processo de transinoculação.

1.5. **Critérios de qualidade**

A concentração inicial da substância depende do tipo de análise efectuada e respectivas limitações.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Preparação*

1.6.1.1. **Equipamento**

É necessário um par de unidades do mesmo tipo, excepto quando são efectuadas análises específicas. Podem ser utilizados dois tipos de equipamento:

Ensaio de confirmação da OCDE

O equipamento (Apêndice 1) consiste num recipiente de armazenagem (A) para as águas residuais sintéticas, uma bomba de doseamento (B), um recipiente de arejamento (C), um decantador (D), uma bomba de ar comprimido (E) para reciclar as lamas activadas e um recipiente (F) para a recolha do efluente tratado.

Os recipientes (A) e (F) devem ser de vidro ou de uma matéria plástica adequada e com uma capacidade de pelo menos 24 litros. A bomba (B) deve fornecer ao recipiente de arejamento um fluxo constante de águas residuais sintéticas; pode ser utilizado qualquer sistema adequado, desde que se assegure o fluxo de entrada e a concentração.

Durante o funcionamento normal, a altura do decantador (D) é fixada de modo a que o volume contido no recipiente de arejamento seja de 3 litros de licor misto. É suspenso no recipiente (C), por cima do cone, um arejador poroso (G). A quantidade de ar insuflada através do arejador deve ser registada por meio de um medidor de fluxo.

A bomba de ar comprimido (E) é fixada de modo a que as lamas activadas provenientes do decantador sejam contínua e regularmente recicladas para o recipiente de arejamento (C).

«Vaso poroso»

O vaso poroso é constituído por folhas de polietileno poroso (2 mm de espesura, diâmetro máximo dos poros 95 µm), enroladas de forma a constituir um cilindro de 14 cm de diâmetro, com uma base cónica de 45° (Figuras 1 e 2 do Apêndice 2). O vaso poroso é colocado dentro de um recipiente estanque em matéria plástica adequada com 15 cm de diâmetro e com um orifício na parte cilíndrica a 17,2 cm da base do cilindro que determina a capacidade (3 l) do vaso. À volta do topo do vaso interior existe um anel de suporte rígido, em matéria plástica adequada de modo a que exista um espaço para o efluente de 0,5 cm entre os recipientes interior e exterior.

Os vasos porosos podem ser colocados na base de um banho de água controlado termostaticamente. Na base do vaso interior são colocados difusores adequados de modo a haver um fornecimento de ar na base.

Os recipientes (A) e (E) devem ser de vidro ou de matéria plástica adequada com uma capacidade de, pelo menos, 24 litros. A bomba (B) deve fornecer ao recipiente de arejamento um fluxo constante de águas residuais sintéticas; pode ser utilizado qualquer sistema adequado, desde que sejam assegurados o fluxo de entrada e a concentração.

São necessários vasos porosos interiores de reserva para substituir qualquer um que eventualmente seja obstruído durante a utilização; os vasos obstruídos podem ser limpos por imersão durante 24 horas numa solução de hipoclorito, seguida de uma lavagem cuidadosa com água da torneira.

1.6.1.2. Filtração

Aparelho de filtração de membrana e filtros de membrana, com uma porosidade de 0,45 µm. Os filtros de membrana são adequados se se garantir que não libertam carbono nem adsorvem a substância de ensaio na fase de filtração.

1.6.1.3. Águas residuais

Pode ser utilizado quer um efluente sintético adequado quer águas residuais domésticas.

Exemplo de um efluente sintético

Dissolver por cada litro de água da torneira:

Peptona:	160 mg,
Extracto de carne:	110 mg,
Ureia:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	4 mg,
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Águas residuais domésticas

Devem ser diariamente colhidas do sobrenadante do tanque de decantação primária de uma estação de tratamento que trate predominantemente águas residuais domésticas.

1.6.1.4. Solução de reserva da substância de ensaio

Deve ser preparada uma solução da substância de ensaio, por exemplo a 1 %, para se adicionar a concentração da substância de modo a que se conheça o volume adequado a adicionar à água residual ou directamente à unidade, através de uma segunda bomba que forneça a concentração de ensaio necessária.

1.6.1.5. Inóculo

Observação: Quando se utilizam águas residuais domésticas, não se justifica a utilização de um inóculo com uma baixa concentração de bactérias, mas podem-se utilizar lamas activadas.

Pode-se utilizar uma grande variedade de inóculos.

Apresentam-se três exemplos de inóculos adequados:

a) Inóculo do efluente secundário

O inóculo deve ser recolhido de um efluente secundário de boa qualidade, proveniente de uma estação de tratamento que trate predominantemente águas residuais domésticas. O efluente deve ser mantido em condições aeróbias no período entre a colheita das amostras e a sua utilização. Para preparar o inóculo filtra-se a amostra através de um filtro grosseiro e rejeitam-se os primeiros 200 ml. Mantém-se o filtrado em condições aeróbias até ser utilizado. Deve-se utilizar o inóculo no próprio dia da sua colheita e na inoculação devem-se utilizar pelo menos 3 ml.

b) Inóculo composto

Inóculo de efluente secundário:

Ver a descrição anterior.

Inóculo do solo:

Faz-se a suspensão de 100 g de terra de jardim (fértil, não esterilizada) em 1 000 ml de água de beber isenta de cloro. (Não são adequados solos com uma fracção extremamente elevada de argila, areia ou húmus). Após agitar a suspensão, deixa-se sedimentar durante 30 minutos. Filtra-se o sobrenadante através de um papel de filtro grosseiro, rejeitando-se os primeiros 200 ml. Areja-se imediatamente o filtrado e mantém-se arejado até ao momento da sua utilização. Deve-se utilizar o inóculo no próprio dia da sua colheita.

Inóculo de uma água superficial:

Obtém-se um outro inóculo parcial a partir de uma água superficial mesossapróbica. Filtra-se a amostra através de um papel de filtro grosseiro, rejeitando os primeiros 200 ml. Mantém-se o filtrado em condições aeróbias até ao momento da sua utilização. Deve-se utilizar o inóculo no próprio dia da sua colheita.

Juntam-se volumes iguais das três amostras de inóculos parciais, misturam-se cuidadosamente e retira-se o inóculo final desta mistura. Deve-se utilizar na inoculação pelo menos 3 ml.

c) Inóculo de lamas activadas

Pode ser utilizado como inóculo um determinado volume (não superior a 3 litros) de lamas activadas (teor em sólidos suspensos até a 2,5 g/l) colhidos de um tanque de arejamento de uma estação que trate predominantemente águas residuais domésticas.

1.6.2. *Método*

O ensaio é efectuado à temperatura ambiente, que deve ser mantida entre 18 °C e 25 °C.

Se tal for conveniente, o ensaio pode ser efectuado a uma temperatura inferior (até 10 °C); se a substância se degradar, não será normalmente exigida qualquer outra operação. Se, contudo, a substância não for degradada, o ensaio deve ser prosseguido a uma temperatura constante entre 18 °C e 25 °C.

1.6.2.1. *Período inicial: formação das lamas/estabilização das unidades*

O período de crescimento/estabilização das lamas é o período durante o qual a concentração de sólidos suspensos nas lamas activadas e a eficiência das unidades evolui até uma fase estacionária nas condições de funcionamento utilizadas.

O período inicial é o período que se estende desde o momento em que a substância de ensaio é adicionada pela primeira vez até ao instante em que a sua remoção atinge uma fase estacionária (valor relativamente constante). Este período não deve ultrapassar seis semanas.

O período de avaliação é de três semanas, a contar do momento em que a remoção da substância de ensaio atinge um valor relativamente constante e, em geral, elevado. Para as substâncias que apresentam uma degradação baixa ou nula durante as primeiras seis semanas, o período de avaliação considera-se como sendo as três semanas seguintes.

Começar por encher a(s) unidade(s) necessária(s) a um ensaio com o inóculo misturado com o afluente.

Accionam-se então o arejador [e a bomba de ar comprimido (E) no caso do ensaio de confirmação da OCDE] e a bomba de doseamento (B).

O afluente, sem a substância a ensaiar, deve passar através do recipiente de arejamento (C) quer à velocidade de um litro por hora quer à velocidade de meio litro por hora, o que dá um tempo de retenção médio de três ou seis horas.

A taxa de arejamento deve ser regulada de modo a que o conteúdo do recipiente (C) se mantenha constantemente em suspensão enquanto o teor em oxigénio dissolvido seja pelo menos de 2 mg/l.

Deve-se evitar a formação de espuma mediante meios adequados. Não devem ser utilizados agentes para evitar a formação de espumas que inibam as lamas activadas.

As lamas que se depositarem em torno do topo do recipiente de arejamento (C), [e no ensaio de confirmação da OCDE, na base do recipiente de decantação (D) e no circuito de circulação] devem ser de novo misturadas com o licor misto pelo menos uma vez por dia mediante raspagem ou qualquer outro meio adequado.

Quando as lamas já não conseguirem depositar-se, a sua densidade pode ser aumentada adicionando fracções de 2 ml de uma solução de cloreto de ferro a 5 %, quantas vezes for necessário.

O efluente é recolhido no recipiente (E ou F) durante vinte e quatro horas e colhe-se uma amostra depois de o misturar cuidadosamente. Deve-se proceder a uma cuidadosa limpeza do recipiente (E ou F).

Para vigiar e controlar a eficiência do processo mede-se a carência química de oxigénio (CQO) ou o carbono orgânico dissolvido (COD) do filtrado do efluente acumulado pelo menos duas vezes por semana e igualmente do afluente filtrado (utilizando uma membrana de porosidade igual a 0,45 µm, são rejeitados (aproximadamente) os primeiros 20 ml do filtrado).

A redução de CQO e COD deve estabilizar-se quando se atingir uma degradação diária regular.

O teor das lamas activadas em matéria seca no recipiente de arejamento deve ser determinado duas vezes por semana (em g/l). Pode-se fazer funcionar as unidades de uma das duas seguintes maneiras: determinar duas vezes por semana quer o teor em matéria seca das lamas activadas e no caso de ser superior a 2,5 g/l retirar as lamas activadas em excesso quer retirar diariamente 500 ml de licor misto de cada recipiente de modo a obter um tempo de retenção médio das lamas de seis dias.

Quando os parâmetros estimados e medidos [eficiência do processo (em termos de remoção de CQO e COD), concentração das lamas, decantabilidade das lamas, turvação dos efluentes, etc.] das duas unidades são suficientemente estáveis, a substância de ensaio pode ser adicionada ao afluente de uma das unidades, seguindo o ponto 1.6.2.2.

A substância de ensaio pode ser adicionada, alternativamente, no início do período de crescimento das lamas (1.6.2.1), em especial quando as lamas são introduzidas como inóculo.

1.6.2.2. Método de ensaio

Mantém-se as condições de funcionamento do período inicial e adiciona-se ao afluente da unidade de ensaio uma quantidade suficiente de solução-mãe (aproximadamente 1 %) da substância de ensaio de modo a que se obtenha a concentração desejável da substância de ensaio (aproximadamente 10 a 20 mg COD/l ou 40 mg CQO/l) nas águas residuais, o que pode ser feito misturando diariamente a solução-mãe nas águas residuais ou mediante um sistema de bombagem separado. Esta concentração pode ser atingida progressivamente. Se não se verificarem efeitos tóxicos da substância de ensaio sobre as lamas activadas podem experimentar-se concentrações mais elevadas.

A unidade em branco é alimentada apenas com afluente isento de substâncias adicionadas. Colhem-se volumes adequados de efluentes para análise e filtram-se através de filtros de membrana (045 µm), rejeitando os primeiros 20 ml (aproximadamente) de filtrado.

As amostras filtradas devem ser analisadas no próprio dia ou então devem ser conservadas mediante qualquer método adequado, por exemplo, utilizando 0,05 ml de uma solução de cloreto mercúrico (HgCl₂) a 1 % por cada 10 ml de filtrado ou armazenando o filtrado entre 2 a 4 °C até um máximo de 24 horas ou abaixo de -18 °C para períodos de tempo mais longos.

O período ao longo do qual se estende a experiência, que inclui a adição da substância de ensaio, não deve ultrapassar seis semanas e o período de avaliação não deve ser inferior a três semanas, ou seja, deve-se poder dispor de cerca de 14 a 20 determinações para o cálculo do resultado final.

Interligação das unidades

A interligação das unidades obtém-se trocando entre si, uma vez por dia, 1,5 l de licor misto (incluindo lamas) proveniente dos recipientes de arejamento das lamas activadas de duas unidades. No caso das substâncias de ensaio serem fortemente adsorventes, retiram-se apenas 1,5 l do líquido sobrenadante dos recipientes de decantação e deitam-se para o recipiente com lamas activadas da outra unidade.

1.6.2.3. Análise

Para acompanhar o comportamento da substância, podem ser efectuados dois tipos de análise:

COD ou CQO

As concentrações de COD são determinadas em duplicado com o analisador de carbono e/ou os valores da CQO são determinados em conformidade com a referência (2).

Análise específica

As concentrações da substância de ensaio são determinadas mediante um método analítico adequado. Sempre que possível, deve efectuar-se uma determinação específica da substância adsorvida nas lamas.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

2.1. Interligação das unidades

Quando se utiliza a interligação das unidades calculam-se as taxas de remoção TR diárias em % de acordo com 1.2.1.

Estas taxas de remoção TR diárias são corrigidas em termos de TRc para o material transferido devido ao processo de transinoculação através da equação [2] para um tempo de retenção médio de três horas ou da equação [3] para um tempo de retenção médio de 6 horas.

$$TRc = \frac{8}{7} TR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$TRc = \frac{4}{3} TR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Calcula-se a média das séries dos valores TRc e ainda o desvio padrão de acordo com a equação 4:

$$S_{TRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{TRc} - TRc_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

em que:

S_{TRc} = desvio padrão das séries de valores TRc

\overline{TRc} = média do valor TRc

n = número de determinações

Rejeitam-se os valores discrepantes das séries TRc segundo um processo estatístico adequado, por exemplo, o de Nalimov [6] para um nível de probabilidade de 95% e calcula-se de novo a média e o desvio padrão do conjunto de dados TRc sem os valores discrepantes.

Calcula-se então o resultado final recorrendo à equação [5]:

$$TRc = \overline{TRc} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{TRc} \quad [5]$$

em que:

$t_{n-1; \alpha}$ = valor tabelado de t para n pares de valores de E e E_O e confiança estatística P (P = 1 - α) pelo que P é fixado a 95% (1).

O resultado é expresso pela média com limites de tolerância ao nível de probabilidade de 95%, o desvio padrão e o número de dados da série das TRc menos os valores discrepantes, e o número de valores discrepantes, por exemplo:

TRc = 98,6 ± 2,3% da remoção de COD,

s = 4,65% da remoção de COD,

n = 18,

x = número de valores discrepantes.

2.2. Unidades não interligadas

O rendimento das unidades pode ser verificado do seguinte modo:

$$\% \text{ de remoção de CQO ou COD} = \frac{\text{CQO ou COD das águas residuais} - \text{CQO ou COD do efluente}}{\text{CQO ou COD das águas residuais}} \times 100$$

Esta remoção diária pode ser representada graficamente para permitir identificar qualquer tipo de tendência, por exemplo, climatização.

2.2.1. Utilização da determinação da CQO/COD

A taxa diária de remoção em % TR calcula-se segundo 1.2.1.

Calcula-se a média da série de valores TR e ainda o seu desvio padrão segundo a fórmula seguinte:

$$S_{TR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{TR} - TR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

em que:

S_{TR} = desvio padrão da série de valores TR_i

\overline{TR} = média dos valores TR_i

n = número de determinações.

Eliminam-se os valores discrepantes da série TR de acordo com um método estatístico adequado, por exemplo, o de Nalimov [6], ao nível de probabilidade de 95 % e calcula-se de novo o desvio padrão da série de dados TR, menos os valores discrepantes.

O resultado final é calculado por meio de equação [7]:

$$TR = \overline{TR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{TR} \quad [7]$$

em que:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabelado de t para n pares de valores de E e E_O e confiança estatística P (P = 1 - α) em que P é fixado a 95 % (1).

O resultado é expresso como a média com limites de tolerância ao nível de probabilidade de 95 %, o respectivo desvio padrão e o número de dados da série dos TR menos os valores discrepantes, e o número de valores discrepantes, por exemplo:

TR = (98,6 ± 2,3 %) de remoção de COD,

s = 4,65 % de remoção de COD,

n = 18,

x = número de valores discrepantes.

2.2.2. Utilização de análise específica

Calcula-se a percentagem de eliminação da substância a ensaiar da fase aquosa (R_w) de acordo com 1.2.2.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

- o formulário incluído no Anexo III, indicando as condições de funcionamento do ensaio,
- o equipamento escolhido (ensaio de confirmação da OCDE ou ensaio de vaso poroso),
- o modo de funcionamento escolhido: unidades interligadas ou não,
- as águas residuais: sintéticas ou domésticas,
- No caso das águas residuais domésticas: data e local de colheita da amostra,
- o inóculo com data e local de colheita da amostra,
- uma descrição do método de análise, se forem efectuadas análises específicas,
- a representação gráfica da remoção CQO ou COD em função do tempo durante o período inicial e o período de avaliação,
- recuperação analítica da substância de ensaio na forma de CQO ou COD na solução mãe,
- se foram efectuadas análises específicas, a representação gráfica da percentagem de remoção da substância a ensaiar da fase aquosa em função do tempo (período inicial e período de avaliação),
- a remoção média de COD ou de CQO da substância a ensaiar e o desvio padrão é calculado a partir dos resultados do período de avaliação, ou seja, quando há uma remoção regular da substância a ensaiar ou se verifica um período de funcionamento estacionário,
- a representação gráfica da concentração das lamas activadas em função do tempo,
- qualquer observação relativa às lamas activadas (rejeição de um excesso de lama, presença de um aglomerado, FeCl₃, etc.),
- concentração da substância utilizada no ensaio,
- todos os resultados relativos à análise efectuada nas lamas,
- todas as informações e resultados experimentais relativos à substância ensaiada e, se for caso disso, à substância de referência,
- as razões científicas de quaisquer modificações da metodologia.

3.2. Interpretação dos resultados

Uma remoção baixa da substância ensaiada da fase aquosa pode ser devida a uma inibição dos microrganismos pela substância ensaiada, o que pode igualmente traduzir-se por uma lise e perda de lamas, dando origem a um sobrenadante turvo, e por uma diminuição da eficiência da instalação-piloto do ponto de vista da remoção do COD (ou CQO).

A adsorção físico-química pode por vezes, ter influência. As diferenças entre a acção biológica na molécula e a adsorção físico-química podem ser reveladas por uma análise efectuada nas lamas após uma desorção adequada.

São necessários ensaios complementares, se se pretender estabelecer uma distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção, o que pode ser feito de diferentes maneiras, mas a mais conveniente consiste em utilizar o sobrenadante como inóculo num ensaio preliminar (de preferência ensaio respirométrico).

Se se observarem remoções acentuadas de COD ou CQO, estas são devidas a biodegradação enquanto que para as remoções baixas não é possível distinguir entre biodegradação e eliminação. Por exemplo, se um composto solúvel apresenta uma constante de adsorção elevada de 98 % e se a taxa diária de rejeição de lamas excedentárias é de 10 %, é possível uma eliminação que atinja 40 % no máximo; para uma taxa de rejeição de lamas excedentárias de 30 %, a eliminação devida à adsorção e à rejeição de lamas excedentárias pode atingir 65 % (4).

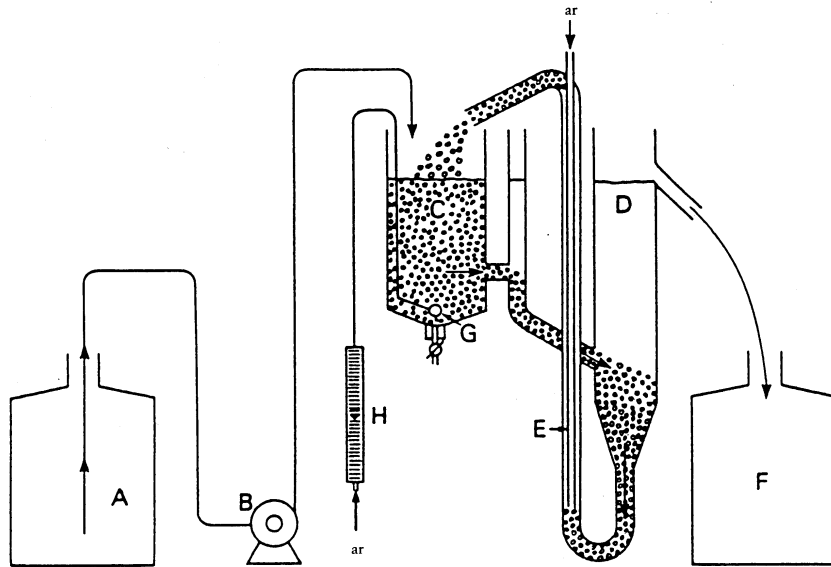
No caso de uma análise específica, é conveniente ter em atenção a relação entre a estrutura da substância e a análise específica efectuada. Nesse caso, o fenómeno observado não pode ser interpretado como uma mineralização da substância.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A*, Decisão C(81) 30 final do Conselho.
- (2) Annex V C9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Directiva 84/449/CEE da Comissão, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* n° L 251 de 19. 9. 1984.
- (3) Painter H. A., King E. F., WRC *Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, Junho 1978, Water Research Center, United Kingdom.
- (4) Wierich, P., Gerike, P., The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, n° 2, Junho 1981, pp. 161 a 171.
- (5) Directivas 82/242/CEE e 82/243/CEE do Conselho, JO n° L 109 de 22. 4. 1982 que altera as Directivas 73/404/CEE e 73/405/CEE do Conselho: Biodegradabilidade dos detergentes, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* n° L 347 de 17. 12. 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303(1980), pp. 406 a 408.

Apêndice 1

Figura 1

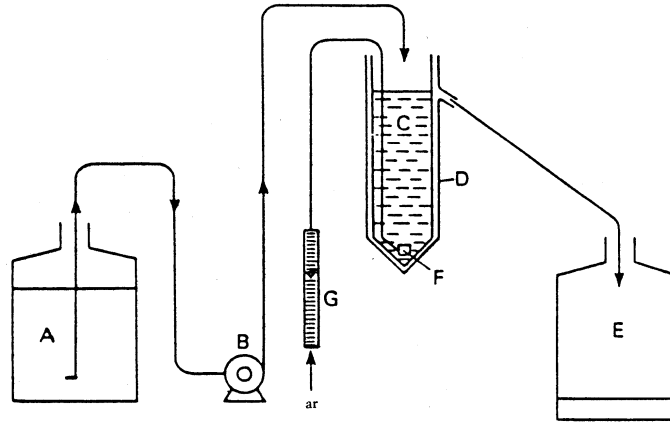


- | | |
|--|--|
| A = recipiente de armazenagem; | E = bomba de ar comprimido; |
| B = bomba de doseamento; | F = recipiente coletor; |
| C = recipiente de arejamento (capacidade 3 l); | G = arejador; |
| D = decantador; | H = medidor de caudal de ar (facultativo). |

Apêndice 2

Figura 1

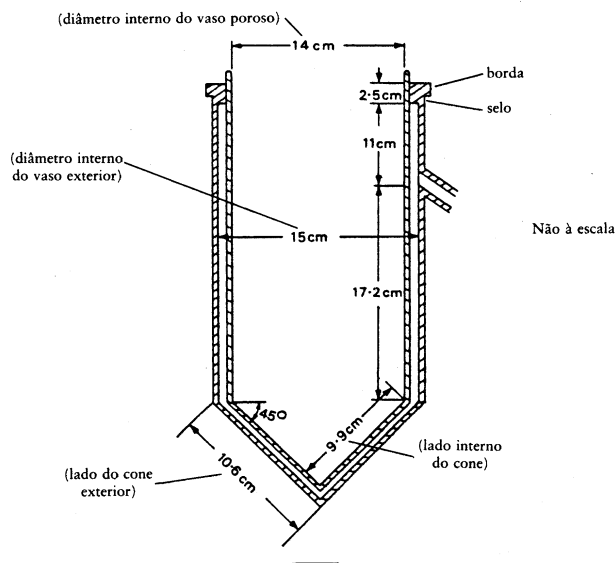
Equipamento utilizado na avaliação da biodegradação



- A = recipiente de armazenagem; E = colector do efluente;
 B = bomba de doseamento; F = arejador por difusão;
 C = recipiente de arejamento poroso; G = medidor de rotações (facultativo).
 D = recipiente estanque;

Figura 2

Pormento do vaso poroso de arejamento de três litros



Apêndice 3

Condições de funcionamento do ensaio de simulação das lamas activadas

Verificar em cada grupo

Equipamento

Confirmação OCDE
Vaso poroso

Modo de funcionamento

Unidade simples
Unidades interligadas
Unidades não interligadas

Transinoculação

Inexistente
Lamas activadas
Sobrenadante

Tempo médio de retenção

três horas
seis horas

Elemento nutritivo de base

Águas residuais domésticas
Águas residuais sintéticas

Inóculo

Efluente secundário
Compósito
Lamas activadas

Adição da substância a ensaiar

Desde o início
Aumento progressivo
Após formação das lamas

Análise

Específica
CQO
COD

C. 11 BIODEGRADAÇÃO

LAMAS ACTIVADAS: ENSAIO DE INIBIÇÃO DA RESPIRAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O método descrito avalia o efeito da substância de ensaio sobre os microrganismos medindo a taxa respiratória em condições determinadas, na presença de diferentes concentrações da substância de ensaio.

O objectivo do presente método é fornecer um processo de selecção rápido que permita identificar as substâncias de ensaio que podem afectar negativamente o funcionamento das estações de tratamento microbiano aeróbio e indicar as concentrações adequadas não inibidoras das substâncias de ensaio a utilizar nas experiências de biodegradação.

Um ensaio (preliminar) pode preceder o ensaio final, o qual fornecerá informações relativas à gama de concentrações a utilizar no ensaio principal.

Além dos ensaios com a substância a estudar, incluem-se no protocolo experimental dois controlos, um no início e outro no final da série de experiências. Cada lote de lammas activadas deve igualmente ser testado utilizando uma substância de referência.

O presente método aplica-se sobretudo a substâncias que, em virtude da sua solubilidade na água e fraca volatilidade são susceptíveis de permanecer na água. Para as substâncias cuja solubilidade no meio do ensaio é limitada, pode não ser possível determinar a CE₅₀.

Os resultados baseados no consumo de oxigénio podem conduzir a conclusões erróneas quando a substância de ensaio tem tendência a romper a fosforilação oxidativa.

Para efectuar o ensaio, é útil dispôr das seguintes informações:

- solubilidade na água,
- pressão de vapor,
- fórmula de estrutura,
- pureza da substância de ensaio.

Recomendação:

As lammas activadas podem conter organismos potencialmente patogénicos e devem ser manipuladas com prudência.

1.2. Definições e unidades

A taxa respiratória é o consumo de oxigénio dos microrganismos aeróbios contidos nas lammas das águas residuais, expresso geralmente em mg O₂ por mg de lammas por hora.

Para calcular o efeito inibidor de uma substância de ensaio numa dada concentração; exprime-se a taxa respiratória sob a forma de percentagem da média:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{percentagem de inibição}$$

em que:

R_s = taxa de consumo de oxigénio da substância de ensaio a uma dada concentração,

R_{c1} = taxa de consumo de oxigénio do controlo 1,

R_{c2} = taxa de consumo de oxigénio do controlo 2.

Neste método, a CE₅₀ é a concentração da substância de ensaio para a qual a taxa respiratória é 50 % da verificada no controlo, nas condições descritas neste método.

1.3. Substâncias de referência

Recomenda-se a utilização como substância de referência do 3,5-diclorofenol, um conhecido inibidor da respiração e para cada lote de lamas activadas, determina-se a CE_{50} dessa substância a fim de avaliar se a sensibilidade das lamas não é anormal.

1.4. Princípio do método de ensaio

Mede-se a taxa respiratória das lamas activadas alimentadas com uma quantidade padrão de águas residuais sintéticas após um tempo de contacto de 30 minutos ou de três horas, ou de ambos. Por outro lado, mede-se igualmente a taxa respiratória das mesmas lamas activadas em presença de diversas concentrações da substância de ensaio em condições idênticas. O efeito inibidor da substância de ensaio a uma determinada concentração é expresso como uma percentagem do valor médio das taxas respiratórias dos dois controlos. Calcula-se um valor de CE_{50} a partir das determinações feitas a diferentes concentrações.

1.5. Critérios de qualidade

Os resultados do ensaio são válidos se:

- as taxas respiratórias dos dois controlos não diferirem entre si mais de 15%,
- a CE_{50} (30 minutos e/ou três horas) do 3,5-diclorofenol se situa num intervalo aceitável de 5 a 30 mg/l.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. Reagentes

1.6.1.1. Soluções da substância de ensaio

Preparam-se soluções frescas da substância de ensaio no início deste a partir de uma solução-mãe. É adequada uma solução-mãe com a concentração de 0,5 g/l quando se utiliza a metodologia a seguir indicada.

1.6.1.2. Solução da substância de controlo

Pode-se preparar, por exemplo, uma solução de 3,5-diclorofenol dissolvendo 0,5 g de 3,5 — diclorofenol em 10 ml de 1M NaOH, diluindo depois em água destilada até perfazer aproximadamente 30 ml e adicionando, ao mesmo tempo que se agita, 0,5 M H_2SO_4 até ao início da precipitação — são necessários aproximadamente 8 ml de 0,5 M H_2SO_4 — e por fim, dilui-se a mistura com água destilada até perfazer 1 litro. O pH deverá então estar compreendido entre 7 e 8.

1.6.1.3. Águas residuais sintéticas

Prepara-se uma alimentação de águas residuais sintéticas dissolvendo as seguintes quantidades de substâncias num litro de água:

- 16 g de peptona,
- 11 g de extracto de carne,
- 3 g de ureia,
- 0,7 g de NaCl,
- 0,4 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 2,8 g de K_2HPO_4 .

Nota 1: Esta água residual sintética é 100 vezes mais concentrada do que a descrita no relatório técnico da OCDE «Método proposto para a determinação da biodegradação dos agentes tensio-activos utilizados nos detergentes sintéticos», de 11 de Junho de 1976 com a adição de, hidrogenofosfato de dipotássio.

Nota 2: Se o meio que se preparou não for utilizado imediatamente, deve ser guardado em condições de obscuridade, à temperatura de 0 a 4 °C, por um período máximo de uma semana, em condições em que não se verifique qualquer alteração da sua composição.

Antes de se proceder ao seu armazenamento, o meio pode igualmente ser esterilizado ou proceder-se à adição da peptona e do extracto de carne um pouco antes de efectuar o ensaio. Antes de utilizar este meio, deve-se misturar completamente e ajustar-se o pH.

1.6.2. Equipamento

Aparelho de medição: não é essencial uma concepção específica do aparelho. Contudo, não deve existir qualquer espaço vazio por cima do líquido e o eléctrodo deve adaptar-se perfeitamente ao gargalo do frasco de medição.

É necessário um equipamento normal de laboratório e, especialmente os seguintes instrumentos:

- aparelho de medição,
- dispositivo de arejamento,
- eléctrodo e aparelho de medição do pH,
- eléctrodo de oxigénio.

1.6.3. *Preparação do inóculo*

Como inóculo microbiano para o ensaio, utilizam-se lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais que trate predominantemente águas residuais domésticas.

Se necessário, no laboratório, as partículas grosseiras podem ser removidas por sedimentação durante um curto período de tempo, por exemplo de 15 minutos, e decantando posteriormente o sobrenadante, contendo os sólidos mais finos, para ser utilizado no ensaio. Alternativamente, podem-se misturar as lamas durante alguns segundos recorrendo a um misturador.

Além disso, se se suspeitar que se encontram presentes substâncias inibidoras, as lamas devem ser lavadas com água da torneira ou com uma solução isotónica. Após centrifugação, o sobrenadante é decantado (repete-se este processo três vezes).

Pesa-se e seca-se uma pequena quantidade de lamas. A partir deste resultado, pode-se calcular a quantidade de lamas húmidas que devem ser dispersas em água de modo a obter lamas activadas com uma concentração de sólidos suspensos no licor misto entre 2 e 4 g/l. Este valor conduz a uma concentração no meio de 0,8 a 1,6 g/l se se seguir a metodologia abaixo recomendada.

Se as lamas não puderem ser utilizadas no próprio dia da sua colheita, adicionam-se 50 ml de águas residuais sintéticas a cada litro de lamas activadas preparadas da forma acima descrita e arejam-se durante a noite à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Conservam-se arejadas para serem utilizadas durante o dia. Antes da sua utilização, verifica-se o pH e, se necessário, ajusta-se a pH 6,0 a 8,0: Os sólidos suspensos no licor misto devem ser determinados tal como foi descrito no parágrafo anterior.

Se for necessário utilizar o mesmo lote de lamas durante vários dias consecutivos (quatro dias no máximo) adiciona-se uma outra dose de 50 ml de água residual sintética por litro de lamas no final de cada dia de trabalho.

1.6.4. *Execução do ensaio*

Duração/tempo de contacto	30 minutos e/ou três horas, durante as quais o meio de ensaio é arejado
Água	água de beber (desclorada, se necessário)
Fornecimento de ar	ar limpo, sem óleo. Caudal de ar de 0,5 a 1 l/minuto
Aparelho de medição	frasco de fundo plano tal como o destinado à medição da DBO
Medidor de oxigénio	eléctrodo de oxigénio adequado com um registador.
Solução nutritiva	águas residuais sintéticas (ver acima)
Substância de ensaio	a solução de ensaio fresca é preparada no início do ensaio
Substância de referência	por exemplo, 3,5 diclorofenol (em pelo menos três concentrações)
Controlos:	amostra inoculada, sem substância de ensaio.
Temperatura:	$20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Sugere-se seguidamente um método experimental que pode ser aplicado tanto à substância de ensaio como à substância de referência para um tempo de contacto de três horas.

Utilizam-se vários recipientes (por exemplo, provetas de um litro).

Devem-se utilizar pelo menos cinco concentrações, espaçadas entre si por um factor constante que, de preferência, não deve ultrapassar 3,2.

No instante «O», a 16 ml de água residual sintética adiciona-se água até prefazer 300 ml. Juntam-se 200 ml de inóculo microbiano e deita-se a mistura (500 ml) para um primeiro recipiente (primeiro controlo C_1).

Os recipientes de ensaio devem ser continuamente arejados de modo a garantir que o O_2 dissolvido não desça abaixo de 2,5 mg/l e que imediatamente antes da medição da taxa respiratória, a concentração de O_2 seja de cerca de 6,5 mg/l.

Ao fim de 15 minutos (15 minutos é um intervalo arbitrário, mas conveniente), repete-se o procedimento anterior com a excepção de que se adicionam 100 ml da solução de reserva da substância de ensaio a 16 ml de água residual sintética, antes de proceder à adição de água até perfazer 300 ml e do inóculo microbiano até aos 500 ml. Esta mistura é em seguida deitada para um segundo recipiente e arejada tal como anteriormente. Repete-se este procedimento de quinze em quinze minutos com diferentes volumes da solução-mãe da substância de ensaio a fim de obter uma série de recipientes com diferentes concentrações da substância de ensaio. Por fim, prepara-se um segundo controlo (C_2).

Ao fim de três horas regista-se o pH, deita-se uma amostra bem misturada do conteúdo do primeiro recipiente no aparelho de medição e mede-se a taxa respiratória durante um período máximo de 10 minutos.

Repete-se esta determinação com o conteúdo de cada recipiente a intervalos de quinze minutos de modo a que o tempo de contacto em cada recipiente seja de três horas.

A substância de referência é ensaiada de modo idêntico com cada lote de inóculo microbiano.

Será necessário um processo diferente (por exemplo, mais do que um aparelho de medição de oxigénio) quando se efectuarem as medições após 30 minutos de contacto.

Se for necessário determinar o consumo de oxigénio, preparam-se recipientes suplementares contendo a substância de ensaio, água residual sintética e água, mas sem lamas activadas.

O consumo de oxigénio é medido e registado após um tempo de arejamento de 30 minutos e/ou três horas (tempo de contacto).

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

A taxa respiratória calcula-se a partir do traçado do registador para as medições compreendidas aproximadamente entre 6,5 mg de O₂/l e 2,5 mg de O₂/l ou durante um período de dez minutos quando a taxa respiratória é baixa. A parte da curva respiratória sobre a qual se mede a taxa respiratória deve ser linear.

Se as taxas respiratórias dos dois controlos diferirem entre si de mais de 15 % ou se a CE₅₀ (30 minutos e/ou três h) da substância de referência não se encontrar no intervalo aceitável (5 a 30 mg/l para o 3,5 — diclorofenol), o ensaio não é válido e deve ser repetido.

Calcula-se a percentagem de inibição para cada concentração de ensaio (ver 1.2). Representa-se graficamente em papel log-normal (ou log-probabilidade), a percentagem de inibição em função da concentração e deduz-se o valor de CE₅₀.

Podem ser determinados os intervalos de confiança a 95 % para os valores de CE₅₀ segundo os métodos normalmente utilizados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, se possível, as seguintes informações:

- Substância de ensaio: dados de identificação química.
- Sistema de ensaio: origem, concentração e eventual tratamento prévio das lamas activadas.
- Condições de ensaio:
 - pH da mistura de reacção antes da medição da respiração,
 - temperatura de ensaio,
 - duração do ensaio,
 - substância de referência e respectiva CE₅₀,
 - consumo abiótico de oxigénio (se se verificar).
- Resultados:
 - todos os dados determinados,
 - curva de inibição e método de cálculo da CE₅₀,
 - CE₅₀ e, se possível, intervalos de confiança a 95 %, CE₂₀ e CE₈₀,
 - todas as observações e quaisquer desvios em relação ao presente método de ensaio que poderiam ter influenciado os resultados.

3.2. Interpretação dos resultados

O valor da CE₅₀ deve ser apenas considerado como uma indicação da toxicidade provável da substância de ensaio quer para o tratamento das águas residuais por lamas activadas quer para os microrganismos das águas residuais, uma vez que as complexas interações que se verificam no ambiente não podem ser simuladas com precisão num ensaio de laboratório. Além disso, as substâncias de ensaio que podem ter um efeito inibidor na oxidação do amoníaco podem também produzir curvas de inibição atípicas. Por conseguinte, tais curvas devem ser cuidadosamente interpretadas.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) International Standard ISO 8192 — 1986
 - (2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.
 - (3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.
 - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) *Recommended Method n° 103*, also described by:
 - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.
 - (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.
 - (7) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decisão C(81) 30 final do Conselho.
-

C. 12

BIODEGRADAÇÃO

ENSAIO L.A.S.C. MODIFICADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo de método é avaliar a biodegradação final potencial de substâncias orgânicas solúveis em água e não voláteis quando expostas a concentrações relativamente elevadas de microrganismos durante um longo período de tempo. Durante este período, a viabilidade dos microrganismos é mantida através da adição diária de uma alimentação de águas residuais decantadas. (Para conservação das águas residuais durante o fim de semana as mesmas poderão ser guardadas a 4 °C. Podem-se utilizar alternativamente as águas residuais sintéticas do ensaio de confirmação da OCDE.)

Pode verificar-se uma adsorção físico-química aos sólidos suspensos, o que deve ser tomado em consideração na interpretação dos resultados (ver 3.2).

Devido ao extenso período de retenção da fase líquida (36 horas) e à adição intermitente de nutrientes, o ensaio não simula as condições que ocorrem numa estação de tratamento de águas residuais. Os resultados obtidos com várias substâncias de ensaio indicam que o ensaio apresenta um elevado potencial de biodegradação.

As condições do ensaio são altamente favoráveis à selecção e/ou adaptação de microrganismos capazes de degradar o composto ensaiado. (O procedimento pode igualmente ser utilizado na produção de inóculos adaptados para utilização em outros ensaios).

No presente método, utiliza-se a medida da concentração de carbono orgânico dissolvido na avaliação da biodegradação final das substâncias de ensaio. É preferível determinar o COD após acidificação e purificação do que através da diferença de $C_{\text{total}} - C_{\text{inorgânico}}$.

A utilização simultânea de um método analítico específico pode permitir a avaliação da degradação primária da substância (desaparecimento da estrutura química original).

O método apenas se aplica às substâncias orgânicas de ensaio que, nas concentrações utilizadas no ensaio:

- são solúveis em água (pelo menos 20 mg de carbono orgânico dissolvido/l),
- possuem uma pressão de vapor negligível,
- não adsorvem significativamente no sistema de ensaio,
- não se perdem na solução de ensaio devido a formação de espuma,
- não exercem efeitos inibidores sobre as bactérias.

Deve ser determinado o teor em carbono orgânico da substância de ensaio.

As informações respeitantes às proporções relativas dos componentes principais das substâncias de ensaio serão úteis na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que os resultados são baixos ou marginais.

As informações relativas à toxicidade da substância para os microrganismos pode ser útil na interpretação dos resultados baixos e na selecção das concentrações de ensaio adequadas.

1.2. Definições e unidades

C_E = concentração do composto ensaiado em carbono orgânico presente ou adicionado às águas residuais decantadas no início do período de arejamento (mg/l),

C_e = concentração do carbono orgânico dissolvido presente no licor sobrenadante do ensaio no final do período de arejamento (mg/l),

C_c = concentração do carbono orgânico dissolvido presente no licor sobrenadante do controlo no final do período de arejamento (mg/l).

No presente método a biodegradação é definida como o desaparecimento de carbono orgânico. A biodegradação pode ser expressa em:

1. Remoção em percentagem D_{ad} da quantidade de substância adicionada diariamente:

$$D_{ad} = \frac{C_E - (C_e - C_c)}{C_E} \times 100 \quad [1]$$

em que D_{ad} = degradação/adicação diária.

2. A remoção em percentagem D_{sid} da quantidade de substância presente no início de cada dia:

$$D_{sid} = \frac{2C_E + C_{ci} - C_{ci} - 3C_e(i+1) + 3C_c(i+1)}{2C_E + C_{ci} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 (a)]$$

$$= \frac{2C_E - 2C_e(C_e - C_c)}{2C_E + (C_e - C_c)} \times 100 \quad [2 (b)]$$

D_{sid} = degradação/substância no início do dia;

em que os índices i e $(i + 1)$ se referem ao dia da medição. A equação 2(a) é recomendada se o COD do efluente variar de um dia para outro, enquanto a equação 2(b) pode ser utilizada quando o COD do efluente permanece relativamente constante de um dia para o outro.

1.3. Substâncias de referência

Em alguns casos, quando se investiga uma nova substância, podem ser úteis substâncias de referência; contudo, não se recomenda aqui qualquer substância de referência específica.

Fornecem-se dados relativos a diversos compostos avaliados em ensaios de intercalibração (ver Apêndice I) de modo a que se possa fazer a calibração do método de tempos a tempos e a permitir a comparação dos resultados quando se utiliza outro método.

1.4. Princípio do método de ensaio

Numa unidade de lamas activadas semi-contínua (LASC), colocam-se lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais. Adicionam-se o composto a ensaiar e as águas residuais domésticas decantadas e a mistura é arejada durante 23 horas. Pára-se depois do arejamento, permitindo a sedimentação das lamas e retira-se o licor sobrenadante.

As lamas que permanecem no tanque de arejamento são então misturadas com outra alíquota do composto de ensaio e águas residuais e repete-se o processo.

Avalia-se a biodegradação através da determinação do teor em carbono orgânico dissolvido no licor sobrenadante. Compara-se este valor com o que se obtém para o licor proveniente de um tubo de controlo contendo apenas águas residuais decantadas.

Quando se utiliza um método analítico específico, podem medir-se alterações na concentração da molécula original devido a biodegradação (Biodegradação primária).

1.5. Critérios de qualidade

A reprodutibilidade do presente método baseado na remoção do carbono orgânico dissolvido ainda não foi estabelecida. (Quando se considera a biodegradação primária, obtêm-se dados muito precisos para substâncias que são consideravelmente degradadas).

A sensibilidade do método é determinada em larga medida pela variabilidade do ensaio em branco e em menor extensão, pela precisão da determinação do carbono orgânico dissolvido e teor do composto de ensaio no licor, no início de cada ciclo.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. Preparações

Ligam-se um número suficiente de unidades de arejamento limpas (pode-se utilizar alternativamente a unidade de ensaio de 1,51 de LASC inicial) e tubos para entrada do ar (figura 1) para cada substância de ensaio e controlo. O ar comprimido fornecido às unidades de ensaio, limpo através de um filtro de algodão, deve ser isento de carbono orgânico e pré-saturado com água de modo a reduzir as perdas por evaporação.

De uma estação de lamas activadas que trate predominantemente águas residuais domésticas, retira-se uma amostra de licor misto contendo 1 a 4 g de sólidos suspensos/l. São necessários por cada unidade de arejamento cerca de 150 ml de licor misto.

Preparam-se soluções de reserva da substância de ensaio em água destilada; a concentração normalmente exigida é de 400 mg/l como carbono orgânico o que dá uma concentração no composto de ensaio de 20 mg/l de carbono no início de cada ciclo de arejamento se não se verificar biodegradação.

É possível utilizar concentrações mais elevadas se a toxicidade em relação aos microrganismos o permitir.

Mede-se o teor em carbono orgânico nas soluções de reserva.

1.6.2. *Condições de ensaio*

O ensaio deve efectuar-se a 20 a 25 °C.

Utiliza-se uma concentração elevada de microrganismos aeróbios (de 1 a 4 g/l de sólidos suspensos) e o período de retenção efectiva é de 36 horas. As substâncias carbonadas presentes nas águas residuais de alimentação, são largamente oxidadas, em geral no espaço de oito horas após o início de cada ciclo de arejamento. Em seguida, verifica-se uma respiração endógena das lamas durante o restante período de arejamento, no decurso do qual o único substrato disponível é o composto de ensaio a não ser que este seja também rapidamente metabolizado. Estas características associadas a uma reinoculação diária do ensaio quando são utilizadas como meio águas residuais domésticas fornecem condições altamente favoráveis tanto para a adaptação como para elevados graus de biodegradação.

1.6.3. *Execução do ensaio*

Retira-se uma amostra de licor misto de uma unidade laboratorial ou estação de lamas activadas predominantemente doméstica e conserva-se em condições aeróbias até ser utilizada no laboratório. Cada uma das unidades de arejamento e de controlo são cheios com 150 ml de licor misto (se se utilizar a unidade de ensaio LASC, multiplicar por 10 os volumes dados) e dá-se início ao arejamento. Após 23 horas, interrompe-se o arejamento e deixam-se sedimentar as lamas durante 45 minutos. Abrem-se sucessivamente as torneiras de cada um dos recipientes e rejeitam-se fracções de 100 ml do licor sobrenadante. Recolhe-se uma amostra de águas residuais domésticas decantadas imediatamente antes da utilização e adicionam-se 100 ml às lamas remanescentes em cada unidade de arejamento. Recomeça-se de novo o arejamento. Nesta fase, não se adicionam quaisquer substâncias de ensaio e as unidades são diariamente alimentadas com águas residuais domésticas apenas até ao momento em que se obtém na decantação um licor sobrenadante límpido. Este processo demora geralmente duas semanas, no fim das quais o carbono orgânico dissolvido no licor sobrenadante no final de cada ciclo de arejamento se aproxima de um valor constante.

No final deste período, misturam-se as lamas decantadas separadamente e adicionam-se a cada unidade 50 ml das lamas compostas resultantes.

Adicionam-se às unidades de controlo 95 ml de águas residuais decantadas mais 5 ml de água e às unidades de ensaio 95 ml mais 5 ml da solução adequada de reserva do composto de ensaio (400 mg/l). Recomeça-se de novo o arejamento que prossegue durante 23 horas. Deixam-se então sedimentar as lamas durante 45 minutos e o sobrenadante é retirado e analisado o seu teor em carbono orgânico dissolvido.

Este processo de enchimento e esvaziamento é repetido diariamente ao longo do ensaio.

Antes da sedimentação pode ser necessário limpar as paredes das unidades de modo a evitar a acumulação de sólidos acima do nível do líquido. Para evitar uma contaminação cruzada, utilizam-se raspadores ou escovas individuais para cada unidade.

O ideal seria determinar diariamente o carbono orgânico dissolvidos nos licores sobrenadantes, embora sejam admissíveis análises menos frequentes. Antes da análise, os licores são filtrados através de filtros limpos de membrana de 0,45 mm ou centrifugados. Os filtros de membrana são adequados se se garantir que nem libertam carbono nem absorvem a substância durante o processo de filtração. A temperatura da amostra não deve exceder 40 °C quando se encontra na centrífuga.

A duração do ensaio para compostos que apresentam uma biodegradação fraca ou nula é indeterminada, mas a experiência sugere que deve ser, em geral, de pelo menos 12 semanas, mas nunca mais de 26 semanas.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

Representam-se graficamente, em função do tempo, os valores de carbono orgânico dissolvido nos licores sobrenadantes das unidades de ensaio e das unidades de controlo.

À medida que ocorre a biodegradação, o nível obtido no ensaio aproxima-se do obtido no controlo. Quando se verificar que a diferença entre os dois níveis é constante ao longo de três medições consecutivas, efectua-se o número de medições posteriores que seja necessário para permitir o tratamento estatístico dos dados e calcula-se a percentagem de biodegradação do composto de ensaio (D_{ad} , D_{sid} , ver 1.2).

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

- todas as informações relativas à natureza das águas residuais, tipo de unidade utilizada e resultados experimentais respeitantes à substância ensaiada, substância de referência se utilizada e ensaio em branco,
- a temperatura,
- a curva de remoção com a descrição e processo de cálculo (ver 1.2),
- data e local onde foram recolhidas as lamas activadas e as águas residuais, estado de adaptação, concentração, etc.,
- razões científicas de quaisquer alterações da metodologia,
- assinatura e data.

3.2. Interpretação dos resultados

Uma vez que a substância a ser ensaiada através do presente método não será imediatamente biodegradável, qualquer remoção do COD devido apenas à biodegradação será normalmente gradual ao longo de vários dias ou semanas, excepto nos casos em que a adaptação é repentina, tal como é indicado por uma remoção abrupta que ocorra após algumas semanas.

Todavia, a adsorção físico-química pode, por vezes, desempenhar um papel importante; isto verifica-se quando há uma remoção total ou parcial do COD adicionado no início. O que acontece posteriormente depende de factores tais como os graus de adsorção e a concentração dos sólidos em suspensão no efluente rejeitado. Em geral, a diferença entre a concentração de COD nos licores sobrenadantes do controlo e do ensaio aumenta gradualmente a partir de um valor inicial baixo e esta diferença mantém-se então ao nível do novo valor durante o resto da experiência, a menos que tenha lugar a adaptação.

Se for necessário estabelecer uma distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção, são necessários outros ensaios. Esta distinção pode ser obtida de diferentes modos mas o mais convincente é utilizar como inóculo o licor sobrenadante, ou as lamas, num método de base (de preferência um ensaio respirométrico).

As substâncias de ensaio que no presente ensaio apresentam remoções elevadas de COD não devidas a adsorção, devem ser consideradas como potencialmente biodegradáveis.

Uma remoção parcial não devida a adsorção indica que a substância é sujeita pelo menos a alguma biodegradação. Uma remoção baixa ou nula de COD pode ser devida a inibição dos microrganismos pela substância de ensaio e isto pode também ser demonstrado pela lise e perda de lamas, dando origem a sobrenadantes turvos. O ensaio deve ser repetido, utilizando uma concentração mais baixa de substância de ensaio.

A utilização de um método analítico específico ou da substância de ensaio marcada com ^{14}C pode permitir uma maior sensibilidade. No caso do composto de ensaio marcado com ^{14}C , a recuperação de $^{14}\text{CO}_2$ confirmará que se verificou biodegradação.

Quando os resultados se expressam também em termos de biodegradação primária, deve ser fornecida, se possível, uma explicação relativa à alteração de estrutura química que conduz à perda de resposta da substância de ensaio original.

A validação do método analítico deve ser fornecida conjuntamente com a resposta obtida no ensaio em branco.

4. REFERÊNCIAS

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decisão C(81) 30 final do Conselho.

Apêndice 1

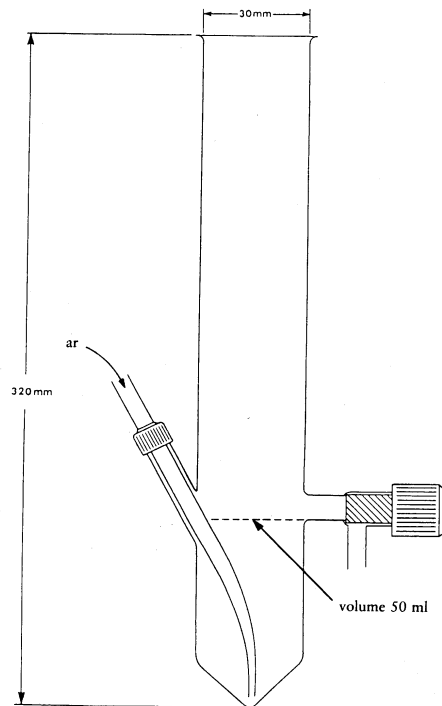
Ensaio L.A.S.C.: EXEMPLOS DE RESULTADOS

Substâncias	C_p (mg/l)	$C_p - C_c$ (mg/l)	Porcentagem de biodegradação D_{ad}	Duração de ensaio (dias)
Sulfonato de 4-acetilaminobenzeno	17,2	2,0	85	40
Sulfonato de tetrapropilbenzeno	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenoglicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetracarboxilato de ciclopentano	17,9	3,2	81,1	120

Apêndice 2

Exemplo de equipamento

Figura 1



C.13 BIOCONCENTRAÇÃO: ENSAIO DINÂMICO COM PEIXES

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 305 (1996).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método descreve um processo para a caracterização da bioconcentração potencial de determinadas substâncias em peixes, em condições dinâmicas. Embora seja largamente preferível o recurso a regimes dinâmicos, podem também utilizar-se regimes semi-estáticos, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade.

O método fornece informações suficientes para a realização do ensaio, permitindo todavia, em larga medida, a adaptação das condições experimentais ao perfil dos laboratórios e às características das substâncias em estudo. O método destina-se particularmente a substâncias orgânicas estáveis com $\log P_{ow}$ compreendido entre 1,5 e 6,0 (1), podendo, no entanto, aplicar-se também a substâncias superlipófilas ($\log P_{ow} > 6,0$). A estimativa preliminar do factor de bioconcentração (BCF) das referidas substâncias superlipófilas, por vezes designado K_B , é, em geral, superior ao factor de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}) obtido por via experimental. A equação de Bintein *et al.* (2) permite obter uma estimativa preliminar do factor de bioconcentração de substâncias orgânicas com P_{ow} da ordem de 9,0. Os parâmetros que caracterizam o potencial de bioconcentração incluem a constante de velocidade de fixação (k_1), a constante de velocidade de depuração (k_2) e o factor BCF_{SS} .

A utilização de marcadores radioactivos poderá facilitar a análise de amostras de água e de peixes, bem como a determinação da necessidade de identificar e quantificar os produtos de degradação. Caso se determinem os resíduos radioactivos totais (nomeadamente por combustão ou solubilização de tecidos), o factor BCF é calculado com base na substância de origem, nos metabolitos fixados e no carbono assimilado, não sendo, por tal facto, directamente comparável ao factor decorrente da análise química específica da substância de origem.

Nos ensaios com radiomarcadores podem utilizar-se métodos de depuração, determinando o factor BCF com base da substância de origem e procedendo, se necessário, à caracterização dos metabolitos. É também possível combinar um estudo de metabolismo dos peixes com um estudo de bioconcentração, mediante a análise e identificação dos resíduos em tecidos.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A **bioconcentração/bioacumulação** consiste no aumento da concentração da substância em estudo num determinado organismo ou em determinados tecidos do mesmo, relativamente à respectiva concentração no meio circundante.

O **factor de bioconcentração** (BCF ou K_B) em qualquer momento da fase de fixação do ensaio de acumulação consiste no quociente entre a concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos (C_f expressa em $\mu\text{g/g}$ (ppm)) e a respectiva concentração no meio circundante (C_w , expressa em $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

O **factor de bioconcentração num estado estacionário** (BCF_{SS} ou K_B) não sofre uma alteração significativa num período longo, uma vez que a concentração da substância em estudo no meio circundante é constante no período em causa.

Um **estado estacionário** é atingido sempre que a representação gráfica da concentração da substância em estudo nos peixes (C_f) em função do tempo consista numa linha paralela ao eixo dos tempos e três determinações sucessivas de C_f em amostras recolhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias, apresentem valores que não difiram em mais de 20%, na ausência de diferenças significativas entre os três períodos de amostragem. No caso das amostras combinadas, são necessárias, pelo menos, quatro determinações. No caso de substâncias recolhidas de forma lenta, o intervalo mais adequado é de sete dias.

O **factor de bioconcentração** calculado directamente a partir das constantes cinéticas (k_1/k_2) constitui o factor de concentração cinética, BCF_K .

O **coeficiente de partição octanol-água** (P_{ow}), também designado K_{ow} , consiste no quociente entre a solubilidade de uma substância em n-octanol e em água, em condições de equilíbrio (método A.8). O logaritmo de P_{ow} é utilizado como indicador de potencial químico de bioconcentração em organismos aquáticos.

A **fase de exposição ou de fixação** consiste no tempo de exposição dos peixes à substância em estudo.

A **constante de velocidade de fixação** (k_1) consiste no valor numérico que define a taxa de aumento da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, sempre que se encontrem expostos à substância em causa (a constante k_1 é expressa em dias⁻¹).

A **fase de pós-exposição ou de depuração** consiste no período durante o qual se estuda a depuração da substância pelos peixes ou por tecidos específicos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha.

A **constante de velocidade de depuração** (k_2) é o valor numérico que define a velocidade de redução da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha (a constante k_2 é expressa em dias⁻¹).

1.3. PRINCÍPIO DE MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio é constituído por duas fases, designadamente a fase de exposição (fixação) e a fase de pós-exposição (depuração). Durante a fase de fixação, diversos grupos de peixes de uma determinada espécie são expostos a, pelo menos, duas concentrações da substância em estudo. Seguidamente, os animais são transferidos para um meio isento da referida substância, onde decorre a fase de depuração. Esta última é sempre necessária, excepto no caso de a quantidade de substância absorvida na fase de fixação ser desprezável ($BCF < 10$). A concentração da substância em estudo no peixe ou em determinados tecidos do mesmo é acompanhada em ambas as fases do ensaio. Além dos grupos expostos às duas concentrações de ensaio, submete-se um grupo de peixes a condições idênticas, excepto no que respeita à substância em estudo, que é omitida, de modo a estabelecer uma correlação entre os eventuais efeitos negativos observados no ensaio de bioconcentração com um grupo de controlo de referência e a obter as concentrações de fundo da substância em estudo.

A fase de fixação deverá durar 28 dias, excepto se o equilíbrio for atingido antes. A equação que se apresenta no anexo III permite prever a duração da fase de fixação, bem como o surgimento da fase estacionária. O período de depuração inicia-se com a transferência dos peixes para um meio idêntico que não contenha a substância em estudo, num recipiente limpo. Sempre que possível, deve calcular-se o factor de bioconcentração na forma de quociente (BCF_{SS}) das concentrações nos peixes (C_f) e na água (C_w), num estado estacionário aparente, e também o factor de bioconcentração cinético (BCF_K), que consiste no quociente entre as constantes de velocidade de fixação (k_1) e de depuração (k_2), assumindo um processo cinético de primeira ordem. Caso o processo não apresente uma cinética de primeira ordem, devem aplicar-se modelos mais complexos (ver anexo V).

Caso não se atinja o estado estacionário em 28 dias, a fase de fixação deve ser prolongada, até um máximo de 60 dias, iniciando-se então a fase de depuração.

A constante de velocidade de fixação, a constante de velocidade de depuração, as constantes decorrentes da aplicação de modelos mais complexos, o factor de bioconcentração e, sempre que possível, os intervalos de confiança de cada parâmetro, devem ser calculados com base no modelo mais adequado à descrição das concentrações da substância em estudo nos peixes e na água.

O factor BCF é expresso em função da massa húmida total dos peixes. Todavia, podem utilizar-se, para fins específicos, determinados tecidos ou órgãos (por exemplo, tecido muscular ou fígado), caso as dimensões dos animais o permitam, podendo também dividir-se os peixes em porções comestíveis e não-comestíveis (vísceras). Uma vez que, no que respeita a muitas substâncias orgânicas, existe uma nítida relação entre o potencial de bioconcentração e a lipofilia, existe também uma relação entre o teor de lípidos dos peixes em estudo e a bioconcentração das substâncias em causa. De modo a reduzir a variabilidade dos resultados, no que respeita às substâncias com elevada lipofilia ($\log P_{ow} > 3$), a bioconcentração deve ser expressa em função do teor de lípidos, bem como da massa corpórea total.

Sempre que tal seja viável, deve determinar-se o teor de lípidos do material biológico utilizado para determinar a concentração da substância em estudo.

1.4. INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Antes de realizar o ensaio de bioconcentração, devem possuir-se as seguintes informações relativas à substância em estudo:

- a) solubilidade em água;
- b) coeficiente de partição octanol-água, P_{ow} (também designado K_{ow}), determinado por HPLC de acordo com método A.8;
- c) hidrólise;
- d) fotosensibilidade em água, determinada por irradiação solar natural ou simulada, bem como nas condições de irradiação do ensaio de bioconcentração (3);
- e) tensão superficial (no caso de substâncias cujo $\log P_{ow}$ não possa ser determinado);
- f) pressão de vapor;
- g) biodegradabilidade natural (se adequado).

A toxicidade para a espécie utilizada no ensaio constitui outra das informações necessárias, devendo conferir-se especial atenção à toxicidade assintótica (isto é, independente do tempo), LC_{50} . Para a quantificação da substância em estudo nas soluções, bem como no material biológico, deve utilizar-se um método analítico adequado, de exactidão, precisão e sensibilidade conhecidas, devendo possuir-se informações pormenorizadas sobre a preparação e armazenagem da amostra. Deve também conhecer-se o limite de detecção da substância em estudo na água e nos tecidos dos peixes. Caso se utilize uma substância marcada com ^{14}C , é necessário conhecer a percentagem de radioactividade associada às impurezas.

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Para que o ensaio seja válido, devem satisfazer-se as seguintes condições:

- as variações de temperatura devem ser inferiores a $\pm 2^{\circ}C$;
- a concentração de oxigénio dissolvido não deve ser inferior a 60% da concentração de saturação;
- a variação da concentração da substância em estudo nas células não deve exceder $\pm 20\%$ da média dos valores determinados na fase de fixação;
- a mortalidade ou quaisquer outros efeitos nocivos registados no final do ensaio, tanto no que respeita ao lote de controlo como ao lote de ensaio, deve ser inferior a 10%; caso o ensaio se prolongue por várias semanas ou meses, os referidos factores não devem exceder 5% por mês e 30% na totalidade.

1.6. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A utilização de substâncias de referência de potencial de bioconcentração conhecido apresenta utilidade na comprovação do procedimento experimental, sempre que necessário. Todavia, não se afigura ainda possível recomendar substâncias específicas.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1. Equipamento

No que respeita ao equipamento, deve evitar-se a utilização de materiais que apresentem riscos de dissolução, absorção ou lixiviação, ou possam apresentar efeitos nocivos nos animais. Podem utilizar-se tanques em forma de paralelepípedo ou cilindro, de um material quimicamente inerte, com capacidade adequada à população. Deve evitar-se tanto quanto possível o uso de tubos de plástico flexível, recorrendo-se, de preferência, a tubos de teflon (R), aço inoxidável e/ou vidro. A experiência tem demonstrado que, no caso de substâncias com coeficientes de adsorção elevados, nomeadamente os piretróides sintéticos, pode ser necessário utilizar vidro silanizado. Em tais casos, o equipamento deve ser descartado após o uso.

1.7.2. Água

Em princípio, o ensaio deve utilizar água natural proveniente de uma fonte não-contaminada e de qualidade uniforme. A qualidade da água de diluição deve permitir a sobrevivência da espécie durante as fases de aclimação e de ensaio sem que os animais adquiram uma aparência ou um comportamento anormais. Em condições ideais, a espécie em causa deve poder sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se na água de diluição (nomeadamente em cultura laboratorial ou num ensaio de toxicidade em toda a vida). Devem conhecer-se, pelo menos, os seguintes parâmetros: pH, dureza, sólidos totais, carbono orgânico total, bem como, se possível, amónio, nitritos, alcalinidade e, no caso de ensaios com espécies marinhas, salinidade. Os parâmetros que possuem importância para o bem-estar dos animais são bem conhecidos; contudo, o anexo I apresenta as concentrações máximas recomendadas de diversos factores em águas doces e salgadas.

A qualidade da água deve manter-se constante no decurso do ensaio. O pH deve oscilar entre 6,0 e 8,5, embora, no decurso de um determinado ensaio, a respectiva variação não deva exceder $\pm 0,5$. De modo a assegurar que a água de diluição não afecta os resultados (nomeadamente devido à complexação da substância em estudo) ou o comportamento dos animais, devem recolher-se periodicamente amostras da mesma para análise, procedendo-se à determinação dos metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidas (nomeadamente pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão, com uma frequência aproximadamente trimestral, caso a qualidade da água de diluição seja relativamente constante. Se a referida qualidade se revelar constante num período não inferior a um ano, as determinações podem ser menos frequentes, efectuando-se com intervalos alargados (por exemplo, semestrais).

O teor de partículas naturais, bem como de carbono orgânico total, da água de diluição deve ser tão reduzido quanto possível, de modo a evitar a adsorção da substância em estudo pela matéria orgânica, reduzindo a sua biodisponibilidade (4). O valor máximo aceitável é de 5 mg/l, no caso das partículas (matérias secas que não passem através de um filtro de 0,45 μm) e 2 mg/l no caso do carbono orgânico total (ver anexo I). Se necessário, a água deverá ser filtrada antes do uso. A contribuição das excreções dos peixes e dos resíduos alimentares para o teor de carbono orgânico total deve ser tão reduzido tanto quanto possível. No decurso do ensaio, a concentração de carbono orgânico no recipiente não deve exceder a concentração de carbono orgânico proveniente da substância em estudo e do agente de solubilização (se utilizado) em mais de 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3. Soluções de ensaio

Prepara-se uma solução-mãe da substância em estudo, de concentração adequada, de preferência misturando ou agitando a substância com a água de diluição. Não é aconselhável utilizar solventes ou dispersantes (agentes de solubilização), embora, em determinados casos, possa recorrer-se aos mesmos para obter uma concentração adequada. Os solventes que podem ser utilizados são o etanol, o metanol, os éteres mono e dimetilico do etilenoglicol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol. No que respeita aos dispersantes, podem utilizar-se o Cremophor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01% e o HCO-40. Os agentes que apresentem biodegradabilidade natural devem utilizar-se com precaução, uma vez que podem originar problemas de crescimento bacteriano nos ensaios dinâmicos. A substância em estudo pode ser marcada com um radioisótopo, devendo ser de um grau de pureza elevado (de preferência superior a 98%).

Em ensaios dinâmicos, é necessário utilizar um sistema de fornecimento e diluição contínuos da solução-mãe da substância em estudo (por exemplo, bomba com regulação de caudal, diluidor proporcional, sistema de saturação), de modo a alimentar os recipientes de ensaio. De preferência, devem efectuar-se diariamente pelo menos cinco renovações do volume de cada recipiente de ensaio. Em princípio, devem utilizar-se condições dinâmicas; todavia, se tal não se afigurar possível (por exemplo, caso os animais sejam afectados) pode recorrer-se a uma técnica semi-estática, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade. Os caudais da solução-mãe e da água de diluição devem ser verificados 48 horas antes do início do ensaio e com uma frequência pelo menos diária no decurso do mesmo. A referida verificação inclui a determinação do caudal em cada recipiente de ensaio, devendo assegurar-se que o mesmo não regista uma variação superior a 20% num determinado recipiente ou entre dois recipientes.

1.7.4. Selecção das espécies

Os principais critérios de selecção das espécies consistem na sua fácil disponibilidade, nas dimensões adequadas e na facilidade de manutenção no laboratório. Outros critérios incluem o interesse recreativo e comercial e a importância ecológica, bem como a sensibilidade relativa, os antecedentes de utilização, etc.

O anexo II refere as espécies recomendadas. Podem utilizar-se outras espécies, devendo, contudo, adaptar-se os procedimentos de modo a obter condições de ensaio adequadas. Em tais casos, deve apresentar-se o fundamento da selecção da espécie e do método experimental.

1.7.5. **Tratamento dos peixes**

Deve aclimatar-se a população de ensaio durante, pelo menos, duas semanas, à temperatura de ensaio, alimentando-a com uma dieta idêntica à utilizada no decurso do ensaio.

Após um período de adaptação de 48 horas, regista-se a mortalidade, aplicando os seguintes critérios:

- caso a mortalidade exceda 10% da população em sete dias, desprezar a totalidade do lote;
- caso a mortalidade se situe entre 5 e 10% da população em sete dias, aclimatar os peixes por um período de sete dias suplementares;
- caso a mortalidade seja inferior a 5% da população em sete dias, aproveitar o lote; se a mortalidade registada no segundo período de sete dias for superior a 5%, desprezar a totalidade do lote.

Os animais a utilizar nos ensaios não devem apresentar doenças ou perturbações observáveis. Devem rejeitar-se quaisquer animais doentes. Além disso, os peixes não devem ser objecto de tratamento contra eventuais afecções nas duas semanas que precedem o ensaio e durante o mesmo.

1.8. **REALIZAÇÃO DO ENSAIO**

1.8.1. **Ensaio preliminar**

Poderá ser útil efectuar um ensaio preliminar com o objectivo de otimizar as condições do ensaio definitivo no que respeita, nomeadamente, à selecção da concentração da substância em estudo e à duração das fases de fixação e de depuração.

1.8.2. **Condições de exposição**

1.8.2.1. *Duração da fase de fixação*

Pode obter-se uma estimativa da duração da fase de fixação com base na experiência prática (por exemplo, dados decorrentes de um estudo prévio ou dados relativos à acumulação de uma substância afim), bem como em determinadas relações empíricas que utilizam conhecimentos decorrentes da solubilidade da substância em água ou do respectivo coeficiente de partição octanol/água (ver anexo III).

A fase de fixação deve durar, pelo menos, 28 dias, excepto se o equilíbrio for atingido antes. Se o estado estacionário não for atingido em 28 dias, deve prolongar-se a fase de fixação, procedendo a determinações complementares, até um máximo de 60 dias.

1.8.2.2. *Duração da fase de depuração*

Em geral, um período com uma duração da ordem de metade da fase de fixação é suficiente para uma redução adequada (isto é, cerca de 95%) da carga corporal da substância em estudo (ver o anexo III para uma especificação da estimativa). Se o período necessário para a referida redução de 95% exibir uma extensão que o torne impraticável (mais de 56 dias), pode utilizar-se um período mais curto (ou seja, até que a concentração da substância em estudo seja inferior a 10% da concentração do estado estacionário). Todavia, no caso de substâncias com perfis de fixação e de depuração mais complexos que no caso de modelos com uma cinética de primeira ordem, devem adoptar-se períodos de depuração alargados, de modo a determinar a velocidade do processo. O período em causa pode ser definido pelo período em que a concentração da substância em estudo nos peixes permanece superior ao limite de detecção.

1.8.2.3. *Número de animais*

O número de peixes a utilizar por concentração de ensaio deve ser seleccionado de forma a que se disponha de quatro animais por amostragem. Se for exigido um rigor estatístico superior, deve dispor-se de mais peixes por amostragem.

Caso se utilizem peixes adultos, deve especificar-se o respectivo sexo. Caso se utilizem animais de ambos os sexos, as diferenças entre os respectivos teores de lípidos antes do início da exposição não devem ser significativas, podendo ser necessário reunir os machos e as fêmeas.

Em qualquer ensaio, seleccionam-se peixes de massa semelhante, de modo que a massa do mais leve não seja inferior a 2/3 da massa do mais pesado. Os peixes devem ser da mesma coorte (classe etária) e da mesma proveniência. Uma vez que a massa e a idade dos peixes parecem, por vezes, apresentar um efeito significativo nos valores do factor BCF (1), devem registar-se de forma precisa os pormenores em causa. Recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixes, de modo a calcular a massa média.

1.8.2.4. *Introdução dos animais*

Devem utilizar-se rácios elevados água/peixes, de modo a minimizar a redução de C_w determinada pela introdução dos peixes no início do ensaio, bem como do decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido. A taxa de carga deve ser adequada às espécies utilizadas. Recomenda-se, em geral, uma taxa diária de 0,1 a 1,0 g de peixes (massa húmida) por litro de água. Caso a concentração requerida da substância em estudo não registre uma variação superior a $\pm 20\%$ e a quantidade de oxigénio dissolvido não atinja valores inferiores a 60% da concentração de saturação, podem utilizar-se taxas de carga mais elevadas.

Na selecção dos regimes de carga adequados deve ter-se em conta o habitat normal das espécies em causa. Por exemplo, as espécies bentónicas necessitam de aquários com maior área de base que as espécies pelágicas, para o mesmo volume de água.

1.8.2.5. *Alimentação*

Durante os períodos de aclimação e de ensaio, os peixes são alimentados com uma dieta adequada, de teor total de lípidos e de proteínas conhecido, numa quantidade suficiente para mantê-los em condições saudáveis e manter constante a respectiva massa corporal. Os animais são alimentados diariamente, sendo a quantidade de alimentos fornecida da ordem de 1 a 2% da massa corporal/dia, o que permite manter a concentração de lípidos da maioria das espécies a níveis relativamente constantes, durante o ensaio. A quantidade de alimentos deve ser reavaliada com uma frequência, por exemplo, semanal, de modo a manter constantes a massa corporal e o teor de lípidos. Para tal, pode estimar-se a massa dos peixes de cada célula de ensaio com base na massa do peixe retirado mais recentemente da mesma. Não devem pesar-se os peixes que permanecem nas células.

Os alimentos remanescentes e as fezes são removidos diariamente das células de ensaio, 30 minutos a 1 hora após o fornecimento dos alimentos. As células devem manter-se tão limpas quanto possível ao longo do ensaio, de modo a que a concentração de matérias orgânicas seja mantida aos níveis mais reduzidos, uma vez que a presença de carbono orgânico pode limitar a biodisponibilidade da substância em estudo (1).

Uma vez que muitos alimentos contêm ingredientes à base de peixe, deve averiguar-se a ocorrência da substância em estudo nos mesmos. Deve também pesquisar-se a ocorrência de pesticidas e metais pesados nos alimentos.

1.8.2.6. *Iluminação e temperatura*

O período de irradiação é, em geral, de 12 a 16 horas, devendo a temperatura, cuja variação não deve exceder $\pm 2^\circ\text{C}$, ser adequada às espécies em estudo (ver anexo II). Deve especificar-se o tipo e as características da iluminação e atender-se à eventual fotólise da substância em estudo nas condições de irradiação do ensaio. Devem utilizar-se fontes de iluminação adequadas, de modo a evitar a exposição dos animais a produtos de fotólise não naturais. Em alguns casos, pode afigurar-se adequado utilizar um filtro que elimine as radiações ultravioletas de comprimento de onda inferior a 290 nm.

1.8.2.7. *Concentrações de ensaio*

Os peixes são expostos, em condições dinâmicas, a, pelo menos, duas concentrações da substância em estudo em água. Em geral, a concentração mais elevada deve ser da ordem de 1% da concentração LC_{50} aguda assintótica e, pelo menos, dez vezes superior ao limite de detecção em água do método analítico utilizado.

A concentração mais elevada pode também ser calculada através do quociente de LC₅₀ em 96 horas por um rácio concentração aguda/crónica (os rácios adequados a determinadas substâncias podem variar de 3 a 100). Sempre que possível, as restantes concentrações devem diferir da concentração mais elevada num factor de 10. Caso a aplicação dos critérios baseados no parâmetro LC₅₀ e no limite de detecção não se afigure viável, pode utilizar-se um factor inferior a 10 ou, em alternativa, recorrer a uma substância marcada com ¹⁴C. Não devem utilizar-se concentrações superiores à solubilidade da substância em estudo.

Caso se utilize um agente de solubilização, a respectiva concentração não deve exceder 0,1 ml/l, devendo ser idêntica em todos os recipientes. Deve conhecer-se a contribuição do referido agente, juntamente com a substância em estudo, para o teor de carbono orgânico total da água. Deve, contudo, evitar-se ao máximo a utilização de tais substâncias.

1.8.2.8. *Controlos*

Além das séries de ensaio, deve efectuar-se um controlo com água de diluição ou, se adequado, com o agente de solubilização, na condição de este último não apresentar efeitos negativos nos peixes. Caso contrário, devem efectuar-se ambos os controlos.

1.8.3. **Frequência das determinações da qualidade da água**

Durante o ensaio, devem determinar-se em todos os recipientes o oxigénio dissolvido, o carbono orgânico total, o pH e a temperatura. Além disso, devem determinar-se a dureza e, se for caso disso, a salinidade, das amostras de controlo e da água de um dos recipientes em que a concentração da substância em estudo seja mais elevada. O oxigénio dissolvido e, se for caso disso, a salinidade, devem ser determinados, no mínimo, três vezes durante o período de fixação (no início, na fase intermédia e no final) e com uma frequência semanal no decurso da fase de depuração. O carbono orgânico total deve ser determinado no início do ensaio (48 h e 24 h antes do início), antes da colocação dos peixes nos recipientes e, pelo menos, uma vez por semana no decurso das fases de fixação e depuração. Deve determinar-se a temperatura diariamente, o pH no início e no final de cada período e a dureza uma vez em cada ensaio. Deve determinar-se a temperatura em contínuo pelo menos num dos recipientes.

1.8.4. **Amostragem e análise dos peixes e da água**

1.8.4.1. *Calendário da recolha de amostras de peixes e de água*

Devem recolher-se amostras de água para a determinação da concentração da substância em estudo antes da colocação dos peixes nos recipientes, bem como no decurso das fases de fixação e depuração. As amostras de água devem, no mínimo, ser recolhidas em simultâneo com os peixes e antes da alimentação. Durante a fase de fixação, as concentrações da substância em estudo são determinadas de modo a verificar o respeito dos critérios de validade.

Os peixes são recolhidos em, pelo menos, cinco ocasiões no decurso da fase de fixação e em, pelo menos, quatro ocasiões, durante a fase de depuração. Uma vez que, por vezes, se torna difícil efectuar uma estimativa razoavelmente precisa do factor BCF com base no número de amostras, em especial no caso de a depuração envolver processos que não apresentem uma cinética de primeira ordem, é aconselhável recolher amostras com uma frequência superior, em ambos os períodos (ver anexo IV). As amostras suplementares são armazenadas, sendo apenas analisadas se os resultados da primeira série de determinações forem insuficientes para o cálculo do referido factor com a precisão desejada.

O anexo IV apresenta um exemplo de calendário de amostragem. Podem elaborar-se outros calendários mediante a utilização de outros valores de P_{ow} para o cálculo do tempo de exposição necessário a uma fixação de 95%.

A amostragem deve prosseguir durante a fase de fixação até ser atingido o estado estacionário, num máximo de 28 dias. Caso o estado estacionário não seja atingido em 28 dias, a amostragem deverá prosseguir até um máximo de 60 dias. Antes do início da fase de depuração, os peixes são transferidos para células limpas.

1.8.4.2. *Recolha e preparação das amostras*

As amostras de água para análise são recolhidas, por exemplo, por bombagem através de tubos inertes, a partir de um ponto central na célula de ensaio. Uma vez que nem sempre se afigure possível separar as fracções não-biodisponível e biodisponível da substância em estudo por filtração ou centrifugação (em especial no caso de substâncias super-lipófilas, isto é, substâncias com log P_{ow}>5) (1) (5).

As amostras não devem ser sujeitas a tais processos, devendo adoptar-se medidas para manter as células tão limpas quanto possível e determinar-se o teor de carbono orgânico em ambas as fases (fixação e depuração).

Em cada amostragem, recolhe-se um número adequado de peixes (de modo geral, igual ou superior a 4) das células de ensaio. Os animais em causa são lavados rapidamente com água, secos, mortos instantaneamente por recurso a métodos humanos e pesados.

É aconselhável analisar os peixes e a água imediatamente após a recolha das amostras, de modo a evitar eventuais efeitos, nomeadamente devidos à degradação, calculando as taxas de fixação e depuração aproximadas em função do avanço do ensaio. A análise imediata permite também identificar prontamente o início de uma fase estacionária.

Caso não se proceda à análise imediata, as amostras são armazenadas de acordo com um método adequado. Antes do início do ensaio, devem obter-se dados relativos à armazenagem adequada da substância em estudo, nomeadamente por ultra-congelação, manutenção a 4°C, extracção, etc., bem como à duração da mesma.

1.8.4.3. *Qualidade do método analítico*

Uma vez que o processo global é determinado essencialmente pela exactidão, precisão e sensibilidade do método analítico utilizado, deve comprovar-se experimentalmente a adequação ao mesmo da precisão e reprodutibilidade deste último, bem como do método de recolha da substância em estudo a partir da água e dos peixes, ao referido método. Deve também comprovar-se a não-detectabilidade da substância em estudo na água de diluição.

Se necessário, os valores de C_w e C_f obtidos no ensaio são corrigidos de modo a ter em conta as recuperações e as concentrações de fundo dos controlos. As amostras de peixes e de água devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas, resultantes, nomeadamente, da adsorção pelos equipamentos de amostragem.

1.8.4.4. *Análise das amostras de peixes*

Caso se utilizem radiomarcadores, pode determinar-se a radioactividade total (isto é, da substância de origem e dos seus metabolitos) ou, como alternativa, tratar as amostras de modo a que a substância de origem seja analisada separadamente. Além disso, os principais metabolitos podem ser caracterizados no estado estacionário ou no final da fase de fixação, consoante o que ocorrer primeiro. Se o factor BCF calculado com base nos resíduos radioactivos totais for igual ou superior a 1000%, pode ser aconselhável e mesmo, no caso de determinadas categorias de substâncias, tais como os pesticidas, fortemente recomendável, identificar e quantificar os produtos de degradação que representem 10% ou mais da totalidade dos resíduos nos tecidos dos peixes, no estado estacionário. Caso se identifiquem e quantifiquem os produtos de degradação que representam 10% ou mais dos resíduos totais marcados com radioisótopos nos tecidos dos peixes, recomenda-se também a identificação e quantificação dos produtos de degradação na água do ensaio.

Em geral, deve determinar-se a concentração da substância em estudo para cada peixe pesado. Se tal não for possível, podem combinar-se as amostras em cada amostragem, sem prejuízo do tratamento estatístico dos dados. Caso a especificidade e o rigor do método estatístico sejam importantes, deve utilizar-se no ensaio um número adequado de peixes, de modo a adaptar o procedimento de combinação ao rigor do método.

O factor BCF deve ser expresso em função da massa húmida total e, no caso de substâncias altamente lipófilas, em função também do teor de lípidos. O teor de lípidos dos peixes deve ser determinado, se possível, em cada amostragem, devendo, para tal, utilizar-se métodos adequados (ver os pontos 8 e 2 do anexo III). Como método-padrão, pode recomendar-se a extracção com clorofórmio/metanol (9). A aplicação de métodos diversos não conduz a resultados idênticos (10), pelo que devem fornecer-se pormenores sobre o método utilizado. Sempre que possível, deve efectuar-se a determinação dos lípidos no extracto utilizado para a análise da substância em estudo, uma vez que, com frequência, é necessário remover os mesmos do extracto antes da análise cromatográfica deste último. O teor de lípidos dos peixes no final da experiência, expresso em mg/kg, não deve diferir do teor inicial em mais de 25%. Deve também referir-se a percentagem de matéria seca nos tecidos, de modo a permitir converter o teor de lípidos em relação à massa húmida no teor relativo à massa seca.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

A curva de fixação da substância em estudo é obtida através da representação gráfica da respectiva concentração nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos na fase de fixação, em função do tempo, numa escala aritmética. Quando se observar o início do estado estacionário, isto é, quando a curva se tornar aproximadamente assintótica relativamente ao eixo dos tempos, calcula-se o factor BCF_{SS} do seguinte modo:

$$\frac{C_f \text{ no estado estacionário (média)}}{C_w \text{ no estado estacionário (média)}}$$

Se não for atingido o estado estacionário, pode calcular-se um factor BCF_{SS} suficientemente preciso para a avaliação dos riscos assumindo um estado estacionário “virtual”, a 80% ($1,6/k_2$) ou 95% ($3,0/k_2$) do equilíbrio.

O factor de concentração (BCF_K) consiste no quociente das constantes cinéticas de primeira ordem, k_1/k_2 . De modo geral, a constante de velocidade de depuração (k_2) é determinada com base na curva de depuração (representação gráfica do decréscimo da concentração da substância em estudo nos peixes em função do tempo), calculando-se a constante de velocidade de fixação (k_1) com base em k_2 e num valor de C_f obtido da curva de fixação (ver também o anexo V). O método mais aconselhável para obter o factor BCF_K e as constantes k_1 e k_2 consiste no recurso a métodos computacionais de estimativa não-linear de parâmetros (11). Caso contrário, podem utilizar-se métodos gráficos para o cálculo das constantes cinéticas. Se a curva de depuração revelar de modo inequívoco que o processo não segue uma cinética de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no anexo III), procurando a orientação de um perito em bio-estatística.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Sempre que as concentrações das soluções de ensaio sejam próximas do limite de detecção do método analítico utilizado, os resultados devem ser interpretados com precaução.

A obtenção de curvas de fixação e de depuração bem definidas constitui um indicador da qualidade dos dados relativos à bioconcentração. A variação das velocidades de fixação e depuração obtidas com ambas as concentrações de ensaio deve ser inferior a 20%, devendo registar-se e tentar explicar-se a ocorrência de variações significativas das referidas velocidades. O intervalo de confiança dos valores de BCF obtidos em estudos adequados é, em geral, da ordem de $\pm 20\%$.

3. RELATÓRIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

3.1. SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

- natureza física e, se adequado, propriedades físico-químicas;
- dados decorrentes de análise química (incluindo o teor de carbono orgânico, se adequado);
- no caso da utilização de radiomarcadores, posição do(s) átomo(s) substituído(s) e percentagem de radioactividade associada às impurezas.

3.2. ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS

- denominação científica, variedade, origem, pré-tratamento eventual, aclimação, idade, gama de dimensões, etc.

3.3. CONDIÇÕES DE ENSAIO

- tipo de procedimento utilizado (ensaio dinâmico ou semi-estático);
- tipo e características da iluminação utilizada e respectivo período;

- concepção do ensaio (número e dimensões das células de ensaio, taxa de renovação do volume de água, número de replicados, número de peixes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração das fases de fixação e depuração, frequência da amostragem de peixes e de água);
- método de preparação das soluções-mãe e frequência de renovação (caso se utilize um agente de solubilização, deve fornecer-se a respectiva concentração, bem como a contribuição do mesmo para o teor de carbono orgânico da água);
- concentrações de ensaio nominais, média e desvio-padrão dos valores determinados e método de obtenção dos mesmos;
- fonte da água de diluição, descrição do eventual pré-tratamento desta última, resultados de quaisquer ensaios destinados a comprovar a adequação da água aos peixes e características da água: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, cloro residual (se determinado), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade (se adequado) e quaisquer outras determinações efectuadas;
- qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, dureza, carbono orgânico total, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido);
- informações pormenorizadas sobre a alimentação dos animais (por exemplo, tipo de alimentos, origem e composição dos mesmos - se possível, apresentar, pelo menos, o respectivo teor de lípidos e proteínas -, quantidade fornecida e frequência);
- informações sobre o tratamento das amostras de peixes e de água, incluindo pormenores relativos à preparação, armazenagem e extracção, bem como métodos analíticos aplicados à substância em estudo e à eventual determinação do teor de lípidos, incluindo a respectiva precisão.

3.4. RESULTADOS:

- resultados de quaisquer estudos preliminares efectuados;
- mortalidade dos peixes do lote de controlo e dos peixes expostos à substância, bem como qualquer comportamento anormal observável;
- teor de lípidos dos peixes (se determinado no decurso do ensaio);
- curvas de fixação e de depuração da substância em estudo pelos peixes, exibindo os valores determinados e incluindo o intervalo de surgimento do estado estacionário;
- concentrações C_f e C_w (incluindo os respectivos desvios-padrão e gama, se adequado) para todos os períodos de amostragem. Deve exprimir-se a concentração C_f em $\mu\text{g/g}$ (ppm) de massa húmida do animal na sua totalidade ou de determinados tecidos do mesmo, nomeadamente tecidos ricos em lípidos; o valor C_w é expresso em $\mu\text{g/ml}$ (ppm). Devem também apresentar-se os valores de C_w relativos às séries de controlo, bem como as concentrações de fundo;
- factor de bioconcentração no estado estacionário (BCF_{SS}), e/ou factor de concentração cinético (BCF_K), bem como, se for caso disso, os intervalos de confiança (95%) das constantes de velocidade de fixação e depuração (expressos em relação à massa húmida dos peixes e ao teor total de lípidos, se determinado, dos animais ou de determinados tecidos dos mesmos), intervalos de confiança e desvio-padrão (se disponíveis). Devem também referir-se os métodos computacionais e/ou de análise de dados aplicados a cada concentração da substância em estudo;
- caso se utilizem radiomarcadores, pode, se necessário, apresentar-se a acumulação de quaisquer metabolitos detectados;
- devem referir-se quaisquer ocorrências especiais registadas no decurso do ensaio, bem como quaisquer desvios relativamente ao procedimento ou outras informações de relevo.

O número de resultados classificados de “não detectados no limite de detecção” devem ser minimizados mediante o desenvolvimento de um método e de um protocolo experimental preliminares; os referidos resultados não podem ser utilizados para o cálculo das constantes de velocidade.

4. REFERÊNCIAS

- 1) **Connell** D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, pp 117-156.
- 2) **Bintein** S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, **1**, 29-390.
- 3) **OECD**, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) **Kristensen** P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) **US EPA** 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) **US FDA**, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) **Compaan** H. (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.
- 9) **Gardner** et al. (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) **Randall** R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* **10**, pp 1431-1436.
- 11) **CEC**, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM** E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs

ANEXO I

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ADEQUADA

	SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO LIMITE
1	Teor de partículas	5 mg/l
2	Carbono orgânico total	2 mg/l
3	Amoníaco não-ionizado	1 µg/l
4	Cloro residual	10 µg/l
5	Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
6	Pesticidas organoclorados totais e bifenilos policlorados	50 ng/l
7	Cloro orgânico total	25 ng/l
8	Alumínio	1µg/l
9	Arsénio	1µg/l
10	Crómio	1µg/l
11	Cobalto	1µg/l
12	Cobre	1µg/l
13	Ferro	1µg/l
14	Chumbo	1µg/l
15	Níquel	1µg/l
16	Zinco	1µg/l
17	Cádmio	100 ng/l
18	Mercúrio	100 ng/l
19	Prata	100 ng/l

ANEXO II
ESPÉCIES RECOMENDADAS PARA O ENSAIO

	Espécies recomendadas	Gama de temperaturas de ensaio recomendadas (°C)	Comprimento recomendado dos animais de ensaio (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan)	20 - 25	3.0 ± 0.5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 - 25	5.0 ± 2.0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus)	20 - 25	5.0 ± 3.0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel)	20 - 25	4.0 ± 1.0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters)	20 - 25	3.0 ± 1.0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	20 - 25	5.0 ± 2.0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum)	13 - 17	8.0 ± 4.0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus)	18 - 20	3.0 ± 1.0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

Diversas espécies estuarinas e marinhas foram utilizadas em países diferentes, nomeadamente:

Leostomus xanthurus

Cyprinodon variegatus

Menidia beryllina

Cymatogaster aggregata

Parophrys vetulus

Leptocottus armatus

Gasterosteus aculeatus

Dicentracus labrax

Alburnus alburnus

OBTENÇÃO DOS PEIXES

Os peixes de água doce referidos no quadro supra são de fácil reprodução, encontrando-se disponíveis todo o ano, enquanto que a disponibilidade de algumas das espécies marinhas e estuarinas se encontra limitada a determinados países. Os peixes de água doce podem ser criados em explorações piscícolas ou no laboratório, em condições controladas no que respeita a doenças e parasitas, de modo a produzir animais saudáveis com uma linha parental conhecida. Estas espécies encontram-se disponíveis em várias partes do mundo.

ANEXO III

PREVISÃO DA DURAÇÃO DAS FASES DE FIXAÇÃO E DEPURACÃO

1. Estimativa da duração da fase de fixação

Antes de realizar o ensaio, pode obter-se uma estimativa de k_2 e, conseqüentemente, do tempo necessário para atingir o estado estacionário, com base em relações empíricas entre k_2 e o coeficiente de partição n-octanol/água (P_{ow}) ou entre k_2 e a solubilidade em água (s).

A relação empírica que se segue permite obter, nomeadamente, uma estimativa de k_2 (expressa em dias⁻¹) (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 (r^2=0,95) \quad \text{[equação 1]}$$

A referência nº 2 inclui outras equações.

Caso o coeficiente de partição (P_{ow}) não seja conhecido, pode obter-se uma estimativa (3) com base na solubilidade em água da substância em estudo:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 (r^2 = 0,994) \text{[equação 2]}$$

em que s = solubilidade (moles/l) : (n=36)

As equações apenas são aplicáveis a substâncias com valores de $\log P_{ow}$ compreendidos entre 2 e 6,5 (4).

Pode obter-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário a partir de do valor de k_2 estimado, com base na equação cinética que descreve a fixação e a depuração (assumindo uma cinética de primeira ordem):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

ou, para C_w constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[equação 3]}$$

Na vizinhança do estado estacionário ($t \rightarrow \infty$), a equação 3 pode reduzir-se a (5) (6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{ou} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

O valor $k_1/k_2 \cdot C_w$ constitui uma estimativa da concentração nos peixes no estado estacionário “virtual” ($C_{f,s}$).

A equação 3 pode transformar-se em:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{ou} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[equação 4]}$$

Aplicando a equação 4, pode prever-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário, utilizando o valor de k_2 determinado por intermédio da equação 1 ou 2.

Do ponto de vista estatístico, a duração óptima da fase de fixação para a obtenção de dados estatísticos fiáveis (BCF_K) consiste no período necessário para que a curva decorrente da representação gráfica do logaritmo da concentração da substância em estudo nos peixes em função do tempo, numa escala aritmética, atinja o ponto médio, ou $1,6/k_2$, ou 80% do estado estacionário, mas não mais de $3,0/k_2$ ou 95% do estado estacionário (7).

O tempo necessário para atingir 80% do estado estacionário é dado por (equação 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{ou} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{equação 5}]$$

Do mesmo modo, o tempo necessário para atingir 95% do estado estacionário é dado por:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{equação 6}]$$

Por exemplo, a duração da fase de fixação (up) de uma substância com $\log P_{ow} = 4$, é calculada do seguinte modo, por recurso às equações 1, 5 e 6:

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ dias}^{-1} \\ \text{ou} \quad \text{up (80\%)} &= 1,6/0,652, \text{ ou seja, } 2,45 \text{ dias (59 horas)} \\ \text{ou} \quad \text{up (95\%)} &= 3,0/0,652, \text{ ou seja, } 4,60 \text{ dias (110 horas)} \end{aligned}$$

Do mesmo modo, a duração da fase de fixação de uma substância com $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log(s) = -5,0$), é calculada por recurso às equações 1, 2, 5 e 6:

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} k_2 &= -0,414 (5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ dias}^{-1} \\ \text{up (80\%)} &= 1,6/0,246, \text{ ou seja, } 6,5 \text{ dias (156 horas)} \\ \text{ou} \quad \text{up (95\%)} &= 3,0/0,246, \text{ ou seja, } 12,2 \text{ dias (293 horas)} \end{aligned}$$

Como alternativa, pode utilizar-se a expressão seguinte para o cálculo do tempo necessário para atingir o estado estacionário real (4) :

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (horas)}$$

2. Estimativa da duração da fase de depuração

Com base na equação geral que descreve a fixação e a depuração de acordo com uma cinética de primeira ordem, pode obter-se uma estimativa do tempo necessário para reduzir a carga corporal de uma determinada percentagem da concentração inicial (1) (8).

Na fase de depuração, a concentração C_w deve ser nula, pelo que a equação pode reduzir-se a:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{ou} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

em que $C_{f,o}$ representa a concentração no início do período de depuração. O tempo necessário para atingir 50% da depuração (t_{50}) é dado por:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{ou} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Do mesmo modo, o tempo necessário para atingir 95% de depuração será:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Caso se utilize um valor correspondente a 80% da fixação no primeiro período ($1,6/k_2$) e a 95% da depuração na fase respectiva ($3,0/k_2$), a duração da fase de depuração é aproximadamente dupla da duração da fase de fixação.

Deve sublinhar-se, todavia, que as estimativas em causa apenas são válidas para perfis de fixação e depuração que sigam uma cinética de primeira ordem. Caso se demonstre que tal não sucede, deve recorrer-se a modelos mais complexos (por exemplo, referência (1)).

REFERÊNCIAS (Anexo III)

- 1) **Spacie** A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, pp 309-320.
- 2) **Kristensen** P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) **Chiou** C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16** (1), pp 4-10.
- 4) **Hawker** D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), pp 701-707.
- 5) **Branson** D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, **104** (4), pp 785-792.
- 6) **Ernst** W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly** P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* **55**, pp 614-622.
- 8) **Könemann** H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, pp 3-19.

ANEXO IV

EXEMPLO DE CALENDÁRIO DE AMOSTRAGEM APLICÁVEL AOS ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO

DE SUBSTÂNCIAS COM $\log P_{ow} = 4$.

Recolha de amostras de peixes	Calendário de amostragem		Nº de amostras de água	Nº de peixes por amostra
	Frequência mínima necessária (dias)	Recolha de amostras adicionais		
Fase de fixação	-1 0		2* 2	45-80 peixes
1 ^a	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
2 ^a	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
3 ^a	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
4 ^a	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
5 ^a	4.7		2	6
Fase de depuração				Transferência dos peixes para uma célula com água isenta da substância em estudo
6 ^a	5.0	5.3		4 (4)
7 ^a	5.9	7.0		4 (4)
8 ^a	9.3	11.2		4 (4)
9 ^a	14.0	17.5		6 (4)

* Recolher as amostras de água após, pelo menos, três renovações do volume da célula.

Os valores entre parêntesis correspondem ao número de amostras de água e de peixes a recolher caso se proceda a uma amostragem suplementar.

Nota: O valor estimado de k_2 para $\log P_{ow} = 4.0$ é de $0,652 \text{ dias}^{-1}$. A duração total do ensaio é dada por:

$$3 \times \text{up} = 3 \times 4.6 \text{ dias} = 14 \text{ dias. Para o cálculo do factor "up", consultar o Anexo III.}$$

ANEXO V

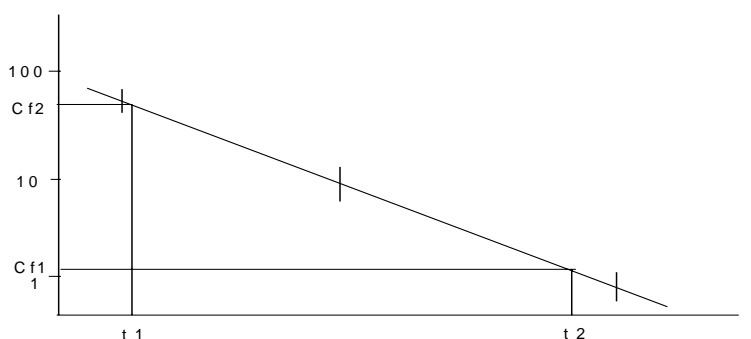
DESCRIÇÃO DO MODELO

Considera-se que a maioria dos dados referentes à bioconcentração são razoavelmente descritos por recurso a um modelo simples do tipo “dois compartimentos/dois parâmetros”, baseado na linearidade da curva obtida na representação gráfica em papel semi-logarítmico das concentrações nos peixes durante a fase de depuração em função do tempo. Caso não se obtenha uma curva linear, devem utilizar-se processos mais complexos, nomeadamente o processo descrito por Spacie e Hamelink (referência 1 do anexo III).

MÉTODO GRÁFICO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE DEPURACÃO, k_2

Representar graficamente, em papel semi-logarítmico, a concentração da substância em estudo nas diversas amostras de peixe em função dos tempos de amostragem. O declive da curva obtida fornece o valor de k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Deve sublinhar-se que quaisquer eventuais desvios à linearidade podem constituir indicação de um perfil de depuração mais complexo que o descrito por uma cinética de primeira ordem, podendo também aplicar-se métodos gráficos no caso de processos de depuração que não exibam uma cinética de primeira ordem.

MÉTODO GRÁFICO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE FIXAÇÃO, k_1

Conhecida a constante k_2 , calcular k_1 do seguinte modo:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \text{ [equação 1]}$$

O valor de C_f é obtido a partir do ponto médio da curva de fixação obtida na representação gráfica do logaritmo da concentração em função do tempo.

MÉTODO COMPUTACIONAL PARA O CÁLCULO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE DE FIXAÇÃO E DE DEPURAÇÃO

O processo mais adequado para obter o factor de bioconcentração, bem como as constantes k_1 e k_2 , consiste no recurso a métodos computacionais de estimativa não-linear. Os programas utilizados permitem obter valores para k_1 e k_2 a partir de uma série sequencial de dados tempo/concentração, aplicando o seguinte modelo teórico:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} X(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[equação 2]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} X(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[equação 3]}$$

em que t_c = tempo decorrido até ao final da fase de fixação.

A abordagem em causa permite obter uma estimativa de k_1 e k_2 com base no desvio-padrão.

Uma vez que, na maioria dos casos, a constante k_2 pode ser estimada a partir da curva de depuração com uma precisão relativamente elevada, determinando-se em simultâneo a forte correlação existente entre os parâmetros k_1 e k_2 , pode ser aconselhável começar por calcular k_2 apenas com base nos dados de depuração, calculando posteriormente k_1 a partir dos dados de fixação, por recurso a um método de regressão não-linear.

C.14. ENSAIO DE CRESCIMENTO JUVENIL EM PEIXES

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade no crescimento baseia-se na publicação OECD TG 215 (2000) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente ensaio, concebido para avaliar os efeitos da exposição prolongada a substâncias químicas no crescimento de peixes juvenis, baseia-se num método desenvolvido e testado na União Europeia através de um ensaio interlaboratorial (1)(2) e destinado a determinar os efeitos de substâncias químicas no crescimento de juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em condições de escoamento. Podem usar-se para ensaio outras espécies relativamente às quais existam obras de referência. As publicações sobre ensaios de crescimento em peixe-zebra (*Danio rerio*)¹ (3)(4) e em peixinho dos arrozais (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7), por exemplo, contêm informações úteis para este tipo de estudos.

Ver também a Introdução Geral, Parte C.

1.2 DEFINIÇÕES

Menor concentração com efeito observável (MCCEO): é a menor concentração de ensaio da substância a ensaiar para a qual se observa um efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à MCCEO devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a MCCEO.

Concentração sem efeito observável (CSEO): é a concentração de ensaio cujo valor se situa imediatamente abaixo do valor da MCCEO.

CEx: no presente método de ensaio, é a concentração da substância de ensaio que causa uma variação de x % na taxa de crescimento dos peixes relativamente aos controlos.

Taxa de carga: é o peso fresco de peixe por volume de água.

Densidade de ocupação: é o número de peixes por volume de água.

Taxa específica de crescimento individual de um peixe: expressa a taxa de crescimento de um indivíduo relativamente ao seu peso inicial.

Taxa específica média de crescimento de um tanque: expressa a taxa média de crescimento da população de um tanque para uma dada concentração da substância de ensaio.

Taxa de crescimento pseudo-específica: expressa a taxa de crescimento individual relativamente ao valor médio do peso inicial da população do tanque.

¹ Meyer, A., Bierman, C.H. e Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp.231-236.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os peixes juvenis em fase exponencial de crescimento são pesados, colocados em câmaras de ensaio e expostos a uma gama de concentrações subletais da substância de ensaio dissolvida em água. O ensaio deverá realizar-se preferencialmente em condições de escoamento; se tal não for possível, poderão usar-se condições semiestáticas (estático-renovação) apropriadas. A duração do ensaio é de 28 dias. Os peixes são alimentados diariamente. A quantidade de alimento fornecido aos peixes é calculada com base no seu peso inicial e pode ser re-avaliada decorridos 14 dias de ensaio. No final do ensaio, os peixes são pesados novamente. Os efeitos nas taxas de crescimento são analisados por meio de um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que provocaria uma variação de x % na taxa de crescimento, ou seja, CEx (por exemplo, CE10, CE20 ou CE30). Em alternativa, os dados podem ser comparados com valores de controlo, de modo a determinar a menor concentração com efeito observável (MCCEO) e, a partir desse valor, a concentração sem efeito observável (CSEO).

1.4 INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver Método de Ensaio C. 1.) realizado de preferência com a espécie escolhida para este ensaio, o que implica que a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância de ensaio são conhecidas, e que existe um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções a ensaiar, relativamente ao qual a exactidão e o limite de detecção são conhecidos e se encontram descritos.

A fórmula estrutural, o grau de pureza, a estabilidade em água, a estabilidade à luz, os valores de pK_a e P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade “fácil” da substância de ensaio constituem informações úteis (ver Método de Ensaio C. 4).

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando são cumpridas as seguintes condições:

- no(s) controlo(s), a mortalidade no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %;
- o aumento do peso médio dos peixes no(s) controlo(s) deverá ser suficiente para permitir a detecção da mínima variação da taxa de crescimento considerada significativa. Os resultados de um ensaio interlaboratorial (2) demonstraram que, para a truta arco-íris, o peso médio dos peixes nos controlos deve sofrer, ao longo de 28 dias, um aumento que seja, no mínimo, equivalente a metade (isto é, a 50 %) do seu peso médio inicial; por exemplo, peso inicial: 1 g/peixe (= 100 %), peso final após 28 dias: $\geq 1,5$ g/peixe (≥ 150 %);
- a concentração do oxigénio dissolvido deve ser igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA) ao longo de todo o ensaio;
- a variação da temperatura da água não deve ser superior a $\pm 1^\circ\text{C}$ entre as diferentes câmaras de ensaio em qualquer momento do ensaio nem deverá ultrapassar um intervalo de 2°C dentro das gamas de temperatura especificadas para as espécies a ensaiar (Anexo 1).

1.6 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1 Equipamento

Equipamento normal de laboratório e, mais especificamente, o seguinte:

- a) medidores de oxigénio e de pH;
- b) equipamento para determinação da dureza e alcalinidade da água;
- c) aparelhos apropriados para o controlo da temperatura e que permitam, de preferência, a sua monitorização contínua;
- d) tanques construídos com um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver ponto 1.8.5 e Anexo 1);
- e) balança de precisão apropriada (isto é, com uma exactidão de $\pm 0,5\%$).

1.6.2 Água

Qualquer água que sustente a sobrevivência e o crescimento adequados a longo prazo, da espécie em ensaio, poderá ser utilizada como água de ensaio. A qualidade da água deve ser mantida constante durante o ensaio. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a 0,5 unidades. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (expressos em CaCO₃). Para assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado do ensaio (por complexação da substância de ensaio, por exemplo), deverão ser regularmente retiradas amostras para análise. Devem efectuar-se medições de metais pesados (por exemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), principais aniões e catiões (por exemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl e SO₄), pesticidas (por exemplo, pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão. Nos casos em que se sabe que a água de diluição mantém uma qualidade relativamente constante, estas medições deverão ser efectuadas, por exemplo, de três em três meses. Caso se demonstre que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo). No Anexo 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

1.6.3 Soluções de ensaio

As soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução de reserva.

A solução de reserva deve ser preparada, preferencialmente, apenas por mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultra-sónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter uma solução de reserva concentrada adequada.

Em alguns casos, pode ser necessário utilizar solventes ou dispersantes (agentes solubilizantes) para produzir uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida e o trietilenoglicol são exemplos de solventes adequados. Dispersantes adequados são, por exemplo, o Cremofor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. Deve ter-se cuidado ao utilizar agentes facilmente biodegradáveis (como a acetona, por exemplo) e/ou compostos altamente voláteis, uma vez que estes podem causar problemas relacionados com o desenvolvimento de bactérias nos ensaios em que for utilizado o método de escoamento. Quando se utiliza um agente solubilizante, este não deve afectar de forma significativa o crescimento dos peixes, nem produzir efeitos adversos observáveis nos juvenis, de acordo com um controlo na presença apenas do solvente.

Para os ensaios por escoamento, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente a solução de reserva da substância de ensaio (por exemplo, uma bomba de medição, um diluidor proporcional ou um sistema saturador), por forma a fornecer uma série de concentrações às câmaras de ensaio. As taxas de fluxo das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificadas a intervalos regulares durante o ensaio, de preferência diariamente, e não devem variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Os resultados de um ensaio interlaboratorial demonstraram que, para a truta arco-íris, é adequado utilizar uma frequência de remoção de água de 6 l/g de peixe/dia (ver ponto 1.8.2.2).

Para os ensaios semiestáticos (de renovação), a frequência de renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio. No entanto, recomenda-se uma renovação diária da água. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4), se demonstrar que a concentração da substância de ensaio não é estável (isto é, se estiver fora da gama de 80 - 120 % do valor nominal ou se for inferior a 80 % da concentração medida inicialmente) durante o período de renovação, deve considerar-se a utilização de um ensaio por escoamento.

1.6.4 **Seleção de espécies**

A espécie recomendada para o presente ensaio é a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), uma vez que a maior parte da informação disponível foi obtida a partir de ensaios interlaboratoriais realizados com esta espécie (1)(2). Podem ser usadas outras espécies relativamente às quais exista documentação de referência embora o método de ensaio possa ter de ser adaptado de modo a proporcionar as condições de ensaio adequadas. Por exemplo, existem obras de referência relativas ao peixe-zebra (*Danio rerio*) (3)(4) e ao peixinho dos arrozais (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7). Neste caso, o relatório deverá indicar o critério para a seleção das espécies e o método experimental.

1.6.5 **Confinação dos peixes**

Os peixes de ensaio devem ser seleccionados a partir da população de uma única reserva (de preferência proveniente da mesma desova), que tenha sido mantida em condições de qualidade da água e de iluminação idênticas às usadas no ensaio durante, pelo menos, as duas semanas anteriores à sua realização. Durante o período de confinamento e no decorrer do ensaio, os peixes devem ser alimentados preferencialmente com uma ração equivalente a 4 % do peso corporal por dia; no mínimo, a ração diária deverá corresponder a 2% do peso corporal.

Decorrido um período inicial de 48 h deverá registar-se a mortalidade e aplicar os seguintes critérios:

- mortalidade superior a 10 % da população num período de sete dias: o lote é rejeitado na sua totalidade;
- mortalidade de 5 % a 10 % da população: aclimatação durante um período adicional de sete dias; caso se verifique mortalidade superior a 5 % durante este segundo período, deverá rejeitar-se a totalidade do lote;
- mortalidade inferior a 5 % da população num período de sete dias: o lote é aceite.

Os peixes não devem receber qualquer tratamento de doenças nas duas semanas anteriores ao ensaio nem durante a realização do mesmo.

1.7 PLANEAMENTO DO ENSAIO

O 'planeamento do ensaio' consiste na escolha do número e intervalos das concentrações de ensaio, do número de tanques para cada concentração e do número de peixes por tanque. Um planeamento de ensaio correctamente elaborado deverá considerar os seguintes aspectos:

- a) o objectivo do estudo;
- b) o método de análise estatística a utilizar;
- c) a disponibilidade e o custo dos meios experimentais.

A definição do objectivo deverá, se possível, especificar o rigor estatístico para o qual é necessário ocorrer uma determinada diferença, de modo a ser detectada (na taxa de crescimento, por exemplo). Em alternativa, poderá especificar a precisão com que será necessário determinar a CE_x de modo a permitir a sua estimativa (por exemplo, com $x = 10, 20$ ou 30 ; de preferência, o valor de x não deve ser inferior a 10). Se nenhuma destas informações for disponibilizada, não será possível dar uma indicação correcta da dimensão do estudo.

Importa ter presente que um planeamento considerado óptimo (ou seja, o que utiliza da melhor forma os recursos disponíveis) para análise através de um dado método estatístico poderá não o ser para outro método. Assim, um planeamento concebido para determinação da MCCEO/CSEO não será idêntico a um outro concebido para análise por regressão.

Na maioria dos casos, pelas razões analisadas por Stephan e Rogers (8), considera-se que a análise de regressão é preferível à análise de variância. No entanto, no caso de não se encontrar um modelo de regressão adequado ($r^2 < 0,9$), deverá usar-se a estimativa de CSEO/MCCEO.

1.7.1 Planeamento para análise por regressão

O planeamento de um ensaio a analisar por regressão deverá considerar os seguintes aspectos:

- a) As concentrações testadas no ensaio deverão, obrigatoriamente, incluir as concentrações às quais se observam determinadas percentagens de efeito (por exemplo, $CE_{10,20,30}$) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância de ensaio é significativo. As estimativas das concentrações responsáveis por determinadas percentagens de efeito poderão ser feitas com maior precisão se os respectivos valores se localizarem a meio da gama de concentrações ensaiadas. A realização de um ensaio preliminar para determinação da gama de concentrações poderá ser útil na escolha das concentrações de ensaio apropriadas.
- b) De modo a permitir a aplicação de um modelo estatístico, o ensaio deve incluir, no mínimo, um tanque de controlo e cinco tanques adicionais com diferentes concentrações da substância de ensaio. Caso se utilize um agente solubilizante, o ensaio deverá incluir, além da série de ensaio, um controlo contendo o agente solubilizante na maior das concentrações testadas no ensaio (ver pontos 1.8.3 e 1.8.4).
- c) Embora se possam utilizar séries geométricas ou séries logarítmicas adequadas (9) (ver Anexo 3), recomenda-se o espaçamento logarítmico das concentrações de ensaio.
- d) Se existirem mais do que seis tanques, os tanques excedentes devem ser usados para repetição ou distribuídos ao longo da gama de concentrações de forma a reduzir o intervalo entre níveis. Não há preferência por qualquer destes procedimentos.

1.7.2 **Planeamento para a estimativa de CSEO/MCCEO através de Análise de Variância (ANOVA)**

Sempre que possível, devem usar-se repetições dos tanques correspondentes a cada concentração; a análise estatística deve efectuar-se ao nível de cada tanque (10). Sem repetições, não é possível analisar a variabilidade entre tanques, mas apenas a atribuível à variabilidade entre cada um dos elementos da população. No entanto, os resultados de um estudo publicado (11) demonstraram que, no caso examinado, a variabilidade entre tanques era muito pequena quando comparada com a variabilidade dentro de cada tanque (isto é, entre os peixes de um tanque). Assim, considera-se a realização de análise estatística a nível individual uma alternativa relativamente aceitável.

Convencionalmente, utilizam-se pelo menos cinco concentrações de ensaio de uma série geométrica com um factor que, de preferência, não deverá ser superior a 3,2.

Em geral, em ensaios com tanques repetidos, o número de repetições de tanques de controlo (e portanto, o número de peixes) deverá ser o dobro do usado em cada uma das concentrações de ensaio, as quais deverão ser de dimensão idêntica (12)(13)(14). Em contrapartida, na ausência de tanques repetidos, o número de peixes no grupo de controlo deve ser idêntico ao usado em cada concentração de ensaio.

Caso se utilize uma ANOVA baseada em tanques e não em indivíduos (o que implicaria a marcação individual dos peixes ou o uso de taxas de crescimento pseudo-específicas (ver ponto 2.1.2), o ensaio deverá incluir as repetições necessárias para a determinação do desvio-padrão relativo aos 'tanques nas mesmas concentrações'. Assim sendo, a estimativa do erro na análise de variância deverá considerar, no mínimo, 5 graus de liberdade (10). Se o ensaio incluir apenas repetições dos controlos, a variabilidade do erro poderá ser desviada, uma vez que pode aumentar com o valor médio da taxa de crescimento em questão. Dado ser provável que a taxa de crescimento diminua com o aumento da concentração, esta situação poderá conduzir a uma sobrestimação da variabilidade.

1.8 PROCEDIMENTO

1.8.1 **Seleção e pesagem dos peixes de ensaio**

É importante minimizar a variação entre o peso de cada peixe no início do ensaio. O Anexo 1 contém as gamas de pesos aceitáveis para as diferentes espécies recomendadas para uso neste ensaio. A gama de pesos individuais em todo o lote de peixes no início do ensaio deve situar-se, de preferência, dentro dos limites de $\pm 10\%$ da média aritmética dos pesos, não devendo, em circunstância alguma, exceder os 25%. Por forma a estimar o peso médio, recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixe antes de dar início ao ensaio.

A população de reserva deve ser privada de alimento durante as 24 horas que antecedem o início do ensaio. Os peixes deverão então ser escolhidos de forma aleatória. Utilizando um anestésico geral (por exemplo, uma solução aquosa de 100 mg/l de metanosulfonato de tricafina [MS 222], neutralizada por adição de duas partes de bicarbonato de sódio por cada parte de MS 222), os peixes devem ser pesados individualmente por forma a determinar o peso fresco (secos com papel absorvente) com a precisão indicada no Anexo 1. Os peixes cujo peso se encontre dentro da gama pretendida são seleccionados e distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio. Deve registar-se o peso fresco total dos peixes em cada recipiente. O uso de anestésicos e a manipulação (incluindo a secagem com papel e a pesagem) podem causar tensão ou danos físicos nos peixes juvenis, especialmente em espécies de pequeno tamanho. Por essa razão, a manipulação dos juvenis deverá ser feita com o máximo cuidado para se evitarem esses efeitos nos animais do ensaio.

Os peixes voltam a ser pesados no 28º dia de ensaio (ver ponto 1.8.6). No entanto, caso se considere necessário recalcular a ração alimentar, pode efectuar-se uma pesagem adicional no 14º dia de ensaio (ver ponto 1.8.2.3). A detecção de alterações no tamanho dos peixes, a partir dos quais se possam ajustar as rações alimentares, poderá ser efectuada através de outros métodos, tais como a fotografia.

1.8.2 **Condições de exposição**

1.8.2.1 **Duração**

A duração mínima do ensaio é de 28 dias.

1.8.2.2 *Taxas de carga e densidades de ocupação*

É importante que a taxa de carga e a densidade de ocupação sejam adequadas à espécie usada no ensaio (ver Anexo 1). Uma densidade de ocupação demasiado elevada poderá dar origem a perturbações por superlotação, causadoras de reduções nas taxas de crescimento e, possivelmente, de doenças. Por outro lado, o uso de baixas densidades de ocupação poderá induzir comportamentos territoriais, que poderão também afectar o crescimento. Em todo o caso, a taxa de carga deverá ser suficientemente baixa para permitir manter uma concentração de oxigénio dissolvido de pelo menos 60 % VSA sem arejamento. Um ensaio interlaboratorial demonstrou que, para a truta arco-íris, é adequado utilizar uma taxa de carga de 16 trutas de 3-5 g num volume de 40 l. A frequência de remoção de água recomendada durante o período de ensaio é de 6 l/g de peixe/dia.

1.8.2.3 *Alimentação*

Os peixes devem ser nutridos com um alimento apropriado (Anexo 1), administrado a um ritmo suficiente para induzir uma taxa de crescimento aceitável. Deverão ser tomadas as precauções necessárias para evitar o crescimento de microrganismos e a turbidez da água. No caso da truta arco-íris, considera-se adequada uma quantidade diária correspondente a 4 % do seu peso corporal (2)(15)(16)(17). A ração diária pode ser dividida em duas porções iguais, que serão fornecidas aos peixes em duas tomas separadas por um intervalo mínimo de 5 horas. O cálculo da ração baseia-se no peso total inicial dos peixes em cada recipiente. No caso de se efectuar uma segunda pesagem dos peixes no 14º dia de ensaio, poderá efectuar-se um novo cálculo da ração alimentar. Os peixes devem ser privados de alimento durante o período de 24 horas que antecede a pesagem.

Os alimentos não consumidos e a matéria fecal devem ser removidos diariamente dos recipientes de ensaio, limpando-se cuidadosamente o fundo de cada tanque com um sistema de sucção.

1.8.2.4 *Luz e temperatura*

O fotoperíodo e a temperatura da água do ensaio devem ser apropriados para a espécie de ensaio (Anexo 1).

1.8.3 **Concentrações de ensaio**

Normalmente, deverão ser utilizadas cinco concentrações da substância de ensaio, independentemente do planeamento do ensaio (ver ponto 1.7.2). O conhecimento prévio da toxicidade da substância de ensaio (obtido a partir de um ensaio de toxicidade aguda e/ou de um ensaio para determinação de gama de concentrações, por exemplo) deverá ajudar na selecção das concentrações de ensaio apropriadas. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizam menos de cinco concentrações. A concentração de ensaio mais elevada não deverá exceder o limite de solubilidade da substância em água.

Quando se utiliza um agente solubilizante para facilitar a preparação de soluções de reserva, a sua concentração final não deve ser superior a 0,1 ml/l e, de preferência, deverá ser a mesma em todos os recipientes de ensaio (ver ponto 1.6.3). No entanto, devem fazer-se todos os esforços para evitar a utilização destes produtos.

1.8.4 **Controlos**

O número de controlos em água de diluição depende do planeamento do ensaio (ver pontos 1.7-1.7.2). Se se utilizar um agente solubilizante, o ensaio deverá incluir controlos com essa substância em número idêntico aos controlos em água de diluição.

1.8.5 **Frequência das determinações analíticas e medições**

Durante o ensaio, as concentrações da substância de ensaio deverão ser determinadas a intervalos regulares (ver abaixo).

Nos ensaios por escoamento, as taxas de fluxo das soluções de reserva do agente de diluição e da substância tóxica devem ser verificadas a intervalos regulares, de preferência diariamente, não devendo variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Nos ensaios em que se espera que as concentrações da substância de ensaio se mantenham dentro de um intervalo de ± 20 % dos valores nominais (isto é, dentro da gama 80 - 120 %; ver pontos 1.6.2 e 1.6.3), recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor das concentrações de ensaio sejam analisadas no início do estudo e, a partir daí, semanalmente. Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal (com base nos dados de estabilidade da substância), será necessário analisar todas as concentrações de ensaio, seguindo o mesmo regime.

Nos ensaios semiestáticos (de renovação), em que se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de um intervalo de ± 20 % do valor nominal, recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor das concentrações de ensaio sejam analisadas logo após a sua preparação e imediatamente antes da renovação, no início do estudo e, a partir daí, semanalmente. Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal, será necessário analisar todas as concentrações de ensaio, seguindo um regime idêntico ao recomendado para substâncias mais estáveis.

Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, caso existam provas de que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve, durante o ensaio, no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida, os resultados poderão basear-se em valores nominais ou em valores medidos.

As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando um poro com 0,45 μm , por exemplo). Embora a centrifugação seja o procedimento recomendado, as amostras podem ser filtradas desde que o material de ensaio não adsorva aos filtros.

Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em todos os recipientes de ensaio. A dureza total, a alcalinidade e a salinidade (se relevante) devem ser medidas nos controlos e num recipiente com a concentração mais elevada. O oxigénio dissolvido e a salinidade (se relevante) devem ser medidos três vezes (no início, a meio e no fim do ensaio). Nos ensaios semiestáticos, recomenda-se que o oxigénio dissolvido seja medido com maior frequência, de preferência antes e após cada renovação da água ou, pelo menos, uma vez por semana. O pH deve ser medido no início e no fim de cada renovação da água nos ensaios de renovação estática e, pelo menos, semanalmente nos ensaios por escoamento. A dureza e a alcalinidade devem ser medidas uma vez em cada ensaio. A temperatura deverá ser, de preferência, monitorizada continuamente, pelo menos, num recipiente de ensaio.

1.8.6 Observações

Peso: No fim do ensaio, todos os peixes sobreviventes devem ser pesados, avaliando-se o peso fresco (seco com papel absorvente). A pesagem pode ser feita individualmente ou em grupos por recipiente de ensaio; este último procedimento é preferível, uma vez que a pesagem em separado exige a marcação individual dos peixes. Se for necessário efectuar pesagens individuais para determinar taxas específicas de crescimento de cada um dos peixes, a técnica de marcação adoptada deverá evitar perturbar os animais (poderão utilizar-se alternativas à marcação por congelação, tais como a utilização de linha de pesca fina colorida).

Durante o período do ensaio, os peixes devem ser observados diariamente, devendo ser assinaladas quaisquer anomalias externas (tais como hemorragia, descoloração) ou comportamentos anómalos. A mortalidade deverá ser registada, e os peixes mortos retirados o mais rapidamente possível. Os peixes mortos não são substituídos, uma vez que a taxa de carga e a densidade de ocupação são suficientes para impedir que alterações no número de peixes por tanque afectem o crescimento. No entanto, a taxa de alimentação deverá ser reajustada.

2 DADOS E RELATÓRIO

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que um técnico estatístico participe tanto no planeamento como na análise do ensaio, uma vez que o método permite variações consideráveis no plano experimental no que se refere, por exemplo, ao número de recipientes de ensaio, ao número de concentrações de ensaio, ao número de peixes, etc. Devido às opções disponíveis quanto ao planeamento do ensaio, não se fornece qualquer orientação específica relativamente aos procedimentos estatísticos.

As taxas de crescimento não devem ser calculadas em recipientes de ensaio em que a mortalidade seja superior a 10 %. No entanto, deve indicar-se a taxa de mortalidade para todas as concentrações de ensaio.

Seja qual for o método utilizado na análise dos dados, o conceito fundamental é a taxa específica de crescimento r entre os tempos t_1 e t_2 . Esta pode ser definida de várias formas, dependendo de os peixes serem ou não marcados individualmente, bem como da necessidade de determinar uma média por tanque.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\overline{\log_e w_2 - \log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

em que

r_1 = taxa específica de crescimento individual

r_2 = taxa específica de crescimento média por tanque

r_3 = taxa pseudo-específica de crescimento

w_1, w_2 = pesos de determinado peixe nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente

$\log_e w_1$ = logaritmo do peso de um indivíduo no início do período de estudo

$\log_e w_2$ = logaritmo do peso de um indivíduo no final do período de estudo

$\overline{\log_e w_1}$ = média dos logaritmos dos valores de w_1 para os peixes do tanque no início do período de estudo

$\overline{\log_e w_2}$ = média dos logaritmos dos valores de w_2 para os peixes do tanque no final do período de estudo

t_1, t_2 = tempo (em dias) no início e no final do período de estudo

As taxas r_1, r_2, r_3 podem ser calculadas para o período “dia 0 - dia 28”, e, quando apropriado (isto é, quando se efectuaram medições no 14º dia de ensaio), para os períodos “dia 0 - dia 14” e “dia 14 - dia 28”.

2.1.1 **Análise de resultados por regressão (modelo concentração-resposta)**

Este método de análise estabelece uma relação matemática adequada entre a taxa específica de crescimento e a concentração, permitindo a determinação da ‘ CE_x ’, ou seja, de qualquer valor de CE. Utilizando este método não é necessário calcular o valor individual de r (r_1) e, em vez disso, a análise pode basear-se no valor médio de r por tanque (r_2). Este último procedimento é considerado preferível, e também mais adequado a espécies de menores dimensões.

As taxas específicas de crescimento médias por tanque (r_2) devem ser representadas graficamente em função da concentração, de forma a observar a relação concentração-resposta.

A relação entre r_2 e a concentração deve ser expressa através de um modelo apropriado, cuja escolha deve ser bem fundamentada.

Se os números de peixes sobreviventes em cada tanque forem diferentes, o procedimento de ajuste do modelo (seja este simples ou não-linear) deverá ser ponderado por forma a permitir grupos de diferentes dimensões.

O método de ajuste do modelo deve permitir estimar, por exemplo, o valor de CE_{20} e da respectiva dispersão (erro-padrão ou intervalo de confiança). O gráfico do modelo ajustado deve ser apresentado em conjunto com os dados, de modo a permitir observar a adequação do ajuste realizado (8)(18)(19)(20).

2.1.2 **Análise de resultados para a determinação da MCCEO**

Caso o ensaio tenha incluído repetições dos tanques para todas as concentrações, a estimativa da MCCEO pode basear-se numa análise de variância (ANOVA) da taxa específica de crescimento média dos tanques (ver ponto 2.1), seguida da aplicação de um método apropriado de comparação entre o r médio para cada concentração e o r médio dos controlos [por exemplo, o teste de Dunnett ou o teste de Williams (12)(13)(14)(21)], a fim de identificar a menor concentração para a qual a diferença entre os dois valores é significativa a uma probabilidade de 0,05. Se não se verificarem os requisitos exigidos pelos métodos paramétricos – distribuição não normal (teste de Shapiro-Wilk, por exemplo) ou variância heterogénea (teste de Bartlett) -, poderá ser equacionada a transformação dos dados de forma a homogeneizar as variâncias antes de efectuar a ANOVA. Em alternativa, poderá realizar-se uma ANOVA ponderada.

Na ausência de repetições dos tanques para cada concentração, uma ANOVA com base em dados de tanques será insensível ou impossível. Nestes casos, um compromisso aceitável será a realização da ANOVA com base nos valores individuais da taxa pseudo-específica de crescimento r_3 .

O valor médio de r_3 para cada concentração de ensaio poderá depois ser comparado com o valor médio de r_3 para os controlos, podendo a MCCEO ser determinada de acordo com o procedimento acima descrito. Importa salientar que este método não tem em conta a variabilidade entre tanques, para além da que é devida à variabilidade entre indivíduos. No entanto, os resultados de um estudo publicado (8) demonstraram que a variabilidade entre tanques era muito pequena quando comparada com a variabilidade em cada tanque (ou seja, entre os peixes de um tanque). Se a análise não considerar os peixes de forma individual, deverá ser indicado o método de identificação de aberrações, bem como uma justificação para a sua utilização.

2.2 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser interpretados com precaução quando as concentrações tóxicas medidas nas soluções de ensaio ocorrem em níveis perto do limite de detecção do método analítico. A interpretação dos resultados de ensaios semiestáticos, em que a concentração da substância de ensaio diminui entre o momento em que a solução é preparada e a renovação, deve igualmente ser efectuada com precaução.

2.3 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.3.1 **Substância de ensaio:**

- natureza física e propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância de ensaio, quando apropriado.

2.3.2 **Espécie de ensaio:**

- nome científico, se possível;
- estirpe, dimensões, fornecedor, tratamentos prévios, etc.

2.3.3 **Condições de ensaio:**

- procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, semiestático/renovação, por escoamento, carga, densidade de ocupação, etc.);
- planeamento do ensaio (por exemplo, o número de recipientes de ensaio, concentrações de ensaio e repetições, número de peixes por recipiente);
- método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (quando utilizados, o agente solubilizante e a sua concentração devem ser indicados);
- valores nominais das concentrações de ensaio, médias dos valores medidos nos recipientes de ensaio e respectivos desvios-padrão, bem como o método através do qual estes foram obtidos; devem ainda ser fornecidas provas de que as medições se referem às concentrações da substância de ensaio em verdadeira solução;
- características da água de diluição: pH, dureza, alcalinidade, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade do meio de ensaio (caso tenha sido medida) e quaisquer outras medições efectuadas;
- qualidade da água dentro dos recipientes de ensaio: pH, dureza, temperatura e concentração do oxigénio dissolvido;
- informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimento(s), proveniência, quantidade fornecida e frequência de administração).

2.3.4 **Resultados:**

- prova de que os controlos satisfazem os critérios de validade relativos à sobrevivência, bem como dados sobre a mortalidade observada em qualquer uma das concentrações ensaiadas;
- métodos de análise estatística utilizados, dados usados na análise estatística (repetições ou peixes), tratamento dos dados e justificação das técnicas usadas;
- tabelas contendo os dados relativos aos pesos individuais e médios dos peixes nos dias 0, 14 (caso tenham sido medidos) e 28, bem como os valores das taxas de crescimento médias por tanque ou pseudo-específicas (conforme seja apropriado) referentes aos períodos “dia 0-dia 28”, ou, se possível, “dia 0-dia 14” e “dia 14-dia 28”;
- resultados da análise estatística (isto é, análise de regressão ou ANOVA), apresentados, de preferência, em tabelas de forma gráfica, bem como a MCCEO ($p = 0,05$) e a CSEO ou a CE_x; sempre que possível e apropriado, deverão indicar-se os erros-padrão;
- incidência de quaisquer reacções involgares manifestadas pelos peixes e de quaisquer efeitos visíveis produzidos pela substância de ensaio.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Solbe, J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley, S., Mallett, M.J. e Grandy, N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland, N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, **14**, pp. 1855-1870.
- (4) Nagel, R., Bresh, H., Caspers, N., Hansen, P.D., Market, M., Munk, R., Scholz, N. e Höfte, B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, **21**, pp.157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tóquio, Japão.
- (6) Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. e Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* **28**, pp. 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. e Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (8) Stephan, C.E. e Rogers, J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, pp. 328-338. Organizado por. R.C. Bahner e D.J. Hansen, American Society for Testing and Materials, Filadélfia.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontário, Report EPS 1/RM/28, 81 páginas.
- (10) Cox, D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (11) Pack, S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, Reino Unido, 10 a 12 de Dezembro de 1991.
- (12) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.* **50**, pp.1096-1121.
- (13) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* **20**, pp.482-491.
- (14) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* **27**, pp.103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L. e Glanville, N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* **120**, pp.123-133.

- (16) Quinton, J.C. e Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology* 37, pp.33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. *In* *Testbook of Fish Health*, Cap. IX, 288 páginas. T.F.H. Publications, Inc, Neptune City, Nova Jérсія, EUA.
- (18) Bruce, R.D. e Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, pp.1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. e McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, Califórnia.
- (20) Norbert-King, T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center, Setembro de 1988, 12 páginas.
- (21) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* **28**, pp. 510-531.

ANEXO 1

ESPÉCIES DE PEIXES RECOMENDADAS PARA ENSAIO E CONDIÇÕES DE ENSAIO APROPRIADAS

ESPÉCIE	Gama de temperaturas recomendada (°C)	Fotoperíodo (horas)	Gama de pesos iniciais dos peixes recomendada (g)	Precisão de medição exigida	Taxa de carga (g/l)	Densidade de ocupação (por litro)	Alimentação	Duração do ensaio (dias)
Espécie recomendada:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truta arco-íris	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	100 mg	1,2 – 2,0	4	Alimento seco (comercial), preparado a partir de salmonídeos jovens	≥ 28
Outras espécies sobre as quais existe documentação:								
<i>Danio rerio</i> Peixe-zebra	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	Alimento vivo (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Peixinho dos arrozais	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	Alimento vivo (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)	≥ 28

ANEXO 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÕES
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amónia não-ionizada	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

ANEXO 3

SÉRIES LOGARÍTMICAS DE CONCENTRAÇÕES APROPRIADAS PARA ENSAIO DE TOXICIDADE (9)

Coluna (número de concentrações entre 100 e 10 ou entre 10 e 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Pode escolher-se uma série de cinco (ou mais) concentrações sucessivas de uma coluna. Os pontos intermédios entre as concentrações de uma coluna (x) encontram-se na coluna (2x + 1). Os valores listados podem representar concentrações expressas em percentagem por volume ou peso (mg/l ou µg/l). Os valores podem ser multiplicados ou divididos por qualquer potência de 10, conforme seja apropriado. Caso exista uma incerteza considerável relativamente ao nível de toxicidade, pode usar-se a coluna 1.

C.15. ENSAIO DE TOXICIDADE DE CURTO PRAZO NOS PEIXES EM ESTÁDIO EMBRIONÁRIO E RECÉM-NASCIDOS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade de curto prazo baseia-se na publicação OECD TG 212 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade a curto prazo nos peixes em estágio embrionário e recém-nascidos é um ensaio de curto prazo, em que se testa a exposição em todas as fases do ciclo de vida desde o ovo recém-fertilizado até ao fim da fase de recém-nascido. Uma vez que, neste ensaio, não é fornecido qualquer alimento aos embriões e peixes recém-nascidos, o ensaio deve ser finalizado enquanto os peixes recém-nascidos ainda se alimentam a partir do saco vitelino.

Este ensaio destina-se a definir os efeitos letais e, até certo ponto, subletais de determinados produtos químicos nos estádios e espécies ensaiados. A informação obtida será útil na medida em que permite (a) estabelecer uma ligação entre os ensaios letais e subletais, (b) ser utilizado como um ensaio de despiste tanto para um ensaio relativo às primeiras fases de vida como para ensaios de toxicidade crónica e (c) ser utilizado para ensaios em espécies para as quais as técnicas de criação não estejam suficientemente avançadas de modo a abrangerem o período de mudança da alimentação endógena para a exógena.

Importa ter presente que, de um modo geral, só os ensaios que abrangem todos os estádios do ciclo de vida dos peixes são susceptíveis de proporcionar uma estimativa exacta da toxicidade crónica dos produtos químicos para estes animais e que a redução da exposição em qualquer estágio pode reduzir a sensibilidade e, por conseguinte, subestimar a toxicidade crónica. É então de esperar que os ensaios em embriões e peixes recém-nascidos sejam menos sensíveis que um ensaio que englobe todas as fases iniciais de vida, particularmente no respeitante a produtos químicos com elevada lipofilicidade ($\log P_{ow} > 4$) e produtos químicos com um mecanismo específico de acção tóxica. No entanto, para produtos químicos com um mecanismo de acção narcótico não-específico, esperam-se menores diferenças entre os dois ensaios em termos de sensibilidade (1).

Antes da publicação deste ensaio, a maior parte das experiências com embriões e peixes recém-nascidos foram realizadas com o peixe de água doce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae; nome comum peixe-zebra). Por esta razão, é fornecida no Anexo 1 uma orientação mais pormenorizada sobre o ensaio com esta espécie, o que não exclui a utilização de outras espécies ensaiadas e relativamente às quais existem obras de referência (Quadro 1).

1.2 DEFINIÇÕES

Menor concentração com efeito observável (LOEC): é a menor concentração de ensaio da substância a ensaiar para a qual se observa um efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a NOEC.

Concentração sem efeito observável (NOEC): é a concentração de ensaio cujo valor se situa imediatamente abaixo do valor da LOEC.

1.3 PRINCÍPIO DO ENSAIO

Os peixes em estágio embrionário e recém-nascidos são expostos a uma gama de concentrações da substância de ensaio dissolvida em água. No âmbito do protocolo, é possível escolher entre um método semiestático e um método por escoamento. A escolha depende da natureza da substância de ensaio. O ensaio inicia-se colocando ovos fertilizados nas câmaras de ensaio e termina imediatamente antes de o saco vitelino de qualquer larva em qualquer das câmaras de ensaio ter sido completamente absorvido ou antes de ocorrer mortalidade nos controlos por falta de alimento. Os efeitos letais e subletais são avaliados e comparados com os valores de controlo de modo a determinar a menor concentração com efeito observável e, a partir daí, a concentração sem efeito observável. Em alternativa, podem ser analisados utilizando um modelo de regressão para estimar a concentração que provocaria uma dada percentagem de efeito (isto é a CL/CE_x, em que x é uma % de efeito definido).

1.4 INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver Método C. 1) realizado de preferência com a espécie escolhida para este ensaio. Os resultados podem ser úteis para a selecção de uma gama apropriada das concentrações a testar no ensaio sobre as fases iniciais de vida. A solubilidade em água (incluindo a solubilidade na água do ensaio) e a pressão de vapor da substância de ensaio devem ser conhecidas. Deve ser possível utilizar um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções a ensaiar, relativamente ao qual a exactidão e o limite de detecção sejam conhecidos e se encontrem descritos.

A fórmula estrutural da substância de ensaio, o seu grau de pureza, estabilidade à luz, estabilidade nas condições do ensaio, pK_a, P_{ow} e os resultados de um ensaio para a biodegradabilidade “fácil” são informações úteis para o planeamento do ensaio (ver Método C. 4).

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando são cumpridas as seguintes condições:

- O número total de ovos fertilizados vivos no grupo de controlo e, quando aplicável, nos recipientes controlo para o solvente, deve ser igual ou superior aos limites definidos nos Anexos 2 e 3;
- a concentração do oxigénio dissolvido deve situar-se entre 60 e 100 % do valor da saturação com o ar (VSA) ao longo de todo o ensaio;
- a temperatura da água não deve variar mais do que $\pm 1,5$ °C entre as diferentes câmaras de ensaio ou entre dias sucessivos, em qualquer momento do ensaio, devendo ainda situar-se na gama de temperaturas especificada para as espécies a ensaiar (Anexos 2 e 3).

1.6 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1 Câmaras de ensaio

Podem ser utilizados quaisquer recipientes de vidro ou outros recipientes em material quimicamente inerte. A dimensão dos recipientes deve ser suficiente para permitir cumprir os requisitos relativos à carga (ver ponto 1.7.1.2). Recomenda-se que as câmaras de ensaio sejam posicionadas de forma aleatória na área de ensaio. Quando em presença de efeitos sistemáticos no laboratório que possam ser controlados mediante a disposição por agrupamento, é preferível aplicar um esquema aleatório de disposição por agrupamento, com cada tratamento está presente em cada grupo, do que um esquema totalmente aleatório. A disposição das câmaras de ensaio por agrupamento, se utilizada, deve ser tomada em consideração na posterior análise de dados. As câmaras de ensaio devem estar protegidas contra perturbações indesejáveis.

1.6.2 **Seleção das espécies de peixes**

As espécies de peixes recomendadas encontram-se indicadas no Quadro 1A. Poderão ser utilizadas outras espécies (exemplos no Quadro 1B), mas o método de ensaio poderá ter de ser adaptado de modo a proporcionar condições de ensaio adequadas. Neste caso, o critério para a selecção das espécies e o método experimental deverão ser indicados no relatório.

1.6.3 **Confinação da descendência dos peixes**

Poderão ser encontradas indicações úteis sobre a confinção dos alevins em condições adequadas no OECD TG 210¹ e nas referências bibliográficas 2, 3, 4, 5 e 6.

1.6.4 **Manuseamento de embriões e larvas**

Dentro do recipiente principal, os embriões e as larvas podem ser colocados em recipientes menores com as partes laterais ou extremidades em rede, de modo a permitir um fluxo da solução de ensaio através do recipiente. Uma forma de provocar o fluxo, sem turbulência, consiste em pendurar estes pequenos recipientes num "braço" que se movimenta para cima e para baixo, desde que os organismos sejam mantidos sempre submersos. Poderá também utilizar-se um sistema de fluxo por efeito de sifão. Os ovos fertilizados de peixes salmonídeos podem ser colocados em suportes ou redes com orifícios suficientemente largos para permitir que as larvas saiam após a eclosão. Nos ensaios semiestáticos com renovação diária total, a remoção dos embriões e das larvas poderá ser feita de forma apropriada utilizando pipetas Pasteur (ver ponto 1.6.6)

Quando se utilizam recipientes de ovos, grades ou redes para confinar os ovos no recipiente principal de ensaio, estas vedações devem ser removidas após a eclosão¹ das larvas, com excepção das redes, que devem ser mantidas para evitar que os peixes escapem. Se houver necessidade de transferir as larvas, estas não devem ser expostas ao ar e não se devem utilizar redes para soltar os peixes dos recipientes de ovos (tal precaução pode não ser necessária para algumas espécies menos frágeis, como a carpa, por exemplo). O momento adequado para efectuar esta transferência varia em função das espécies utilizadas, havendo casos em que a transferência poderá não ser necessária. Para o método semiestático, podem ser utilizados copos ou recipientes pouco fundos e, se necessário, equipados com uma peneira de rede ligeiramente elevada acima do fundo do copo. Se o volume destes recipientes for suficiente para obedecer aos requisitos de carga, poderá não ser necessário efectuar a transferência de embriões ou larvas (ver ponto 1.7.1.2).

1.6.5 **Água**

Qualquer água é adequada como água de ensaio, desde que esteja em conformidade com as características químicas de uma água de diluição aceitável, como indicado no Anexo 4, e desde que a taxa de sobrevivência das espécies a ensaiar seja, nos controlos, pelo menos tão satisfatória como a descrita nos Anexos 2 e 3. A qualidade de água deve ser mantida constante durante o decorrer do ensaio. A variação do valor de pH não deverá ser superior a $\pm 0,5$ unidades. De modo a assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado do ensaio (por complexação da substância de ensaio, por exemplo) ou afecte de forma desfavorável o desempenho do lote de descendentes, deverão ser retiradas amostras regularmente para análise. Devem efectuar-se medições de metais pesados (por exemplo Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), aniões e catiões principais (por exemplo Ca, Mg, Na, K, Cl e SO₄), pesticidas (por exemplo pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão, por exemplo, de três em três meses nos casos em que se sabe que a água de diluição mantém uma qualidade relativamente constante. Se se demonstrar que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo).

¹ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

1.6.6 Soluções de ensaio

As soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição da solução de reserva.

A solução de reserva deve ser preparada, preferencialmente, apenas por mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e dispersão ultrasônica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter uma solução de reserva concentrada adequada. Deve evitar-se, tanto quanto possível, a utilização de solventes ou dispersantes (agentes solubilizantes). No entanto, tais compostos podem ser necessários, em alguns casos, para produzir uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol são exemplos de solventes adequados. Dispersantes adequados são, por exemplo, o Cremofor RH40, o Tween 80, a metilcelulose 0,01 % e o HCO-40. Deve ter-se cuidado ao utilizar agentes facilmente biodegradáveis (como a acetona, por exemplo) e/ou altamente voláteis, uma vez que estes podem causar problemas com o desenvolvimento de bactérias nos ensaios em que for utilizado o método de escoamento. Quando se utiliza um agente solubilizante, este não deve ter um efeito significativo na sobrevivência, nem um efeito adverso observável nas fases iniciais de vida, de acordo com o controle em presença apenas do solvente. No entanto, como se referiu acima, devem fazer-se todos os esforços para evitar utilizar tais produtos.

Para o método semiestático, podem seguir-se dois procedimentos de renovação diferentes: (i) podem preparar-se novas soluções de ensaio em recipientes limpos e transferir suavemente os ovos e larvas sobreviventes para estes recipientes, num pequeno volume da solução velha e evitando a exposição ao ar, ou (ii) podem manter-se os organismos a ensaiar nos recipientes enquanto uma proporção da água de ensaio (pelo menos três quartos) é mudada. A frequência de renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio, mas recomenda-se uma renovação diária da água. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4), se demonstrar que a concentração da substância de ensaio não é estável (isto é, se estiver fora da gama de 80 - 120 % do valor nominal ou for inferior a 80 % da concentração medida inicialmente) durante o período de renovação, deve considerar-se a utilização de um ensaio por escoamento. Em qualquer dos casos, deve ter-se cuidado para evitar a perturbação das larvas durante a operação de renovação da água.

Para os ensaios por escoamento, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente a solução de reserva da substância de ensaio (uma bomba de medição, um diluidor proporcional, um sistema saturador, por exemplo), por forma a fornecer uma série de concentrações às câmaras de ensaio. As taxas de fluxo das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificadas a intervalos regulares, de preferência diariamente, e não devem variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Considera-se adequada uma taxa de fluxo equivalente a, pelo menos, o volume de cinco câmaras de ensaio em 24 horas (2).

1.7 PROCEDIMENTO

Existem trabalhos publicados que contêm informações úteis sobre a realização de ensaios de toxicidade em embriões de peixe e peixes recém-nascidos, dos quais alguns são indicados na bibliografia apresentada no final (7, 8 e 9).

1.7.1 Condições de exposição

1.7.1.1 Duração

O ensaio deve iniciar-se de preferência 30 minutos após a fertilização dos ovos. Os embriões são imersos na solução de ensaio antes ou o mais cedo possível depois do início da fase de segmentação discoidal mas, de qualquer forma, sempre antes do início da fase de gástrula. Nos casos em que os ovos utilizados forem obtidos através de um fornecedor comercial, poderá não ser possível iniciar o ensaio imediatamente após a fertilização. O ensaio deve iniciar-se nas 8 horas subsequentes à fertilização, porque qualquer atraso pode influenciar significativamente a sensibilidade. Uma vez que as larvas não são alimentadas durante o período de exposição, o ensaio deve terminar imediatamente antes que o saco vitelino de qualquer larva em qualquer das câmaras de ensaio tenha sido completamente absorvido ou antes que se registre mortalidade por falta de alimento. O tempo de exposição dependerá da espécie utilizada. Nos Anexos 2 e 3, apresentam-se algumas recomendações relativas ao período de exposição.

1.7.1.2 *Carga*

O número de ovos fertilizados no início do ensaio deverá ser suficiente para permitir o cumprimento dos requisitos estatísticos. Os ovos devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento e, pelo menos, 30 ovos fertilizados deverão ser repartidos de forma equitativa (ou da forma mais equitativa possível, uma vez que é difícil obter lotes iguais quando se utilizam algumas espécies) pelo menos por três câmaras de ensaio (repetições) para cada concentração. A taxa de carga (biomassa por volume de solução de ensaio) deve ser suficientemente pequena para permitir manter uma concentração de oxigénio dissolvido de pelo menos 60 % VSA sem arejamento. Para os ensaios por escoamento, foi recomendada uma taxa de carga que nunca deverá exceder 0,5 g/l em 24 horas, nem 5 g/l de solução (2).

1.7.1.3 *Luz e temperatura*

O fotoperíodo e a temperatura da água do ensaio devem ser apropriados para a espécie a ensaiar (Anexos 2 e 3). Poderá ser apropriado utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

1.7.2 **Concentrações de ensaio**

Normalmente, deverão ser utilizadas cinco concentrações da substância de ensaio espaçadas por um factor constante não superior a 3,2. Na escolha da gama de concentrações do ensaio, deve considerar-se a curva que relaciona a CL50 com o período de exposição no estudo de toxicidade aguda. Nalgumas circunstâncias, poderá ser apropriado utilizar menos de cinco concentrações (em testes-limite por exemplo) e um intervalo de concentração mais estreito. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizam menos de cinco concentrações. As concentrações da substância superiores ao valor CL50 após 96 horas ou a 100 mg/l (a mais reduzida das duas), não necessitam de ser ensaiadas. As substâncias não devem ser ensaiadas acima do seu limite de solubilidade na água de ensaio.

Quando se utiliza um agente solubilizante para facilitar a preparação de soluções de ensaio (ver ponto 1.6.6), a sua concentração final nos recipientes de ensaio não deve ser superior a 0,1 ml/l e deve ser a mesma em todos os recipientes de ensaio.

1.7.3 **Controlos**

Além dos ensaios principais, devem ser utilizados um controlo da água destilada (com as repetições apropriadas) e, se relevante, um controlo contendo o agente solubilizante (com as repetições apropriadas).

1.7.4 **Frequência das determinações analíticas e medições**

Durante o ensaio, as concentrações da substância de ensaio deverão ser determinadas a intervalos regulares.

No ensaio semiestático, em que se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de um intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal (isto é dentro da gama 80 - 120 %; ver ponto 1.4 e 1.6.6), recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor concentrações de ensaio sejam analisadas quando acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação em, pelo menos, três ocasiões a intervalos regulares durante o ensaio (isto é as análises devem ser realizadas numa amostra da mesma solução – quando esta acaba de ser preparada e no momento da renovação).

Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal (com base nos dados de estabilidade da substância), é necessário analisar todas as concentrações de ensaio, logo após a sua preparação e antes da renovação, mas seguindo o mesmo regime (isto é, em pelo menos três ocasiões a intervalos regulares durante o ensaio). A determinação das concentrações da substância de ensaio antes da renovação só necessita de ser realizada numa das repetições para cada concentração de ensaio. O intervalo entre as determinações não deve exceder sete dias. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, os resultados podem basear-se em valores nominais ou valores iniciais medidos, se existirem provas de que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve no intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida durante o ensaio.

Para os ensaios por escoamento, é apropriado um regime de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semiestáticos (embora a medição das soluções “usadas” não seja aplicável neste caso). No entanto, se o ensaio se prolongar por mais de sete dias, poderá ser aconselhável aumentar o número de amostras analisadas durante a primeira semana (efectuando três conjuntos de medições, por exemplo) de forma a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis.

As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando um poro com 0,45 µm de tamanho, por exemplo). No entanto, como nem sempre a centrifugação ou a filtração separam a fracção não-biodisponível da fracção biodisponível da substância de ensaio, as amostras poderão não ser sujeitas a estes tratamentos.

Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em todos os recipientes de ensaio. A dureza total e a salinidade (se relevante) devem ser medidas nos controlos e num recipiente com a concentração mais elevada. O oxigénio dissolvido e a salinidade (se relevante) devem ser medidos, no mínimo, três vezes (no início, a meio e no fim do ensaio). Nos ensaios semiestáticos, recomenda-se que o oxigénio dissolvido seja medido com maior frequência, de preferência antes e após cada renovação da água ou, pelo menos, uma vez por semana. O pH deve ser medido no início e no fim de cada renovação da água nos ensaios semiestáticos e, pelo menos, semanalmente nos ensaios por escoamento. A dureza deve ser medida uma vez em cada ensaio. A temperatura deve ser medida diariamente e, de preferência, monitorizada continuamente pelo menos num recipiente de ensaio.

1.7.5 **Observações**

1.7.5.1 *Estádio de desenvolvimento embrionário*

O estágio embrionário (isto é, o estágio de gástrula) no início da exposição à substância de ensaio deve ser verificado de forma tão precisa quanto possível. Poder-se-á utilizar para o efeito uma amostra representativa dos ovos adequadamente conservados e limpos. A bibliografia apresentada no final poderá também ser consultada para a descrição e ilustração dos estádios embrionários (2, 5, 10 e 11).

1.7.5.2 *Eclusão e sobrevivência*

A eclusão e a sobrevivência deverão ser observadas e registadas, pelo menos diariamente. No início do ensaio, poderá ser útil efectuar observações mais frequentes (de 30 em 30 minutos durante as primeiras três horas, por exemplo), uma vez que, em alguns casos, o período de sobrevivência pode ser mais relevante do que apenas o número de mortes (quando existem efeitos tóxicos agudos, por exemplo). Os embriões e as larvas mortos devem ser retirados logo após a sua observação, uma vez que podem decompor-se rapidamente. A remoção dos indivíduos mortos deverá ser extremamente cuidadosa, de forma a não provocar danos físicos nos ovos/larvas vizinhos, já que estes são extremamente frágeis e sensíveis. Os critérios de morte variam de acordo com o estágio de vida:

- **para os ovos:** particularmente nos estádios iniciais, uma acentuada perda de translucidez e alteração na coloração, causada por coagulação e/ou precipitação de proteína e conduzindo a um aspecto branco opaco;
- **para os embriões:** ausência de movimento e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou descoloração opaca nas espécies com embriões normalmente translúcidos;
- **para as larvas:** imobilidade e/ou ausência de movimentos respiratórios e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou coloração branca opaca do sistema nervoso central e/ou falta de reacção a estímulos mecânicos.

1.7.5.3 *Aspecto anómalo*

O número de larvas que apresentam uma forma corporal e/ou uma pigmentação anómalos, assim como o estado de absorção do saco vitelino deverão ser registados a intervalos de tempo adequados em função da duração do ensaio e da natureza da anomalia descrita. É importante notar que o aparecimento de embriões e larvas com anomalias é um fenómeno que ocorre naturalmente, podendo nalgumas espécies, afectar uma percentagem significativa do(s) controlo(s). Os animais que apresentem um aspecto anómalo só devem ser retirados dos recipientes de ensaio quando estiverem mortos.

1.7.5.4 *Comportamento anómalo*

Anomalias tais como a hiperventilação, as alterações no comportamento natatório e o estado de passividade anormal, deverão ser registadas a intervalos de tempo adequados, em função da duração do ensaio. Embora estes efeitos sejam difíceis de quantificar, a sua observação pode ajudar na interpretação dos dados relativos à mortalidade, isto é, podem fornecer informação sobre o mecanismo de acção tóxica da substância.

1.7.5.5 *Comprimento*

Recomenda-se que, no fim do ensaio, se proceda à medição do comprimento de cada indivíduo. Os comprimentos a medir poderão ser o normalizado, o comprimento até à extremidade da barbatana caudal ou o comprimento total. Se, no entanto, as barbatanas caudais dos peixes apresentarem sinais de apodrecimento ou erosão, o comprimento a medir será o normalizado. Normalmente, num ensaio bem realizado o coeficiente de variação de comprimento entre as repetições dos controlos deve ser $\leq 20\%$.

1.7.5.6 *Peso*

No fim do ensaio, os indivíduos poderão ser pesados separadamente, sendo preferível o peso seco (24 horas a 60°C) ao peso fresco (seco com papel absorvente). Normalmente, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação de peso entre as repetições dos controlos deve ser $\leq 20\%$.

A partir destas observações, deverão ser elaborados todos ou parte dos seguintes dados, que serão objecto de análise estatística:

- mortalidade acumulada;
- números de larvas saudáveis no fim do ensaio;
- início e fim do período de eclosão (isto é 90 % de eclosão em cada repetição);
- números de larvas eclodidas por dia;
- comprimento (e peso) dos animais sobreviventes no fim do ensaio;
- números de larvas que apresentam deformações ou um aspecto anómalo;
- números de larvas que apresentam um comportamento anómalo.

2. DADOS E RELATÓRIO

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que um técnico estatístico participe tanto no planeamento como na análise do ensaio, uma vez que o método permite variações consideráveis no planeamento experimental no que se refere, por exemplo, ao número de câmaras de ensaio, ao número de concentrações de ensaio, ao número inicial de ovos fertilizados e aos parâmetros medidos. Devido às inúmeras opções disponíveis quanto ao planeamento do ensaio, não se fornece qualquer orientação específica relativamente aos procedimentos estatísticos.

Se se pretender determinar a LOEC/NOEC, será necessário analisar as variações dentro de cada conjunto de repetições, utilizando uma análise de variância (ANOVA) ou procedimentos de tabelas de contingência. O método de Dunnett (12 e 13) pode ser útil para efectuar uma comparação múltipla entre os resultados das concentrações individuais e os dos controlos. Existem igualmente outros exemplos úteis (14 e 15). A dimensão do efeito detectável utilizando o método ANOVA ou outros procedimentos (isto é a capacidade do ensaio) deverá ser calculada e descrita. Importa salientar que nem todas as observações descritas no ponto 1.7.5.6 são adequadas para a análise estatística utilizando a ANOVA. A mortalidade acumulada e os números de larvas saudáveis no fim do ensaio podem ser analisados utilizando métodos proibit, por exemplo.

Se se pretender determinar os valores CL/CE_x, a(s) curva(s) adequada(s), como a curva logística, deve(m) ser ajustada(s) aos dados relevantes utilizando um método estatístico (como o método dos mínimos quadrados ou dos mínimos quadrados não-linear). A(s) curva(s) deve(m) ser parametrizada(s) de modo a que os valores CL/CE_x de interesse e o seu desvio-padrão possam ser estimados directamente. Isto facilitará enormemente o cálculo dos limites de confiança em volta dos valores CL/CE_x. A não ser que haja boas razões para preferir limites de confiança diferentes, devem ser utilizados limites de confiança de mais ou menos 95 %. O procedimento de ajuste deve, preferencialmente, permitir avaliar a significância da falta de ajuste. Podem utilizar-se métodos gráficos de ajuste de curvas. A análise de regressão é adequada para todas as observações descritas no ponto 1.7.5.6.

2.2 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser interpretados com precaução quando as concentrações tóxicas medidas nas soluções de ensaio ocorrem em níveis situados perto do limite de detecção do método analítico. A interpretação dos resultados para concentrações superiores ao limite de solubilidade da substância na água deve igualmente ser efectuada com precaução,.

2.3 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.3.1 Substância de ensaio:

- Natureza física e propriedades físico-químicas relevantes;
- Dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico para a quantificação das substâncias de ensaio, quando apropriado.

2.3.2 Espécie de ensaio:

- Nome científico, estirpe, número de peixes progenitores (isto é número de fêmeas utilizadas para fornecer o número de ovos necessários ao ensaio), fonte e método de recolha dos ovos fertilizados e posterior manuseamento.

2.3.3

Condições de ensaio:

- o procedimento de ensaio utilizado (semiestático ou por escoamento, período de tempo desde a fertilização até ao início do ensaio, carga, etc.);
- o(s) fotoperíodo(s);
- o planeamento do ensaio (por exemplo, o número de câmaras de ensaio e repetições, o número de embriões por repetição);
- o método de preparação das soluções de reserva e a frequência de renovação (quando utilizados, o agente solubilizante e a sua concentração devem ser indicados);
- os valores nominais das concentrações de ensaio, os valores medidos, as suas médias e os respectivos desvios-padrão nos recipientes de ensaio, o método através do qual estes foram obtidos e, se a substância de ensaio for solúvel na água em concentrações inferiores às ensaiadas, as provas de que as medições se referem às concentrações da substância de ensaio na solução;
- características da água de diluição: o pH, a dureza, a temperatura, a concentração do oxigénio dissolvido, os níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), o carbono orgânico total, os sólidos em suspensão, a salinidade do meio de ensaio (caso tenha sido medida) e quaisquer outras medições efectuadas;
- a qualidade da água dentro dos recipientes de ensaio: o pH, a dureza, a temperatura e a concentração do oxigénio dissolvido.

2.3.4

Resultados:

- resultados de qualquer estudo preliminar sobre a estabilidade da substância de ensaio;
- prova de que os controlos estão de acordo com o padrão de aceitação de sobrevivência total da espécie de ensaio (Anexos 2 e 3);
- dados sobre a mortalidade/sobrevivência nos estádios embrionário e larvar e sobre a mortalidade/sobrevivência total;
- dias até à eclosão e número de eclosões;
- dados sobre o comprimento (e peso);
- incidência e descrição de anomalias morfológicas, caso tenham sido observadas;
- incidência e descrição de efeitos comportamentais, caso tenham sido observados;
- análise estatística e tratamento de dados;
- para ensaios analisados utilizando o método ANOVA, a menor concentração com efeito observável (LOEC) a $p = 0,05$ e a concentração sem efeito observável (NOEC) para cada resposta avaliada, incluindo uma descrição dos procedimentos estatísticos utilizados e uma indicação da dimensão do efeito que pode ser detectado;
- para os ensaios analisados utilizando técnicas de regressão, a CL/CE_x e os intervalos de confiança, bem como o gráfico do modelo ajustado utilizado para o seu cálculo;
- explicação dos motivos para qualquer desvio a este método de ensaio.

REFERÊNCIAS

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. **10**, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, **4**, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, **6**, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry **4**, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, **9**, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, **16**, pp 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 81.

- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, **21**, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, **252**: 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety **32**, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. **10**, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

QUADRO 1A: ESPÉCIES DE PEIXES RECOMENDADAS PARA OS ENSAIOS

ÁGUA DOCE
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truta Arco-íris (9 e 16)
<i>Danio rerio</i> Peixe-Zebra (7, 17 e 18)
<i>Cyprinus caprio</i> Carpa (8 e 19)
<i>Oryzias latipes</i> Peixinho dos arrozais (20 e 21)
<i>Pimephales promelas</i> (8 e 22)

QUADRO 1B: EXEMPLOS DE OUTRAS ESPÉCIES
QUE TAMBÉM JÁ FORAM UTILIZADAS E SOBRE AS QUAIS EXISTE DOCUMENTAÇÃO

ÁGUA DOCE	ÁGUA SALGADA
<i>Carassius auratus</i> Pimpão (8)U	<i>Menidia peninsulae</i> (23, 24 e 25)
<i>Lepomis macrochirus</i> (8)	<i>Clupea harengus</i> Arenque (24 e 25)
	<i>Gadus morhua</i> Bacalhau (24 e 25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> (23, 24 e 25)

ANEXO 1

ORIENTAÇÃO SOBRE A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE TOXICIDADE EM EMBRIÕES E RECÉM-NASCIDOS DE PEIXE-ZEBRA (*Brachydanio rerio*)

INTRODUÇÃO

O peixe-zebra é originário da costa Coromandel, na Índia, onde habita em riachos de correntes rápidas. É um peixe vulgar de aquário da família das carpas, sendo possível encontrar informação acerca dos procedimentos relativos ao seu tratamento e cultura em livros de referência sobre peixes tropicais. A sua biologia e utilização na investigação piscícola foram revistos por Laale (1).

O peixe raramente excede os 45 mm em comprimento. O corpo é cilíndrico com 7 a 9 riscas horizontais azul escuro prateadas. Estas riscas prolongam-se pelas barbatanas ventrais e caudais. A região posterior é verde azeitona. Os machos são mais magros do que as fêmeas. As fêmeas são mais prateadas e o seu abdómen apresenta uma forma dilatada, particularmente antes da desova.

Os peixes adultos toleram grandes variações de temperatura, pH e dureza. No entanto, devem ser criadas condições óptimas para obter peixes saudáveis que produzam ovos de boa qualidade.

Durante a desova o macho persegue e atinge a fêmea, sendo os ovos fertilizados à medida que vão sendo expelidos. Os ovos, que são transparentes e não-aderentes, caem para o fundo onde podem ser comidos pelos progenitores. A desova é influenciada pela luz. Se a luz da manhã for adequada, o peixe geralmente desova nas primeiras horas a seguir ao amanhecer.

Uma fêmea pode produzir semanalmente lotes de várias centenas de ovos.

CONDIÇÕES PARA OS PEIXES PROGENITORES, A REPRODUÇÃO E AS FASES INICIAIS DE VIDA

Seleccionar um número adequado de peixes saudáveis e mantê-los numa água adequada (nas condições descritas no Anexo 4, por exemplo) durante, pelo menos, 2 semanas antes da desova pretendida. Deve permitir-se que o grupo de peixes se reproduza pelo menos uma vez antes de produzir o lote de ovos utilizados no ensaio. A densidade dos peixes durante este período não deve exceder 1 grama por litro. A mudança regular da água ou a utilização de sistemas de purificação permitirão que a densidade seja mais elevada. A temperatura nos tanques de conservação deve ser mantida a 25 ± 2 °C. Deve fornecer-se aos peixes uma dieta variada, que poderá consistir, por exemplo, em alimentos comerciais secos apropriados, larvas vivas recém-eclodidas, *Artemia*, *chironomus*, *Daphnia*, ou *Enchytraeus*.

São indicados em seguida dois procedimentos que, na prática, permitiram obter um lote de ovos fertilizados saudáveis adequado à realização de um ensaio:

- i. Colocam-se oito fêmeas e 16 machos num tanque contendo 50 litros de água de diluição, protegidos da luz directa e mantidos, tanto quanto possível, sem perturbações durante pelo menos 48 horas. Na tarde do dia anterior ao início do ensaio, coloca-se um tabuleiro de desova no fundo do aquário. O tabuleiro de desova consiste numa moldura de "plexi-glass" ou outro material adequado com 5 a 7 cm de altura, com uma rede grosseira de malha de 2 a 5mm presa no topo, e uma rede fina (malha de 10 a 30 µm) no fundo. Prende-se à rede grosseira da estrutura uma série de 'árvores de desova', que consistem em pedaços de corda de nylon desenrolada. Após o peixe ter permanecido num ambiente sem luz durante 12 horas, acende-se uma luz ténue que provocará o início da desova. Duas a quatro horas após a desova, remove-se o tabuleiro e recolhem-se os ovos. O tabuleiro de desova evitará que o peixe coma os ovos e, ao mesmo tempo, permitirá a sua fácil recolha. O grupo de peixes deverá ter desovado pelo menos uma vez antes da desova que originará os ovos a utilizar no ensaio.

- ii. Cinco a 10 peixes machos e fêmeas são mantidos individualmente pelo menos 2 semanas antes da desova pretendida. Após 5 a 10 dias, o abdômen das fêmeas estará distendido e as suas papilas genitais visíveis. Os machos não têm papila. A desova é realizada em tanques de desova equipados com um fundo falso em rede (como descrito anteriormente). Enche-se o tanque com água de diluição, de modo a que a altura da água acima da rede seja de 5 a 10 cm. Colocam-se uma fêmea e dois machos no tanque um dia antes da desova pretendida. Aumenta-se gradualmente a temperatura da água um grau acima da temperatura de aclimatização. Apaga-se a luz e o tanque é mantido com a mínima perturbação possível. De manhã, acende-se uma luz ténue que irá provocar o início da desova. Após 2 a 4 horas, removem-se os peixes e recolhem-se os ovos. Se uma só fêmea não produzir lotes com número suficiente de ovos, podem preparar-se, em paralelo, tantos tanques de desova quantos os necessários. Os registos sobre o nível de reprodução individual das fêmeas antes do ensaio (tamanho do lote e qualidade) poderão servir para seleccionar as fêmeas com maior sucesso reprodutivo.

Os ovos devem ser transferidos para os recipientes de ensaio utilizando tubos de vidro (com um diâmetro interno não inferior a 4 mm) adaptados a uma ampola de sucção flexível. A quantidade de água que acompanha os ovos aquando da sua transferência deverá ser reduzida ao mínimo possível. Os ovos são mais pesados do que a água e afundam-se caindo do tubo. Deve ter-se cuidado para evitar que os ovos (e as larvas) entrem em contacto com o ar. O exame microscópico de amostra(s) do(s) lote(s) deve ser realizado para assegurar que não há irregularidades nos primeiros estádios de desenvolvimento. Não é permitida a desinfecção dos ovos.

A taxa de mortalidade dos ovos é mais elevada durante as primeiras 24 horas após a fertilização, período durante o qual se observa, geralmente, uma taxa de mortalidade de 5 a 40 por cento. Os ovos degeneram em consequência do insucesso da fertilização ou de alteração no desenvolvimento. A qualidade do lote de ovos parece depender do peixe fêmea, uma vez que algumas fêmeas produzem consistentemente ovos de boa qualidade, enquanto que outras nunca o fazem. As taxas de desenvolvimento e de eclosão variam igualmente de lote para lote. Os ovos fertilizados com sucesso e as larvas com saco vitelino sobrevivem bem, normalmente com taxas acima dos 90 por cento. A 25 °C, os ovos eclodirão 3 a 5 dias após a fertilização e o saco vitelino será absorvido cerca de 13 dias após a fertilização.

O desenvolvimento embrionário foi descrito de forma muito completa por Hisaoka e Battle (2). Devido à transparência dos ovos e das larvas pós-eclosão, o desenvolvimento dos peixes pode ser seguido e a presença de malformações observada. Aproximadamente 4 horas após a desova, é possível distinguir os ovos fertilizados dos não fertilizados (3). Para efectuar este exame, os ovos e as larvas são colocados em recipientes de ensaio de pequeno volume e estudados ao microscópio.

As condições de ensaio aplicáveis às fases iniciais de vida encontram-se descritas no Anexo 2. Os valores óptimos para o pH e a dureza da água de diluição são, respectivamente, 7,8 e 250 mg CaCO₃/l.

CÁLCULOS E ESTATÍSTICA

Propõe-se uma abordagem em duas fases. Primeiro, são analisados estatisticamente os dados sobre a mortalidade, o desenvolvimento anómalo e o tempo de eclosão. Depois, para as concentrações em que não se detectaram efeitos adversos em quaisquer destes parâmetros, avalia-se estatisticamente o comprimento do corpo. Aconselha-se esta abordagem, uma vez que o produto tóxico pode matar selectivamente peixes menores, atrasar o tempo de eclosão e induzir malformações graves, conduzindo assim a desvios às medições de comprimento. Além disso, existirão aproximadamente o mesmo número de peixes a medir por tratamento, o que garante a validade da estatística do ensaio.

DETERMINAÇÃO DA CL50 E DA CE₅₀

A percentagem de ovos e de larvas sobreviventes é calculada e corrigida para a mortalidade nos controlos, de acordo com a fórmula de Abbott (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P'}{C}\cdot x100\right)$$

em que,

P = % sobrevivência corrigida
P' = % sobrevivência observada com a concentração de ensaio
C = % sobrevivência no controlo

Se possível, a CL50 deve ser determinada através de um método adequado no fim do ensaio.

Se for desejável incluir as anomalias morfológicas na estatística de CE₅₀, o trabalho de Stephan (5) poderá fornecer orientações úteis.

ESTIMATIVAS DA LOEC E NOEC

Um dos objectivos do ensaio em ovos e peixes recém-nascidos é comparar as concentrações diferentes de zero com o controlo, isto é, determinar a LOEC, pelo que deverão ser utilizados os métodos de comparação múltipla indicados nas obras de referência (6, 7, 8, 9 e 10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. **10**, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., **102**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ANEXO 2
CONDICÕES DE ENSAIO, DURAÇÃO E CRITÉRIO DE SOBREVIVÊNCIA PARA AS ESPÉCIES RECOMENDADAS

ESPÉCIE	TEMP (°C)	SALINIDA DE (0/00)	FOTO- PERÍODO (horas)	DURAÇÃO DOS ESTÁDIOS (dias)		DURAÇÃO TÍPICA DO ENSAIO	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA NOS CONTROLOS, (% MÍNIMA)	
				Embriões	Recém- nascidos		Sucesso da eclosão	Pós-eclosão
ÁGUA DOCE								
<i>Brachydanio rerio</i> Peixe-Zebra	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 5 dias após a eclosão (8-10 dias)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truta Arco-íris	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 20 dias após a eclosão (50-55 dias)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Carpa	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4 dias após a eclosão (8 - 9 dias)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Peixinho dos arrozais	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 5 dias após a eclosão (13 - 16 dias)	80	80
<i>Pimephales promelas</i>	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4 dias após a eclosão (8 - 9 dias)	60	70

⁽¹⁾Para embriões

⁽²⁾Para larvas

^(a)Escurecimento para o embrião e as larvas até uma semana após a eclosão, excepto quando estes estão a ser inspeccionados. A partir daí, deve utilizar-se luz fraca ao longo do ensaio.

ANEXO 3

CONDIÇÕES DE ENSAIO, DURAÇÃO E CRITÉRIOS DE SOBREVIVÊNCIA PARA OUTRAS ESPÉCIES RELATIVAMENTE ÀS QUAIS EXISTEM TRABALHOS DE REFERÊNCIA

ESPÉCIE	TEMP (°C)	SALINIDADE (0/00)	FOTO-PERÍODO (horas)	DURAÇÃO DOS ESTÁDIOS (dias)		DURAÇÃO TÍPICA DO ENSAIO DE EMBRIÕES E RECÉM-NASCIDOS	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA NOS CONTROLOS, (% MINIMA)	
				EMBRIÕES	ENSAIO RECÉM-NASCIDOS		Sucesso da eclosão	Pós-eclosão
ÁGUA DOCE								
<i>Carassius auratus</i> Pimpão	24 ± 1	-	-	3 - 4	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4 dias após a eclosão (7 dias)	-	80
<i>Leopomis macrochirus</i>	21 ± 1	-	16	3	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4 dias após a eclosão (7 dias)	-	75
ÁGUA SALGADA								
<i>Menidia peninsulae</i>	22 - 25	15 - 22	12	1.5	10	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 5 dias após a eclosão (6-7 dias)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Arenque	10 ± 1	8 - 15	12	20 - 25	3 - 5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 3 dias após a eclosão (23-27 dias)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Bacalhau	5 ± 1	5 - 30	12	14 - 16	3 - 5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 3 dias após a eclosão (18 dias)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i>	25 ± 1	15 - 30	12	-	-	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4/7 dias após a eclosão (28 dias)	> 75	80

ANEXO 4

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÕES
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amônia não-ionizada	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenis policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

C.16. ABELHAS DOMÉSTICAS – ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade aguda baseia-se na publicação OECD TG 213 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade constitui um método laboratorial destinado a avaliar a toxicidade oral aguda de produtos fitofarmacêuticos e outras substâncias químicas para as abelhas domésticas obreiras adultas.

Os processos de avaliação e verificação das características tóxicas de substâncias podem exigir a determinação da toxicidade oral aguda para as abelhas domésticas. Esta situação verifica-se, por exemplo, quando há uma probabilidade de exposição de abelhas a um produto químico específico. O ensaio de toxicidade oral aguda permite determinar a toxicidade de pesticidas e outras substâncias químicas para as abelhas. Os seus resultados condicionarão a necessidade de efectuar posteriores avaliações. O método é especialmente adequado para uso em programas passo-a-passo, destinados a avaliar os efeitos perigosos de pesticidas para as abelhas. Estes programas baseiam-se numa progressão sequencial de ensaios de toxicidade, que evolui de ensaios laboratoriais para experiências parciais ou totalmente realizadas no campo (1). Os pesticidas podem ser submetidos a ensaio sob a forma de substâncias activas (S.A.) ou de produtos formulados.

A sensibilidade das abelhas e o rigor do procedimento experimental devem ser verificados pela inclusão de um padrão tóxico nos ensaios.

1.2 DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: conjunto dos efeitos adversos que se manifestam num período máximo de 96 horas após a administração oral de uma dose única da substância de ensaio.

Dose: quantidade consumida da substância de ensaio. A dose é expressa em massa (μg) de substância de ensaio por animal ($\mu\text{g}/\text{abelha}$). O facto de as abelhas serem alimentadas de forma colectiva não permite calcular a dose efectiva por cada animal. No entanto, é possível determinar a dose média (massa total de substância em ensaio consumida/número de abelhas em ensaio em cada gaiola).

DL₅₀ (Dose Letal Média) oral: dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL₅₀ é expresso em μg de substância de ensaio por abelha. Em ensaios de pesticidas, a substância de ensaio pode ser uma substância activa (S.A.) ou um produto formulado, que contém uma ou várias substâncias activas.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece completamente imóvel.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método baseia-se na exposição de abelhas domésticas (*Apis mellifera*) obreiras adultas a uma gama de doses da substância de ensaio dispersa numa solução de sacarose. Após a administração das doses, as abelhas são alimentadas com a mesma solução, sem a substância de ensaio. A mortalidade das abelhas é registada diariamente, num período nunca inferior a 48 horas, sendo depois comparada com valores de controlo. Caso a taxa de mortalidade aumente entre 24 e 48 horas após a administração das doses, mantendo-se a mortalidade dos controlos num nível aceitável (ou seja, $\leq 10\%$), o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas. Os resultados deverão ser analisados de forma a calcular a DL₅₀ às 24 horas e às 48 horas e, em caso de prolongamento do ensaio, às 72 horas e às 96 horas.

1.4 VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido, desde que se verifiquem as seguintes condições:

- a mortalidade média na totalidade dos controlos no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %;
- a DL₅₀ do padrão tóxico deverá enquadrar-se na gama de concentrações especificada.

1.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1 Recolha de abelhas

O ensaio deve ser realizado com obreiras adultas jovens da mesma raça, isto é, abelhas da mesma idade, em idênticas condições de alimentação, etc. As abelhas devem provir de colónias governadas por rainhas, bem alimentadas, saudáveis, tanto quanto possível isentas de doenças e com historial e estado fisiológico conhecidos. As abelhas podem ser recolhidas na manhã do dia do ensaio ou na noite anterior, desde que permaneçam nas condições de ensaio até à realização deste. Consideram-se adequadas para o ensaio as abelhas recolhidas de favos sem postura. Devido ao facto de as abelhas sofrerem alterações fisiológicas no início da Primavera e no final do Outono, deverão evitar-se recolhas durante estes períodos. Caso seja necessário realizar ensaios nestas épocas do ano, podem usar-se abelhas eclodidas numa incubadora e alimentadas com pólen colhido da colmeia e solução de sacarose durante uma semana. As abelhas tratadas com substâncias químicas (tais como antibióticos, produtos varroacidas, etc.) não devem ser usadas em ensaios de toxicidade até quatro semanas após o final do último tratamento.

1.5.2 Condições de alojamento e alimentação

Devem usar-se gaiolas bem ventiladas e fáceis de limpar. As gaiolas podem ser construídas com quaisquer materiais apropriados, tais como aço inoxidável, tela de arame ou plástico. Podem ainda ser usadas gaiolas de madeira descartáveis. Por norma, cada gaiola deverá conter, de preferência, um grupo de dez abelhas. As gaiolas usadas nos ensaios devem possuir dimensões adequadas ao número de abelhas a alojar, de modo a proporcionarem espaço suficiente.

As abelhas devem ser mantidas no escuro, numa sala de ensaios, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A humidade relativa, normalmente de cerca de 50-70 %, deverá ser registada ao longo do ensaio. Os procedimentos de manipulação, incluindo o tratamento e as observações, poderão ser efectuados com iluminação (natural). As abelhas são alimentadas com uma solução aquosa de sacarose a uma concentração de 500 g/l (50 % p/v). Após a administração das doses de ensaio, as abelhas devem dispor de alimento *ad libitum*. Deve usar-se um sistema de alimentação que permita registar a quantidade de alimento consumido em cada gaiola (ver ponto 1.6.3.1). Para tal, pode utilizar-se um tubo de vidro, com cerca de 50 mm de comprimento e 10 mm de largura e a extremidade aberta estreitada para cerca de 2 mm de diâmetro.

1.5.3 Preparação das abelhas

As abelhas recolhidas são distribuídas aleatoriamente por gaiolas de ensaio, as quais, por sua vez, são dispostas ao acaso na sala de ensaios.

Antes do ensaio, as abelhas podem ser privadas de alimento por um período não superior a 2 horas. Este tratamento é recomendável, uma vez que assegura que, no início do ensaio, todas as abelhas se encontram em idênticas condições no que respeita ao conteúdo intestinal. Antes de dar início ao ensaio, as abelhas moribundas devem ser retiradas e substituídas por abelhas saudáveis.

1.5.4 Preparação das doses

Caso a substância a testar seja miscível com água, poderá ser directamente dispersa numa solução de sacarose a 50 %. No caso de produtos industriais e substâncias de baixa solubilidade em água, podem usar-se outros veículos, tais como solventes orgânicos, emulsionantes ou dispersantes de baixa toxicidade para as abelhas (por exemplo, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido). A concentração do veículo depende da solubilidade da substância de ensaio, devendo ser idêntica para todas as concentrações testadas. Na generalidade dos casos, é adequado utilizar (e não ultrapassar) uma concentração de 1 %.

Devem preparar-se as soluções de controlo apropriadas, ou seja, utilizando um solvente ou dispersante para tornar a substância de ensaio solúvel. Assim, deverão ser administradas, a dois grupos de controlo distintos, duas soluções: uma em água e outra em água com sacarose, ambas contendo o solvente/veículo na mesma concentração que as soluções de dosagem.

1.6 PROCEDIMENTO

1.6.1 Grupos de ensaio e de controlo

O número de doses e de repetições usado no ensaio deverá satisfazer os requisitos estatísticos para a determinação das DL_{50} , com limites de confiança de 95 %. De uma forma geral, é necessário usar cinco doses em série geométrica, com um factor não superior a 2,2 e cobrindo uma gama de concentrações que abranja a DL_{50} . No entanto, o factor de diluição e o número de concentrações por dosagem deverão ser determinados em função do declive da curva de toxicidade (dose *versus* mortalidade) e tomando em consideração o método estatístico adoptado para a análise dos resultados. Um ensaio de determinação de gama de concentrações permitirá escolher as concentrações apropriadas para a dosagem.

Cada concentração a testar deve ser aplicada em, pelo menos, três grupos idênticos, cada um constituído por dez abelhas. Além da série em ensaio, devem ser testados pelo menos três grupos de controlo, formados por 10 abelhas cada um. Devem ainda ser incluídos os grupos de controlo apropriados para os solventes/veículos usados (ver ponto 1.5.4).

1.6.2 Padrão tóxico

A série em ensaio deve incluir um padrão tóxico. Devem seleccionar-se pelo menos três doses deste padrão, de modo a abranger o valor previsto para a DL_{50} . Para cada dose de ensaio, devem usar-se, pelo menos, três gaiolas idênticas, cada uma contendo dez abelhas. O padrão tóxico mais vulgarmente utilizado é o dimetoato. A DL_{50} oral às 24 horas descrita para este composto situa-se na gama de 0,10 a 0,35 $\mu\text{g S.A./abelha}$ (2). No entanto, podem ser usados outros padrões tóxicos, desde que existam dados suficientes para verificar a resposta prevista à dose administrada (por exemplo, paratião).

1.6.3 Exposição

1.6.3.1 Administração de doses

A cada grupo de abelhas em ensaio, devem ser administrados 100-200 μl de solução aquosa de sacarose a 50 %, contendo a substância de ensaio na concentração apropriada. No ensaio de produtos de baixa solubilidade, toxicidade ou concentração no preparado, será necessário aumentar a proporção dos mesmos na solução de sacarose e utilizar volumes superiores. Deverá controlar-se a quantidade de solução tratada, consumida por cada grupo. Uma vez consumido o alimento tratado (normalmente num período de 3 a 4 horas), o sistema de alimentação deve ser retirado da gaiola e substituído por outro contendo apenas solução de sacarose, a qual deverá ser fornecida então *ad libitum*. Em alguns casos, poderá ocorrer a rejeição das doses correspondentes às concentrações mais elevadas da de ensaio, o que terá como resultado um consumo de alimento reduzido ou nulo. Após um lapso máximo de 6 horas, a solução tratada que não tenha sido consumida deverá ser substituída pela solução de sacarose sem aditivos. Deve avaliar-se a quantidade da solução tratada consumida, medindo, por exemplo, o volume ou o peso da solução não consumida.

1.6.3.2 Duração

O ensaio deverá prolongar-se, de preferência, até 48 horas após a substituição da solução em ensaio pela solução de sacarose sem aditivos. Se, após as primeiras 24 horas, a mortalidade continuar a aumentar em mais de 10 %, o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade nos controlos não exceda 10 %.

1.6.4 Observações

Devem efectuar-se registos de mortalidade decorridas 4 horas, 24 horas e 48 horas após o início do ensaio (ou seja, após a administração da dose). Em caso de prolongamento do período de observação, deverão realizar-se avaliações suplementares a intervalos de 24 horas, até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade dos grupos de controlo não exceda 10 %.

Deverá ser determinada a quantidade de solução consumida por cada grupo. A comparação entre as taxas de consumo de solução tratada e não tratada durante o período de 6 horas em que esta é fornecida aos animais poderá dar informações sobre a palatabilidade do alimento tratado.

Deverão ser objecto de registo todas as eventuais anomalias de comportamento verificadas durante o período do ensaio.

1.6.5 **Teste-limite**

Em determinadas circunstâncias (por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio apresente um baixo nível de toxicidade), pode efectuar-se um teste-limite, usando 100 µg S.A./abelha, de forma a certificar-se de que a DL₅₀ é superior a este valor. Deve seguir-se um procedimento idêntico ao descrito acima, incluindo o uso de três grupos duplicados para a dose de ensaio, a realização dos controlos relevantes e a avaliação da quantidade de alimento tratado consumida, assim como o uso de um padrão tóxico. Se ocorrer mortalidade, deverá realizar-se um estudo completo. Todos os efeitos subletais, caso existam, deverão ser registados (ver ponto 1.6.4).

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1 **DADOS**

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo em tratamento (e para os grupos de controlo e os associados ao padrão tóxico), o número de abelhas usado e a mortalidade em cada momento de observação, bem como o número de abelhas que apresentam um comportamento anómalo. Os dados relativos à mortalidade devem ser analisados mediante métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise *probit*, média móvel, teoria do binómio relativamente à probabilidade) (3 e 4). Devem ser traçadas curvas dose-resposta para cada tempo de observação recomendado, procedendo-se depois ao cálculo dos respectivos declives e à determinação das doses letais médias (DL₅₀) com limites de confiança de 95 %. Podem efectuar-se correcções na mortalidade dos grupos de controlo, usando os valores de correcção de Abbott (4 e 5). Nos casos em que o alimento tratado não tenha sido totalmente consumido, deverá determinar-se a dose de substância de ensaio consumida por cada grupo. A DL₅₀ deverá ser expressa em µg de substância de ensaio por abelha.

2.2 **RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1 **Substância de ensaio:**

- natureza física e propriedades físico-químicas relevantes (por exemplo, estabilidade na água, pressão de vapor);
- dados de identificação química, incluindo a fórmula estrutural, o grau de pureza (ou seja, no caso de pesticidas, a identidade e a concentração da(s) substância(s) activa(s)).

2.2.2 **Espécies submetidas a ensaio:**

- nome científico, estirpe, idade aproximada (em semanas), método de recolha, data da recolha;
- dados informativos sobre as colónias usadas para recolha das abelhas submetidas a ensaio, incluindo o estado de saúde, a ocorrência de doenças de adultos, eventuais tratamentos previamente aplicados, etc.

2.2.3 **Condições do ensaio:**

- temperatura e humidade relativa da sala de ensaios;
- condições de alojamento, incluindo o tipo, as dimensões e o material de construção das gaiolas;
- métodos de preparação das soluções-mãe e soluções de ensaio (em caso de utilização de um solvente não aquoso, deve indicar-se a sua natureza e a respectiva concentração);
- planeamento do ensaio, ou seja, o número de concentrações de ensaio e os respectivos valores, bem como o número de controlos; para cada concentração de ensaio e para cada controlo, deverá indicar-se o número de gaiolas em duplicado e o número de abelhas em cada uma delas;
- data do ensaio.

2.2.4

Resultados:

- em caso de realização de um estudo preliminar para determinação da gama de concentrações de ensaio, os respectivos resultados;
- dados não processados: mortalidade correspondente a cada dose de ensaio em cada momento de observação;
- representação gráfica das curvas dose-resposta no final do ensaio;
- valores DL_{50} , com limites de confiança de 95 %, para cada período de observação recomendado, tanto para a substância de ensaio, como para o padrão tóxico;
- tratamentos estatísticos usados para a determinação da DL_{50} ;
- mortalidade nos controlos;
- outros efeitos biológicos observados ou medidos, como, por exemplo, anomalias no comportamento das abelhas (incluindo rejeição da dose de ensaio), taxa de consumo de alimento em grupos tratados e em grupos não tratados;
- qualquer desvio em relação aos procedimentos aqui descritos, assim como quaisquer outras informações relevantes.

3.

REFERÊNCIAS

- (1) OEPP/Conselho da Europa (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPP Bulletin, vol. 23, nº. 1, 151-165. Março de 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E. C. e Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journ. Econ. Entomol., 18, 265-267.

C.17. ABELHAS DOMÉSTICAS – ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA POR CONTACTO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade aguda baseia-se na publicação OECD TG 214 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade constitui um método laboratorial, destinado a avaliar a toxicidade aguda por contacto de produtos fitofarmacêuticos e outras substâncias químicas para as abelhas domésticas obreiras adultas.

Os processos de avaliação e verificação das características tóxicas de substâncias podem exigir a determinação da toxicidade aguda por contacto para as abelhas domésticas. Esta situação verifica-se, por exemplo, quando há a probabilidade de exposição de abelhas a um produto químico específico. O ensaio de toxicidade aguda por contacto permite determinar a toxicidade de pesticidas e outras substâncias químicas para as abelhas. Os seus resultados condicionarão a necessidade de efectuar ulteriores avaliações. O método é especialmente adequado para uso em programas passo-a-passo, destinados a avaliar os efeitos perigosos de pesticidas para as abelhas. Estes programas baseiam-se numa progressão sequencial de ensaios de toxicidade, que evolui de ensaios laboratoriais para experiências parcial ou totalmente realizadas no campo (1). Os pesticidas podem ser submetidos a ensaio sob a forma de substâncias activas (S.A.) ou de produtos formulados.

A sensibilidade das abelhas e o rigor do procedimento experimental devem ser verificados pela inclusão de um padrão tóxico nos ensaios.

1.2 DEFINIÇÕES

Toxicidade aguda por contacto: conjunto dos efeitos adversos que se manifestam num período máximo de 96 horas após a aplicação tópica de uma dose única de uma substância.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em massa (μg) de substância de ensaio por animal ($\mu\text{g}/\text{abelha}$).

DL₅₀ (Dose Letal Média) por contacto: dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por contacto. O valor da DL₅₀ é expresso em μg de substância de ensaio por abelha. Em ensaios de pesticidas, a substância de ensaio pode ser uma substância activa (S.A) ou um produto formulado, contendo uma ou várias substâncias activas.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece completamente imóvel.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método baseia-se na exposição de abelhas domésticas (*Apis mellifera*) obreiras adultas a uma gama de doses da substância de ensaio dissolvida num veículo adequado e aplicada directamente no tórax (em gotículas). O ensaio tem a duração de 48 horas. Caso a taxa de mortalidade aumente entre 24 e 48 horas após a aplicação das doses, mantendo-se a mortalidade dos controlos num nível aceitável (ou seja, $\leq 10\%$), o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas. A mortalidade das abelhas é registada diariamente e comparada com valores de controlo. Os resultados deverão ser analisados de forma a calcular a DL₅₀ às 24 horas e às 48 horas e, em caso de prolongamento do ensaio, às 72 horas e às 96 horas.

1.4 VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido, desde que se verifiquem as seguintes condições:

- a mortalidade média na totalidade dos controlos no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %;
- a DL₅₀ do padrão tóxico deverá enquadrar-se na gama de concentrações especificada.

1.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1 Recolha de abelhas

O ensaio deve ser realizado com obreiras adultas jovens, ou seja, abelhas da mesma idade, em idênticas condições de alimentação, raça idêntica, etc. As abelhas devem provir de colónias governadas por rainhas, bem alimentadas, saudáveis, tanto quanto possível isentas de doenças e com historial e estado fisiológico conhecidos. As abelhas podem ser recolhidas na manhã do dia do ensaio ou na noite anterior, desde que se mantenham nas condições de ensaio até à sua realização. Consideram-se adequadas para o ensaio as abelhas recolhidas de favos sem postura. Devido ao facto de as abelhas sofrerem alterações fisiológicas no início da Primavera e no final do Outono, deverão evitar-se recolhas durante estes períodos. Caso seja necessário realizar ensaios nestas épocas do ano, podem usar-se abelhas eclodidas numa incubadora e alimentadas durante uma semana com pólen colhido da colmeia e solução de sacarose. As abelhas tratadas com substâncias químicas (tais como antibióticos, produtos varroacidas, etc.) não devem ser usadas para ensaios de toxicidade até quatro semanas após o final do último tratamento.

1.5.2 Condições de alojamento e alimentação

Devem usar-se gaiolas bem ventiladas e fáceis de limpar. As gaiolas podem ser construídas com quaisquer materiais apropriados, tais como aço inoxidável, tela de arame ou plástico. Podem ainda ser usadas gaiolas de madeira descartáveis. As gaiolas usadas nos ensaios devem possuir dimensões adequadas ao número de abelhas a alojar, de modo a proporcionarem espaço suficiente. Por norma, cada gaiola deverá conter um grupo de dez abelhas.

As abelhas devem ser mantidas no escuro, numa sala de ensaios, à temperatura de 25 ± 2 °C. A humidade relativa, normalmente de cerca de 50-70 %, deverá ser registada ao longo do ensaio. Os procedimentos de manipulação, incluindo o tratamento e as observações, poderão ser efectuados com iluminação (natural). As abelhas são alimentadas com uma solução aquosa de sacarose a uma concentração de 500 g/l (50 % p/v), que deve ser fornecida *ad libitum* durante todo o ensaio por meio de um sistema de alimentação de abelhas. Para tal, pode utilizar-se um tubo de vidro com cerca de 50 mm de comprimento e 10 mm de largura e a extremidade aberta estreitada para cerca de 2 mm de diâmetro.

1.5.3 Preparação das abelhas

Para a aplicação da substância de ensaio, as abelhas recolhidas são anestesiadas, podendo usar-se dióxido de carbono ou azoto para o efeito. Deverá minimizar-se a quantidade usada e o tempo de exposição ao anestésico. Antes de dar início ao ensaio, as abelhas moribundas devem ser retiradas e substituídas por abelhas saudáveis.

1.5.4 Preparação das doses

A substância de ensaio deverá ser aplicada na forma de solução num veículo, ou seja, num solvente orgânico ou numa solução aquosa contendo um agente molhante. O solvente orgânico mais vulgarmente utilizado é a acetona. No entanto, podem utilizar-se outros compostos de baixa toxicidade para as abelhas, como, por exemplo, dimetilformamida ou dimetilsulfóxido. A aplicação de produtos formulados dispersos em água ou de substâncias orgânicas de elevada polaridade insolúveis em solventes orgânicos pode tornar-se mais fácil se as respectivas soluções forem preparadas numa solução diluída de um agente molhante comercial (por exemplo, Agral, Cittowett, Lubrol, Triton ou Tween).

As soluções de controlo devem ser preparadas de forma adequada, isto é, utilizando um solvente ou dispersante para tornar a substância de ensaio solúvel. Deverão ser utilizados dois grupos de controlo distintos, um tratado com água e o outro com o solvente ou dispersante.

1.6 PROCEDIMENTO

1.6.1 Grupos de ensaio e de controlo

O número de doses e repetições usados no ensaio deverá satisfazer os requisitos estatísticos para a determinação da DL_{50} , com limites de confiança de 95 %. De uma forma geral, é necessário usar cinco doses em série geométrica, com um factor não superior a 2,2 e cobrindo uma gama de concentrações que abranja a DL_{50} . No entanto, o número de doses deverá ser determinado em função do declive da curva de toxicidade (dose *versus* mortalidade) e tendo em consideração o método estatístico adoptado para a análise dos resultados. Um ensaio de determinação de gama de concentrações permitirá escolher as doses apropriadas.

Cada concentração de ensaio deve ser aplicada em, pelo menos, três grupos idênticos, cada um constituído por dez abelhas.

Além da série em ensaio, devem ser testados pelo menos três grupos de controlo, cada um formado por dez abelhas. Sempre que se utilize um solvente orgânico ou um agente molhante, deverão ser incluídos três grupos de controlo adicionais para estas substâncias, constituídos por dez abelhas cada.

1.6.2 Padrão tóxico

A série em ensaio deve incluir um padrão tóxico. Devem seleccionar-se pelo menos três doses deste padrão, de modo a abranger o valor previsto para a DL_{50} . Para cada dose de ensaio, devem usar-se pelo menos três gaiolas, cada uma contendo dez abelhas. O padrão tóxico mais vulgarmente utilizado é o dimetoato. A DL_{50} por contacto às 24 horas descrita para este composto situa-se na gama de 0,10 a 0,30 μg s.a./abelha (2). No entanto, podem ser usados outros padrões tóxicos, desde que existam dados suficientes para verificar a resposta prevista à dose aplicada (por exemplo, paratião).

1.6.3 Exposição

1.6.3.1 Administração de doses

As abelhas anestesiadas são tratadas individualmente por aplicação tópica. As diferentes doses de ensaio e os controlos são distribuídos de forma aleatória pelas abelhas. As doses são aplicadas com o auxílio de um microaplicador no lado dorsal do tórax de cada abelha, em alíquotas de 1 μl de uma solução contendo a substância de ensaio na concentração apropriada. Caso se justifique, poderão ser usados outros volumes. Após a aplicação, as abelhas são colocadas em gaiolas de ensaio e alimentadas com soluções de sacarose.

1.6.3.2 Duração

O ensaio deverá durar, de preferência, 48 horas. Caso a mortalidade aumente em mais de 10 % entre 24 e 48 horas após a aplicação, o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade nos controlos não exceda 10 %.

1.6.4 Observações

Devem efectuar-se registos de mortalidade decorridas 4, 24 e 48 horas após o início do ensaio. Em caso de prolongamento do período de observação, deverão realizar-se avaliações suplementares com intervalos de 24 horas, até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade dos grupos de controlo não exceda 10 %.

Deverão ser objecto de registo todas as eventuais anomalias de comportamento verificadas durante o período do ensaio.

1.6.5 Teste-limite

Em determinadas circunstâncias (por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio apresente um baixo nível de toxicidade), pode efectuar-se um teste-limite, usando 100 μg S.A./abelha, de forma a certificar-se de que a DL_{50} é superior a este valor. Deve seguir-se um procedimento semelhante ao descrito acima, incluindo o uso de três grupos duplicados para a dose de ensaio e a realização dos controlos relevantes, assim como o uso de um padrão tóxico. Se ocorrer mortalidade, deverá realizar-se um estudo completo. Todos os efeitos subletais, caso existam, deverão ser registados (ver ponto 1.6.4).

2. DADOS E RELATÓRIO

2.1 DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de tratamento (e para os grupos de controlo e os associados ao padrão tóxico), o número de abelhas usadas e a mortalidade em cada momento de observação, bem como o número de abelhas que apresentam um comportamento anómalo. Os dados de mortalidade devem ser analisados mediante métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise *probit*, média móvel, teoria do binómio relativa à probabilidade) (3 e 4). Devem ser traçadas curvas dose-resposta para cada tempo de observação recomendado (ou seja, 24 horas, 48 horas e, se for relevante, 72 horas e 96 horas), procedendo-se depois ao cálculo dos respectivos declives e à determinação das doses letais médias (DL_{50}) com limites de confiança de 95 %. Podem efectuar-se correcções na mortalidade dos controlos, usando os valores de correcção de Abbott (4 e 5). A DL_{50} deverá ser expressa em μg de substância de ensaio por abelha.

2.2 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1 Substância de ensaio:

- natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, estabilidade na água, pressão de vapor);
- dados de identificação química, incluindo a fórmula estrutural, o grau de pureza (ou seja, no caso de pesticidas, a identidade e a concentração da(s) substância(s) activa(s)).

2.2.2 Espécies submetidas a ensaio:

- nome científico, raça, idade aproximada (em semanas), método de recolha, data da recolha;
- dados informativos sobre as colónias usadas para recolha das abelhas submetidas a ensaio, incluindo o estado de saúde, a ocorrência de doenças de adultos, eventuais tratamentos previamente aplicados, etc.

2.2.3 Condições do ensaio:

- temperatura e humidade relativa da sala de ensaios;
- condições de alojamento, incluindo o tipo, as dimensões e o material de construção das gaiolas;
- métodos de administração da substância de ensaio (indicando, por exemplo, o solvente usado como veículo, o volume aplicado da solução de ensaio e os anestésicos usados);
- planeamento do ensaio, ou seja, o número de doses de ensaio e as respectivas concentrações, bem como o número de controlos; para cada dose de ensaio e para cada controlo, deverá indicar-se o número de gaiolas em duplicado e o número de abelhas em cada uma delas;
- data do ensaio.

2.2.4 Resultados:

- em caso de realização de um estudo preliminar para determinação da gama de concentrações de ensaio, os respectivos resultados;
- dados não processados: mortalidade correspondente a cada concentração de ensaio em cada momento de observação;
- representação gráfica das curvas dose-resposta no final do ensaio;
- valores de DL_{50} , com limites de confiança de 95 %, para cada período de observação recomendado, tanto para a substância de ensaio, como para o padrão tóxico;
- tratamentos estatísticos usados para a determinação da DL_{50} ;
- mortalidade nos controlos;
- outros efeitos biológicos observados ou medidos e qualquer reacção anormal das abelhas;
- qualquer desvio em relação aos procedimentos aqui descritos, assim como quaisquer outras informações relevantes.

3.

REFERÊNCIAS

- (1) OEPP/Conselho da Europa (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO Bulletin, vol. 23, nº. 1, 151-165. Março de 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E. C. e Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

C.18. ADSORÇÃO/DESORÇÃO POR RECURSO A UM MÉTODO DE EQUILÍBRIO POR LOTES DE SOLOS

1. MÉTODO

O presente método é uma reprodução do método OCDE TG 106, para a determinação da adsorção/dessorção em solos por recurso a um método de equilíbrio por lotes (2000).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente método baseia-se em ensaios específicos, bem como nos resultados de um seminário (*workshop*) para a selecção de solos, com vista ao desenvolvimento de um ensaio de adsorção (1)(2)(3)(4). O método tem também em conta as directrizes em vigor a nível nacional (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Os estudos de adsorção/dessorção permitem obter informações essenciais sobre a mobilidade dos produtos químicos e sua distribuição nos diversos componentes da biosfera (edáfico, aquático e atmosférico) (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). As informações recolhidas podem ser utilizadas na previsão ou estimativa, nomeadamente, da disponibilidade de uma substância química para degradação (22)(23), transformação e absorção pelos organismos vivos (24), do perfil de lixiviação pelos solos (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), da volatilidade nos solos (21)(29)(30) e da transferência da superfície de solos para águas naturais (18)(31)(32). Os dados de adsorção podem ser utilizados para fins comparativos, bem como de modelização (19)(33)(34)(35).

A distribuição de uma substância química entre o solo e uma fase aquosa constitui um processo complexo que depende de diversos factores, designadamente a natureza química da substância (12)(36)(37)(38)(39)(40), as características do solo (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) e factores climáticos tais como a pluviosidade, a temperatura, a exposição ao sol e os ventos. Deste modo, os numerosos fenómenos e mecanismos envolvidos no processo de adsorção de uma substância pelo solo não podem ser totalmente definidos por um modelo laboratorial simplificado do tipo descrito no presente método. Todavia, embora a presente contribuição não abranja todos os casos possíveis no domínio ambiental, fornece informações valiosas sobre o impacto ambiental da adsorção de uma substância.

Ver também a Introdução Geral.

1.2 ÂMBITO

O presente método visa determinar o comportamento de uma substância no solo em termos de adsorção/dessorção. O objectivo consiste em obter um parâmetro que possa ser utilizado para prever a partição em diversas condições ambientais; para tal, determinam-se os coeficientes de adsorção em equilíbrio de um produto químico em vários solos, em função das características destes últimos (por exemplo, teor de carbono orgânico, teor de argila, textura e pH). Devem utilizar-se diferentes tipos de solos, de modo a abranger tanto quanto possível as interacções de uma determinada substância com solos de ocorrência natural.

No presente método, a adsorção é entendida como o processo de ligação de uma substância à superfície dos solos, não se efectuando qualquer distinção entre os diversos processos de adsorção (adsorção física e química), bem como entre os processos de degradação superficial catalisada, adsorção na massa e reacção química. Não é tida em conta a adsorção em partículas coloidais (diâmetro < 0,2 µm) produzidas nos solos.

Os parâmetros referentes ao solo considerados mais importantes no contexto da adsorção são os seguintes: teor de carbono orgânico (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), teor de argila e textura dos solos (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) e pH, no caso de compostos ionizáveis (3)(4)(42). Outros parâmetros que podem apresentar um impacto na adsorção-dessorção do solo são a capacidade de permuta catiónica efectiva (ECEC), o teor de ferro amorfo e de óxidos de alumínio, em especial em solos vulcânicos e tropicais (4), bem como a superfície específica (49).

O ensaio foi concebido para avaliar a adsorção de uma substância em vários tipos de solos, com diversos teores de carbono orgânico, argila, textura e pH, sendo constituído por três fases:

Fase 1: Estudo preliminar para a determinação:

- da razão solo/solução;
- do tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção, bem como da quantidade de substância teste adsorvida no estado de equilíbrio;
- da adsorção da substância em estudo na superfície dos recipientes de ensaio, bem como da estabilidade da substância durante o período de ensaio.

Fase 2: Ensaio de selecção: estuda-se a cinética de adsorção a concentração constante em cinco tipos diferentes de solos, determinando-se os coeficientes de distribuição K_d e K_{oc} .

Fase 3: Determinação das isotérmicas de adsorção de Freundlich, de modo a avaliar a influência da concentração na extensão da adsorção nos solos.

Estudo da dessorção através da respectiva cinética, bem como das isotérmicas de dessorção de Freundlich (Anexo 1).

1.3

DEFINIÇÕES E UNIDADES

Símbolo	Definição	Unidades
A_{t_i}	percentagem de adsorção no instante t_i	%
A_{eq}	percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no instante t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no intervalo de tempo Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	μg
m_0	massa de substância em estudo no recipiente de ensaio, no início do mesmo	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa de substância em estudo determinada numa alíquota (v_a^A) no instante t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa de substância em estudo na solução, no estado de equilíbrio de adsorção	μg
m_{solo}	quantidade de fase edáfica, expressa em massa seca	g
C_{st}	concentração mássica da solução-mãe da substância	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	concentração mássica inicial da solução de ensaio em contacto com o solo	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentração mássica da substância na fase aquosa no instante t_i em que a análise é efectuada	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads}(eq)$	teor de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentração mássica da substância na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	volume inicial da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de adsorção	cm^3
v_a^A	volume da alíquota em que se determina a substância de ensaio	cm^3
K_d	coeficiente de distribuição da adsorção	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	coeficiente de adsorção normalizado relativo ao carbono orgânico	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	coeficiente de adsorção normalizado da matéria orgânica	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	coeficiente de adsorção de Freundlich	$\mu\text{g}^{-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	expoente de Freundlich	
D_{t_i}	percentagem de dessorção no instante t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	percentagem de dessorção no intervalo Δt_i	%
K_{des}	coeficiente de dessorção aparente	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	coeficiente de dessorção de Freundlich	$\mu\text{g}^{-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa de substância de ensaio dessorvida do solo no instante t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	massa de substância de ensaio dessorvida do solo no intervalo Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	massa de substância determinada analiticamente na fase aquosa no estado de equilíbrio de dessorção	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	massa total de substância em estudo no estado de equilíbrio de dessorção	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa de substância que permanece adsorvida no solo após o intervalo Δt_i	μg
m_{aq}^A	massa de substância remanescente do equilíbrio de adsorção devido a uma substituição incompleta de volumes	μg
$C_s^{des}(eq)$	teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentração mássica de substância de ensaio na fase aquosa no estado de equilíbrio de dessorção	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial	cm^3
V_R	volume de sobrenadante removido do tubo após atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído por igual volume de solução de CaCl_2 0,01 M	cm^3
v_a^D	volume da alíquota recolhida para fins analíticos a partir do instante (i), durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial	cm^3
V_I^i	volume de solução recolhida do tubo (i) para a determinação da substância em estudo, no ensaio de cinética de dessorção (método paralelo)	cm^3

V_r^F	volume de solução recolhida do tubo para a determinação da substância em estudo, no estado de equilíbrio de dessorção	cm^3
MB	balanço de massas	%
m_E	massa total de substância em estudo extraída do solo e das paredes do recipiente de ensaio em duas etapas	μg
V_{rec}	volume de sobrenadante recolhido após atingir o estado de equilíbrio de adsorção	cm^3
P_{ow}	coeficiente de partição octanol/água	
pKa	constante de dissociação	
S_w	solubilidade em água	g l^{-1}

1.4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Adicionam-se a amostras de solos de massa seca conhecida, previamente equilibradas com CaCl_2 , 0,01 M, volumes conhecidos de soluções da substância em estudo em CaCl_2 , 0,01 M, de concentração conhecida, marcadas ou não com radioisótopos. A mistura é agitada durante um período adequado. As suspensões de solo são separadas por centrifugação e eventualmente filtradas, procedendo-se à análise da fase aquosa. A quantidade de substância em estudo adsorvida pela amostra de solo é calculada na forma de diferença entre a quantidade de substância inicialmente presente na solução e a quantidade remanescente no final do ensaio (método indirecto).

Como alternativa, pode determinar-se directamente a quantidade de substância em estudo adsorvida, mediante a análise do solo (método directo). Este processo, que implica a extracção do solo, por etapas, com solventes adequados, é recomendado nos casos em que não possa determinar-se com rigor a diferença das concentrações da substância na solução. A adsorção da substância na superfície dos recipientes de ensaio, a instabilidade da substância no período de ensaio, bem como uma adsorção fraca que determine apenas alterações ligeiras da concentração da solução ou uma forte adsorção que origine concentrações demasiado reduzidas para serem determinadas com rigor, constituem exemplos de tais casos. Se se utilizarem substâncias marcadas com radioisótopos, pode evitar-se a extracção do solo mediante a análise da fase edáfica por combustão seguida de contagem com um contador de cintilação líquida. Trata-se, todavia, de uma técnica não-específica, que não permite distinguir as substâncias iniciais dos produtos de transformação, pelo que deve ser utilizada apenas se a substância em estudo for estável no período de duração do ensaio.

1.5 INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Os reagentes devem ser de qualidade analítica. No caso de substâncias em estudo de composição conhecida não marcadas, recomenda-se um grau de pureza mínimo de 95%; no caso de substâncias marcadas com radioisótopos, a pureza deve ser de grau radioquímico. Se os isótopos radioactivos possuírem uma meia-vida reduzida, devem utilizar-se parâmetros de correcção.

Antes de efectuar um ensaio de adsorção-dessorção, devem conhecer-se as seguintes informações relativas à substância em estudo:

- Solubilidade em água (A.6.);
- Pressão de vapor (A.4.) e/ou constante da lei de Henry;
- Degradação abiótica: hidrólise em função do pH (C.7.);
- Coeficiente de partição (A.8.);
- Biodegradabilidade fácil (C.4.) ou transformação aeróbia/anaeróbia no solo;
- pKa das substâncias ionizáveis presentes;
- Fotólise directa em água (por exemplo, espectro de absorção UV-Vis em água, rendimento quântico) e fotodegradação no solo.

1.6 APLICABILIDADE DO ENSAIO

O ensaio é aplicável a substâncias químicas para as quais existe um método analítico suficientemente rigoroso. A estabilidade da substância no período de ensaio é um parâmetro susceptível de influenciar a fiabilidade dos resultados, em especial quando se utiliza o método indirecto. Deve, pois, efectuar-se um ensaio preliminar com o objectivo de verificar a estabilidade; caso ocorra uma transformação no período de ensaio, recomenda-se a análise do solo e das fases aquosas no ensaio principal.

Podem surgir dificuldades na condução do ensaio em substâncias de solubilidade reduzida em água ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹), bem como em substâncias com carga eléctrica elevada, pode determinar dificuldades, uma vez que a determinação analítica da concentração da fase aquosa não pode ser efectuada com rigor suficiente. Nestes casos, é necessário adoptar medidas adicionais. Nas secções relevantes do presente método fornecem-se orientações para a resolução dos problemas em causa.

Caso se utilizem substâncias voláteis, devem evitar-se perdas durante o processo.

1.7 DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.7.1 Equipamento e reagentes

Equipamento corrente de laboratório, nomeadamente:

- a) Tubos ou recipientes de ensaio, que devem possuir as seguintes características:
 - ser directamente adaptáveis à centrífuga, de modo a minimizar os erros de manipulação e transferência;
 - ser feitos de um material inerte, de modo a minimizar a adsorção da substância em estudo na sua superfície.
- b) Dispositivo de agitação: agitador vertical ou equipamento equivalente; o dispositivo de agitação deve manter a amostra de solo em suspensão durante o processo.
- c) Centrífuga: preferentemente de alta velocidade (por exemplo, força centrífuga > 3000g), com controlo de temperatura e capacidade de remover da solução aquosa partículas de diâmetro superior a 0,2 µm. Os tubos ou recipientes devem ser tapados durante a agitação e centrifugação, de modo a evitar perdas por volatilização ou perdas de água; com vista a minimizar a adsorção nos tubos ou recipientes, devem utilizar-se tampas activadas, nomeadamente de teflon.
- d) Dispositivo de filtração (opcional): filtros com poros de 0,2 µm, esterilizados e descartáveis. Devem adoptar-se precauções especiais na selecção dos materiais de filtração, de modo a evitar perdas da substância em estudo; no caso de substâncias pouco solúveis, não é recomendável o uso de filtros de matérias orgânicas.
- e) Equipamento analítico adequado à determinação da concentração da substância em estudo.
- f) Estufa com possibilidade de manter a temperatura entre 103 °C e 110 °C.

1.7.2 Caracterização e selecção dos solos

Os solos devem ser caracterizados pelos três principais parâmetros considerados responsáveis pela capacidade de adsorção: teor de carbono orgânico, teor de argila, textura do solo e pH. Como referido supra (Âmbito), devem ter-se em conta quaisquer outras propriedades físico-químicas do solo que possam apresentar impacto na adsorção/dessorção de uma determinada substância.

Os métodos utilizados para a caracterização dos solos são bastante importantes, podendo influenciar os resultados de modo significativo. Deste modo, recomenda-se a determinação do pH do solo numa solução de CaCl₂ 0,01 M (solução utilizada no ensaio de adsorção/dessorção) de acordo com o método ISO correspondente (ISO-10390-1). Recomenda-se também a determinação de outras propriedades importantes do solo por recurso a métodos normalizados (por exemplo Manual ISO de análise dos solos “Handbook of Soil Analysis”); a análise dos dados de adsorção/dessorção poderá assim basear-se em parâmetros globalmente normalizados. As referências (50-52) fornecem algumas directrizes referentes aos métodos normalizados existentes para a análise e caracterização dos solos. No que respeita à calibração dos métodos de ensaio aplicáveis aos solos, recomenda-se o uso de amostras de solos de referência.

O quadro 1 fornece directrizes para a selecção dos solos a utilizar nos ensaios de adsorção/dessorção. Os sete tipos de solos seleccionados são característicos das regiões temperadas. No caso da utilização de substâncias ionizáveis, os solos seleccionados devem possuir uma gama alargada de pH, de modo a que possa avaliar-se a adsorção da substância nas suas formas ionizada e não-ionizada. Na secção 1.9 (Realização do ensaio) apresentam-se orientações relativas ao número de solos diferentes que devem ser utilizados nas várias fases do ensaio.

Caso se utilizem outros tipos de solos, estes últimos devem ser caracterizados pelos mesmos parâmetros, devendo as suas propriedades apresentar uma variação semelhante à dos solos descritos no quadro 1, mesmo que não satisfaçam os critérios de forma rigorosa.

Quadro 1: Directrizes para a selecção das amostras de solos a utilizar nos ensaios de adsorção-dessorção

Tipo de solo	Gama de pH (em CaCl ₂ 0,01 M)	Teor de carbono orgânico (%)	Teor de argila (%)	Textura*
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	argilosa
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	argilo-limosa
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	franco-limosa
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	limosa
5	< 4,0 - 6,0 [§]	< 0,5 - 1,5 [‡]	< 10 - 15 [§]	limo-arenosa
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 [‡]	40 - 65	argilo-limosa /argilosa
7	< 4,5	> 10	< 10	arenosa/ limo-arenosa

* Em conformidade com o sistema da FAO e dos Estados Unidos (85).

§ As variáveis respectivas devem, preferencialmente, exibir valores incluídos nas gamas indicadas. Todavia, caso se observem dificuldades em encontrar solos adequados, podem utilizar-se valores inferiores aos mínimos indicados.

‡ A utilização de solos com teor de carbono orgânico inferior a 0,3% poderá perturbar a correlação entre o referido teor e a adsorção. Recomenda-se, pois, a utilização de solos com um teor mínimo de carbono orgânico de 0,3%.

1.7.3 Recolha e armazenagem das amostras de solos

1.7.3.1 Recolha

Não se recomendam técnicas ou instrumentos específicos de amostragem; a técnica a utilizar depende do objectivo do ensaio (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Deve ter-se em conta o seguinte:

- são necessárias informações pormenorizadas sobre a história do local de recolha, nomeadamente a localização, o tipo de vegetação presente, o eventual tratamento com pesticidas e/ou adubos, a adição de matéria biológica e a contaminação accidental. No que respeita à descrição do referido local, devem seguir-se as recomendações da norma ISO relativa à recolha de amostras de solos (ISO 10381-6);

- b) o local de recolha das amostras deve ser definido por UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) ou por coordenadas geográficas; o que permitirá a recolha futura de tipos específicos de solos ou contribuir para a definição dos solos em diversos sistemas de classificação utilizados em países diferentes. As amostras devem ser recolhidas apenas em horizontes A, até uma profundidade máxima de 20 cm. Se, no caso particular do solo n. 7, se encontrar presente uma componente de horizonte O_h , a mesma deve ser incluída na amostragem.

As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes e a temperaturas tais que as suas propriedades não sofram alterações significativas.

1.7.3.2 *Armazenagem*

É preferível a utilização de solos recentemente recolhidos. Nos casos em que tal não for possível, os solos podem ser armazenados à temperatura ambiente, numa atmosfera seca. Não se recomenda qualquer período-limite de armazenagem; contudo, no caso dos solos armazenados há mais de três anos, deve determinar-se o teor de carbono orgânico, o pH e CEC antes da utilização.

1.7.3.3 *Manuseamento das amostras de solos e sua preparação para o ensaio*

Os solos são mantidos numa atmosfera seca, à temperatura ambiente (de preferência, entre 20 e 25°C). Devem aplicar-se forças de desagregação mínimas, de modo a manter tanto quanto possível a textura original dos solos. Os solos são crivados a uma granulometria inferior ou igual a 2 mm; o processo de crivagem deve ser conforme às recomendações da norma ISO relativa à recolha de amostras de solos (ISO 10381-6). Recomenda-se uma homogeneização cuidadosa, de modo a aumentar a reprodutibilidade dos resultados. O teor de humidade dos solos é determinado com três alíquotas, por aquecimento a 105 °C até não se observarem alterações de massa significativas (cerca de 12h). Para efeitos de cálculo, utiliza-se a massa de solo seco na estufa, isto é a massa corrigida do teor de humidade.

1.7.4 **Preparação da substância em estudo para aplicação no solo**

A substância é dissolvida numa solução de CaCl_2 0,01 M em água destilada ou desionizada; a solução de CaCl_2 é utilizada como fase aquosa com o objectivo de melhorar a centrifugação e minimizar a permuta catiónica. De preferência, a concentração da solução-mãe deve ser três ordens de grandeza acima do limite de detecção do método analítico utilizado. Este limiar garante o rigor das determinações no âmbito da metodologia do presente método; além disso, a concentração da solução-mãe deve ser inferior à solubilidade da substância em estudo em água.

A solução-mãe deve ser preparada, preferencialmente, imediatamente antes da aplicação nas amostras de solos, devendo ser mantida fechada e na ausência de luz, a 4 °C. O tempo de armazenagem depende da estabilidade da substância e da sua concentração na solução.

No caso de substâncias pouco solúveis ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), pode ser necessário utilizar um agente de solubilização adequado. Este último: (a) deve ser miscível com a água (por exemplo, metanol ou acetonitrilo); (b) a sua concentração não deve exceder 1% do volume total da solução-mãe e deve ser inferior à concentração da substância de ensaio em contacto com o solo (de preferência menos de 0,1%); (c) não deve ser tensioactivo nem susceptível de participar em processos de solvólise com a substância em estudo. A utilização de um agente de solubilização deve ser justificada de modo pormenorizado no relatório de ensaio.

A dopagem por adição da substância em estudo constitui outra alternativa aplicável a substâncias pouco solúveis. Neste caso, a substância em estudo é dissolvida num solvente orgânico, sendo adicionada uma alíquota ao sistema constituído pelo solo e a solução de CaCl_2 0,01 M em água destilada ou desionizada. O teor de solvente orgânico na fase aquosa deverá ser mantido a níveis tão reduzidos quanto possível, não devendo, em geral, exceder 0,1%. A técnica em causa tem como desvantagem a não-reprodutibilidade dos volumes: o facto de a concentração da substância em estudo e do co-solvente não ser idêntica em todos os ensaios poderá representar um factor de erro adicional.

1.8 REQUISITOS PRÉVIOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO

1.8.1 Método analítico

Os principais parâmetros que podem influenciar o rigor das determinações de adsorção/dessorção, incluem a precisão do método de análise da solução e da fase adsorvida, a estabilidade e pureza da substância em estudo, o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção/dessorção, a amplitude da variação de concentração da solução, a razão solo/solução e as alterações na estrutura do solo durante o processo de equilíbrio (35)(59-62). O Anexo 2 fornece alguns exemplos ligados à precisão das determinações.

Deve verificar-se a fiabilidade do método analítico para a gama de concentrações susceptíveis de ocorrer durante o ensaio. O experimentador deve ser livre de desenvolver um método com exactidão, precisão, reprodutibilidade, limites de detecção e recuperação adequados. A descrição infra fornece directrizes sobre o modo de execução do ensaio em causa.

Agita-se um volume adequado (por exemplo, 100 cm^3) de CaCl_2 0,01 M, durante 4 horas, com uma massa de solo (por exemplo, 20 g) de elevada capacidade de adsorção, isto é, com um teor elevado de carbono orgânico e de argila. As massas e volumes referidos podem variar em função das necessidades analíticas; uma razão solo/solução de 1:5 constitui, em geral, um valor inicial adequado. A mistura é centrifugada, podendo filtrar-se a fase aquosa. Adiciona-se à mistura um determinado volume de solução-mãe da substância em estudo, de modo a obter uma concentração nominal incluída na gama de concentrações susceptíveis de ocorrer durante o ensaio. O referido volume não deverá exceder 10% do volume final da fase aquosa, de modo a alterar tão pouco quanto possível a natureza da solução de pré-equilíbrio. Proceda-se à análise da solução.

Deve efectuar-se um ensaio em branco com o sistema constituído pelo solo e a solução de CaCl_2 (suprimindo a substância em estudo), de modo a averiguar a existência de anomalias no método analítico, bem como possíveis efeitos matriciais causados pelo solo.

Os métodos analíticos que podem ser utilizados para as determinações de adsorção/dessorção incluem a cromatografia gás-líquido (GLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectrometria (espectrometria de massa acoplada à GLC e HPLC) e a contagem por cintilação líquida (no caso de substâncias marcadas com radioisótopos). Independentemente do método analítico utilizado, considera-se que o mesmo é adequado se as recuperações forem da ordem de 90% a 110% do valor nominal. De modo a permitir efectuar a detecção e avaliação após a partição, os limites de detecção do método analítico devem ser inferiores à concentração nominal em, pelo menos, duas ordens de grandeza.

As características e limites de detecção do método analítico utilizado nos estudos de adsorção desempenham um papel importante na definição das condições de ensaio e no desempenho global do mesmo. O presente método constitui uma abordagem experimental, fornecendo recomendações e directrizes para o desenvolvimento de soluções alternativas caso o método analítico e as condições laboratoriais imponham limitações.

Seleção das razões solo/solução adequadas

A seleção das razões solo/solução adequadas aos estudos de adsorção/dessorção depende do coeficiente de distribuição K_d e do grau de adsorção relativa pretendido. A alteração da concentração da substância na solução determina o rigor estatístico da determinação, baseado na forma da equação de adsorção e do limite da metodologia analítica. Na prática, é conveniente adoptar uma série de razões fixas, relativamente às quais a percentagem adsorvida seja superior a 20% e, preferentemente, a 50% (62), devendo procurar manter-se a concentração da substância em estudo na fase aquosa a níveis que possam ser determinados com rigor. Tal facto é particularmente importante no caso de se observarem percentagens de adsorção elevadas.

A estimativa do valor de K_d quer através de estudos preliminares quer por técnicas de estimativa consagradas (Anexo 3), fornece uma abordagem conveniente da seleção das razões solo/água adequadas. A seleção de uma razão pode ser efectuada com base numa representação das razões solo/solução em função dos valores de K_d , para percentagens fixas de adsorção (Fig.1), presumindo a linearidade da equação de adsorção¹. A relação aplicável é obtida através do rearranjo da equação (4), de modo a obter a equação (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{solo}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

ou, na forma logarítmica, assumindo que $R = m_{\text{solo}}/V_0$ e $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

$$\log R = - \log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$

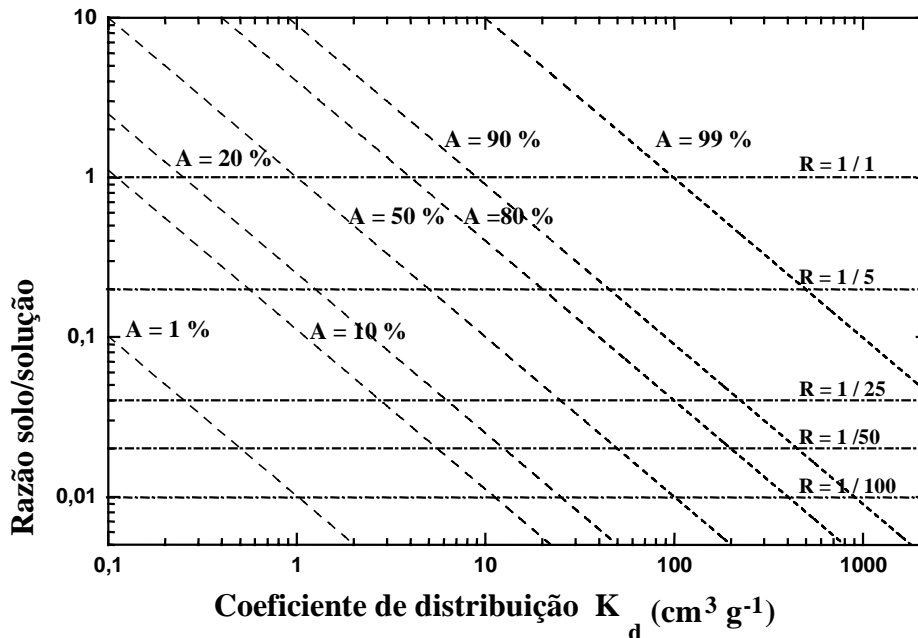


Fig. 1 Relação entre as razões solo/solução e K_d , para diferentes percentagens de substância em estudo adsorvida

¹ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

A Fig. 1 apresenta as razões solo/solução necessárias em função de K_d , para diversos níveis de adsorção. Por exemplo, com uma razão solo/solução de 1:5 e um K_d de 20, a percentagem de adsorção será da ordem de 80%. Para obter uma percentagem de adsorção de 50%, com um idêntico valor de K_d , deve utilizar-se uma razão de 1:25. Esta abordagem de selecção das razões solo/solução adequadas fornece ao investigador a flexibilidade necessária à satisfação das exigências experimentais.

As zonas de abordagem analítica mais difícil são aquelas em que a substância apresenta uma adsorção ligeira ou bastante elevada. Em caso de adsorção reduzida, recomenda-se a utilização de uma razão solo/solução de 1:1, embora, para solos com elevado teor de matéria orgânica, possa revelar-se necessário utilizar razões inferiores, de modo a obter a uma massa pastosa. Devem adoptar-se precauções com a metodologia analítica para a determinação de pequenas alterações de concentração, sem o que o cálculo da adsorção será inexacto. Por outro lado, no caso de coeficientes de partição K_d bastante elevados, pode utilizar-se uma razão solo/solução de 1:100, de modo a que permaneça na solução uma quantidade apreciável da substância. Contudo, devem adoptar-se precauções no sentido de assegurar uma homogeneização adequada, devendo prever-se o tempo necessário ao equilíbrio do sistema. A previsão do valor de K_d por recurso a técnicas de estimativa baseadas, por exemplo, nos valores de P_{ow} (Anexo 3) constitui uma abordagem alternativa, que pode ser utilizada, nomeadamente, no caso de substâncias polares ou com adsorção reduzida, bem como com valores de P_{ow} inferiores a 20, e no caso de substâncias lipófilas/ou de elevada adsorção com $P_{ow} > 10^4$.

1.9 REALIZAÇÃO DO ENSAIO

1.9.1 Condições de ensaio

Todos os ensaios devem ser realizados à temperatura ambiente e, se possível, a uma temperatura constante compreendida entre 20 °C e 25 °C.

As condições de centrifugação devem permitir remover da solução partículas de granulometria superior a 0,2 µm. Este valor representa a granulometria mínima para que uma partícula seja considerada sólida, constituindo o limite entre as partículas sólidas e coloidais. O Anexo 4 fornece directrizes para a determinação das condições de centrifugação.

Se o equipamento de centrifugação não garantir a remoção de partículas de granulometria superior a 0,2 µm, pode combinar-se a centrifugação com uma filtração com filtros de 0,2 µm de porosidade. Os filtros devem ser feitos de um material inerte adequado, de modo a evitar quaisquer perdas da substância em estudo. Em qualquer caso, deve provar-se a não-ocorrência de perdas da substância durante a filtração.

1.9.2 Etapa 1- Ensaio preliminar

O objectivo da realização de um ensaio preliminar foi já referido na secção “Âmbito”. Fornecem-se de seguida directrizes para o estabelecimento das condições do referido ensaio.

1.9.2.1 *Seleção das razões solo/solução adequadas*

Utilizam-se dois tipos de solos e três razões solo/solução (seis ensaios). Um dos tipos de solos deverá possuir um teor elevado de carbono orgânico e um teor reduzido de argila; o outro solo deverá possuir um teor reduzido de carbono orgânico e um elevado teor de argila. Recomendam-se as seguintes razões:

- 50 g de solo e 50 cm³ de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/1);
- 10 g de solo e 50 cm³ de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/5);
- 2 g de solo e 50 cm³ de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/25).

A quantidade mínima de solo necessária para efectuar o ensaio depende das condições laboratoriais e do desempenho dos métodos analíticos utilizados. Recomenda-se, contudo, a utilização de, pelo menos, 1 g, e, de preferência, 2 g, de modo a obter resultados fiáveis.

Uma amostra de controlo, contendo a substância em estudo dissolvida na solução de CaCl₂ 0,01 M, na ausência de solo, é sujeita ao mesmo tratamento que os sistemas de ensaio, com o objectivo de verificar a estabilidade da substância em estudo na solução de CaCl₂, bem como a sua eventual adsorção na superfície dos recipientes de ensaio.

Deve efectuar-se um ensaio em branco para cada tipo de solo, aplicando um procedimento idêntico a uma amostra constituída pela mesma quantidade de solo e um volume total de 50 cm³ de solução de CaCl₂ 0,01 M, na ausência da substância em estudo. O ensaio em branco possui uma função de controlo do processo analítico, permitindo detectar a presença de substâncias interferentes ou de contaminantes dos solos.

Todos os ensaios, incluindo os de controlo e brancos, devem ser realizados pelo menos em duplicado. O número total de amostras a preparar para o ensaio pode ser calculado em função da metodologia utilizada.

Os métodos utilizados no ensaio preliminar e no ensaio principal são, de modo geral, idênticos, referindo-se as excepções sempre que for caso disso.

Antes da realização do ensaio, as amostras de solos secas ao ar são equilibradas por agitação, durante 12 h, com um volume mínimo de 45 cm³ de CaCl₂ 0,01 M. Seguidamente, adiciona-se um volume determinado de solução-mãe da substância em estudo, de modo a ajustar o volume final para 50 cm³. O volume de solução-mãe a adicionar: (a) não deve exceder 10% do volume final (50 cm³) da fase aquosa, de modo a alterar tão pouco quanto possível a natureza da solução de pré-equilíbrio; (b) deve, de preferência, resultar numa concentração inicial da substância em estudo em contacto com o solo (C₀) superior ao limite de detecção do método analítico em, pelo menos, duas ordens de grandeza; este limiar garante a possibilidade de efectuar determinações rigorosas mesmo em caso de ocorrência de uma forte adsorção (> 90%), bem como o cálculo posterior das isotérmicas de adsorção. Recomenda-se também, na medida do possível, que a concentração inicial da substância em estudo (C₀) não exceda metade do seu limite de solubilidade.

Apresenta-se de seguida um exemplo do cálculo da concentração da solução-mãe (C_{st}). Assume-se que o limite de detecção é de 0,01 µg cm⁻³ e a taxa de adsorção de 90%; nestas condições, a concentração inicial da substância em estudo em contacto com o solo deve, preferentemente, ser de 1 µg cm⁻³ (superior ao limite de detecção em duas ordens de grandeza). Supondo que se adiciona o volume máximo recomendável de solução-mãe, isto é, 5 a 45 cm³ de solução de CaCl₂ 0,01 M (= 10% de solução-mãe a um volume total da fase aquosa de 50 cm³), a concentração da solução-mãe deve ser de 10 µg cm⁻³, ou seja, superior ao limite de detecção do método analítico em três ordens de grandeza.

Deve determinar-se o pH da fase aquosa antes e após o contacto com o solo, uma vez que desempenha um papel importante em todo o processo de adsorção, especialmente no caso das substâncias ionizáveis.

A mistura é agitada até ser atingido o equilíbrio de adsorção. O tempo necessário para atingir o equilíbrio no solo é bastante variável, dependendo da natureza da substância e do tipo de solo; um período de 24 h é, em geral, suficiente (77). No estudo preliminar, recomenda-se a adopção de uma amostragem sequencial nas 48 h subsequentes à mistura (por exemplo, após 4, 8, 24 e 48 h). Deve, contudo, adoptar-se uma relativa flexibilidade no que respeita à duração do ensaio, tendo em conta a programação do trabalho de laboratório.

Existem duas opções para a análise da substância em estudo na solução aquosa: (a) método paralelo (b) método sequencial. Deve sublinhar-se que, embora no plano experimental o método paralelo seja mais fastidioso, o tratamento matemático dos resultados é mais simples (ver Anexo 5). Todavia, a escolha da metodologia a adoptar é deixada ao critério do experimentador, que deverá ter em conta as condições e os recursos laboratoriais disponíveis.

(a) método paralelo: preparam-se amostras com a mesma razão solo/solução, em número igual aos intervalos de tempo em que pretende estudar-se a cinética de adsorção. Após centrifugação e, se necessário, filtração, a fase aquosa do primeiro tubo é recolhida tão completamente quanto possível e sujeita a análise após, por exemplo, 4 h, sendo a fase aquosa do segundo tubo recolhida após 8 h, a do terceiro tubo após 24, etc.

(b) método sequencial: prepara-se uma única amostra em duplicado por cada razão solo/solução. A mistura é centrifugada a intervalos regulares, de modo a separar as fases. Determina-se de imediato a substância em estudo numa pequena alíquota da fase aquosa, prosseguindo-se o ensaio com a mistura original. Caso se recorra à filtração após a centrifugação, as condições do laboratório devem permitir filtrar alíquotas aquosas de volume reduzido. Recomenda-se que o volume total de alíquotas recolhidas não exceda 1% do volume total da solução, de modo a não alterar significativamente a razão solo/solução e reduzir a massa de soluto disponível para adsorção durante o ensaio.

Calcula-se a percentagem de adsorção A_{t_i} em cada instante (t_i) com base na concentração inicial nominal e na concentração determinada no instante de amostragem (t_i), corrigida do valor referente à amostra em branco. A representação gráfica de A_{t_i} em função do tempo (Fig. 1 do Anexo 5) permite obter uma estimativa do tempo necessário para atingir o patamar de equilíbrio², bem como calcular o valor de K_d no estado de equilíbrio. Com base no valor de K_d , seleccionam-se da Fig.1 razões solo/solução adequadas, que determinem uma percentagem de adsorção superior a 20% e, preferentemente, superior a 50% (61). As equações a aplicar e princípios de representação gráfica são fornecidos na secção “Apresentação dos resultados” e no Anexo 5.

1.9.2.2 *Determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção e da quantidade de substância em estudo adsorvida no estado de equilíbrio*

Como referido supra, a representação gráfica de A_{t_i} ou C_{aq}^{ads} em função do tempo permite obter uma estimativa do instante em que é atingido o equilíbrio de adsorção, bem como da quantidade de substância em estudo adsorvida no estado de equilíbrio. As figuras 1 e 2 do Anexo 5 fornecem exemplos das referidas representações. O tempo necessário para atingir o equilíbrio traduz-se no tempo de que o sistema necessita para atingir o patamar de equilíbrio.

Se, no caso de um determinado solo, não se observar a ocorrência de qualquer patamar, mas antes um aumento constante, tal facto pode ser devido a factores de perturbação tais como a biodegradação ou difusão lenta. Pode averiguar-se a ocorrência de biodegradação repetindo o ensaio com uma amostra de solo esterilizada. Caso não se observe também qualquer patamar, o experimentador deve averiguar a ocorrência de outro fenómeno possível no caso específico em questão, procedendo a alterações adequadas das condições experimentais (temperatura, tempos de agitação, razões solo/solução). Compete ao experimentador decidir o prosseguimento do ensaio apesar da eventual impossibilidade de atingir o equilíbrio.

1.9.2.3 *Adsorção na superfície do recipiente de ensaio e estabilidade da substância em estudo*

A análise das amostras de controlo permite obter informações sobre a adsorção da substância em estudo na superfície dos recipientes de ensaio, bem como sobre a respectiva estabilidade. Caso se observe uma perda superior ao erro-padrão do método analítico utilizado, esta pode dever-se a uma degradação abiótica e/ou adsorção na superfície do recipiente de ensaio. Estes fenómenos são distinguíveis mediante a lavagem das paredes do recipiente com um volume conhecido de um solvente adequado, seguida de determinação da substância em estudo na solução resultante da lavagem. Se não ocorrer adsorção na superfície do recipiente de ensaio, a perda reflecte a instabilidade abiótica da substância em estudo. Caso se observe a ocorrência de adsorção, é necessário utilizar recipientes de outro material. De referir que os dados relativos à adsorção na superfície dos recipientes de ensaio assim obtidos não são directamente extrapoláveis para o ensaio solo/solução, uma vez que a presença de solo afecta o processo de adsorção.

Podem obter-se informações adicionais sobre a estabilidade da substância em estudo através do cálculo do balanço de massas em função do tempo. Tal implica a determinação da substância em estudo na fase aquosa, em extractos do solo e nas paredes do recipiente de ensaio. A diferença entre a massa de substância em estudo adicionada e a soma das massas da mesma substância na fase aquosa, nos extractos de solo e no recipiente de ensaio corresponde à massa degradada e/ou volatilizada e/ou não extraída. A determinação do balanço de massas apenas deve ser efectuada se o equilíbrio de adsorção tiver sido atingido no período de ensaio.

² A representação gráfica da concentração da substância de ensaio na fase aquosa (C_{aq}^{ads}) em função do tempo pode também ser utilizada na estimativa do instante em que é atingido o patamar de equilíbrio (ver a Fig. 2 do Anexo 5).

O balanço de massas é determinado para ambos os solos, bem como para uma razão solo/solução por solo com uma perda superior a 20% e, preferentemente, superior a 50%, no estado de equilíbrio. Após a análise da última amostra de fase aquosa, decorridas 48 h do início do ensaio, as fases são separadas por centrifugação e eventualmente filtradas. A fase aquosa é recuperada na maior extensão possível, adicionando-se de seguida ao solo um solvente de extracção adequado, com um coeficiente de extracção mínimo de 95%, de modo a extrair a substância em estudo. Recomenda-se a realização de duas extracções sucessivas. Determina-se então a quantidade de substância em estudo presente no solo e nos extractos dos recipientes, procedendo-se ao cálculo do balanço de massas (equação 10 da secção “Apresentação dos resultados”). Caso o referido balanço seja inferior a 90%, a substância deve considerar-se instável no intervalo de duração do ensaio. Podem, contudo, prosseguir-se os estudos, tendo em devida conta a referida instabilidade; neste caso, recomenda-se a análise de ambas as fases no ensaio principal.

1.9.2.4 *Etapa 2 - Cinética de adsorção para uma determinada concentração da substância em estudo*

Utilizam-se cinco solos, seleccionados com base no quadro 1. É conveniente utilizar alguns dos solos (ou mesmo todos) utilizados no ensaio preliminar. Neste caso, não deverá repetir-se a etapa 2 para os solos utilizados no referido ensaio.

O tempo necessário para atingir o equilíbrio, a razão solo/solução, a massa da amostra de solo, o volume de fase aquosa em contacto com o solo e a concentração da substância em estudo na solução são seleccionados com base nos resultados do ensaio preliminar. De preferência, deve efectuar-se a análise após um tempo de contacto aproximado de 2, 4, 6, 8 (eventualmente também 10) e 24 h; caso os resultados dos ensaios de das razões mostrem que um determinado produto necessita de tempos de exposição superiores, o tempo de agitação pode ser aumentado para, no máximo, 48 h. O estabelecimento dos referidos tempos deve, contudo, ser encarado de modo flexível.

Cada ensaio com um tipo específico de solo e uma solução deve ser efectuado pelo menos em duplicado, de modo a permitir estimar a variância dos resultados. Deve também realizar-se em cada caso um ensaio em branco, utilizando uma massa de amostra de solo e um volume de solução de CaCl_2 0,01 M idênticos aos utilizados no ensaio principal, na ausência da substância em estudo. Deve aplicar-se o mesmo procedimento de ensaio a uma amostra de controlo contendo apenas a substância em estudo dissolvida na solução de CaCl_2 0,01 M, na ausência de solo, como medida de precaução contra factores imprevistos.

A percentagem de adsorção é calculada em cada instante A_{t_i} e/ou em cada intervalo $A_{\Delta t_i}$ (de acordo com as necessidades), sendo representada graficamente em função do tempo. Calcula-se também o coeficiente de distribuição no equilíbrio, K_d , bem como o coeficiente de adsorção normalizado em relação ao carbono orgânico, K_{oc} (aplicável a substâncias orgânicas não polares).

Resultados do ensaio de cinética de adsorção

De modo geral, o valor linear de K_d é suficientemente preciso para descrever o comportamento do solo em termos de adsorção/dessorção (35)(78), constituindo uma expressão da mobilidade característica da substância no solo. Considera-se, por exemplo, que as substâncias com $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ apresentam uma mobilidade qualitativa apreciável. Além disso, MacCall *et al.* (16) desenvolveram um método de classificação da mobilidade com base nos valores de K_{oc} . Existem também sistemas de classificação da lixiviação baseados na relação entre K_{oc} e $DT-50^3$ (32)(79).

Por outro lado, de acordo com os estudos de análise de erros (61), os valores de K_d inferiores a $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ não podem ser estimados de forma rigorosa com base no decréscimo da concentração da fase aquosa, mesmo quando se utiliza a razão solo/solução mais favorável do ponto de vista da precisão, ou seja, 1:1. Neste caso, recomenda-se proceder à análise de ambas as fases (solo e solução).

³ DT-50: tempo necessário para a degradação de 50% da substância em estudo.

Relativamente às observações supra, recomenda-se que o estudo do comportamento da substância no solo em termos de adsorção, bem como da sua mobilidade potencial, seja seguido da determinação das isotérmicas de adsorção de Freundlich para os sistemas que permitam uma determinação rigorosa de K_d através do protocolo experimental descrito no presente método. Esta determinação é possível caso o valor resultante da multiplicação de K_d pela razão solo/solução seja superior a 0,3, sempre que as determinações sejam baseadas no decréscimo de concentração da fase aquosa (método indirecto), ou superior a 0,1, quando se procede à análise de ambas as fases (método directo) (61).

1.9.2.5 *Etapa 3 - Isotérmicas de adsorção e cinética de dessorção/isotérmicas de dessorção*

1.9.2.5.1 Isotérmicas de adsorção

Utilizam-se cinco concentrações da substância em estudo, que deverão abranger, de preferência, duas ordens de grandeza; na selecção das referidas concentrações, devem ter-se em conta a solubilidade em água e as concentrações de equilíbrio resultantes. Para cada solo, deve utilizar-se ao longo de todo o ensaio a mesma razão solo/solução. O ensaio de adsorção é efectuado do modo descrito supra, embora a fase aquosa seja analisada uma única vez, após o tempo necessário para atingir o equilíbrio, estabelecido na etapa 2. Determinam-se as concentrações da solução no equilíbrio, calculando-se a quantidade adsorvida com base na perda da substância em estudo na solução ou pelo método directo. Representa-se graficamente a massa adsorvida por unidade de massa do solo em função da concentração de equilíbrio da substância em estudo (ver secção “Apresentação dos resultados”).

Resultados do ensaio para a determinação das isotérmicas de adsorção

De entre os diversos modelos matemáticos de adsorção propostos, a isotérmica de Freundlich constitui um dos mais frequentemente utilizados para descrever os processos de adsorção. As referências (41)(45)(80)(81)(82) fornecem informações mais pormenorizadas sobre a interpretação e importância dos modelos de adsorção.

Nota: Deve referir-se que a comparação dos valores de K_F (coeficiente de adsorção de Freundlich) de diversas substâncias apenas é possível se os referidos valores forem expressos nas mesmas unidades (83).

1.9.2.5.2 Cinética de dessorção

O objectivo do ensaio consiste em averiguar a reversibilidade ou irreversibilidade da adsorção de uma substância no solo, informação importante na medida em que o processo de dessorção desempenha um papel considerável no comportamento da substância no solo. Além disso, os dados de dessorção são utilizados na modelização por computador de processos de lixiviação e escoamento de substâncias dissolvidas. Caso se pretenda efectuar um estudo de dessorção, recomenda-se a aplicação do protocolo descrito infra a cada sistema relativamente ao qual foi possível efectuar uma determinação rigorosa de K_d no ensaio de cinética de adsorção precedente.

Tal como no estudo de cinética de adsorção, existem duas opções para efectuar o ensaio de cinética de dessorção: (a) método paralelo (b) método sequencial. A selecção da metodologia a adoptar é deixada ao critério do experimentador, que deverá ter em conta as condições e os recursos laboratoriais disponíveis.

(a) método paralelo: para cada tipo de solo seleccionado para o ensaio de dessorção, preparam-se amostras com a mesma razão solo/solução em número igual ao número de intervalos de tempo em que pretende estudar-se a cinética de dessorção. Devem usar-se, de preferência, os intervalos de tempo do ensaio de cinética de adsorção; pode, contudo, prolongar-se de forma adequada o tempo total, de modo a permitir que o sistema atinja o equilíbrio de dessorção. Deve efectuar-se um ensaio em branco para cada tipo de solo e concentração da solução, utilizando uma massa de solo e um volume de solução de CaCl_2 0,01 M idênticos aos do ensaio principal, na ausência da substância em estudo. Deve ainda aplicar-se o mesmo procedimento de ensaio a uma amostra de controlo contendo apenas a substância em estudo dissolvida na solução de CaCl_2 0,01 M, na ausência de solo. Agitam-se as misturas solo-solução até atingir o equilíbrio de adsorção, como determinado na Etapa 2. Procede-se de seguida à separação das fases por centrifugação, recolhendo as fases aquosas na maior extensão possível. Os volumes de solução recolhidos são substituídos por iguais volumes de CaCl_2 0,01 M, na ausência de substância em estudo, agitando de novo. Removem-se as fases aquosas de modo tão completo quanto possível, efectuando-se determinações após, por exemplo, 2 h, no caso do primeiro tubo, 4 h no caso do segundo, 6 h no caso do terceiro, etc. até atingir o equilíbrio de dessorção.

(b) método sequencial: após o ensaio de cinética de adsorção, a mistura é centrifugada e a fase aquosa removida na maior extensão possível. O volume de solução removida é substituído por igual volume de CaCl_2 0,01 M, na ausência da substância em estudo. A nova mistura é agitada até atingir o equilíbrio de dessorção. Durante este período, procede-se à centrifugação da mistura a intervalos regulares, de modo a separar as fases. Determina-se de imediato a substância em estudo numa pequena alíquota da fase aquosa, prosseguindo o ensaio com a mistura original. O volume de cada alíquota recolhida deve ser inferior a 1% do volume total. Adiciona-se à mistura uma quantidade igual de solução de CaCl_2 0,01 M, com o objectivo de manter a razão solo/solução, mantendo a agitação até ao próximo intervalo.

Calcula-se a percentagem de dessorção em cada instante (D_{t_1}) e/ou intervalo ($D_{\Delta t_1}$) (de acordo com o objectivo do estudo), representando-a graficamente em função do tempo. Calcula-se também o coeficiente de dessorção no equilíbrio, K_{des} . As equações a aplicar são fornecidas na secção “Apresentação dos resultados” e no Anexo 5.

Resultados do ensaio de cinética de dessorção

A representação gráfica da percentagem de dessorção D_{t_1} e adsorção A_{t_1} em função do tempo permite estimar a reversibilidade do processo de adsorção. Caso o equilíbrio de dessorção seja atingido, mesmo num tempo duplo do tempo de equilíbrio de adsorção, e a dessorção total seja superior a 75% da quantidade adsorvida, o processo de adsorção é considerado reversível.

1.9.2.5.3 Isotérmicas de dessorção

As isotérmicas de dessorção de Freundlich são determinadas nos solos utilizados no ensaio das isotérmicas de adsorção. O ensaio de dessorção é efectuado em conformidade com o protocolo descrito na secção “Cinética de dessorção”, com a única diferença de que a fase aquosa é analisada uma única vez, no estado de equilíbrio de dessorção. Calcula-se a quantidade de substância em estudo dessorvida, representando graficamente o teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção em função da concentração de equilíbrio da substância em estudo na solução (ver a secção “Apresentação dos resultados” e o Anexo 5).

2. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os dados analíticos são apresentados na forma de quadro (ver Anexo 6). Deve fornecer-se os resultados das várias determinações e as médias calculadas, bem como as representações gráficas das isotérmicas de adsorção. Os cálculos são efectuados do modo descrito infra.

Para os fins do ensaio, considera-se que 1 cm^3 de solução aquosa possui a massa de 1g. Deste modo, a razão solo/solução pode ser expressa em massa/massa ou massa/volume com o mesmo valor numérico.

ADSORÇÃO

A adsorção (A_{t_i}) é definida como a percentagem de substância adsorvida no solo, relativamente à quantidade presente no início do ensaio e nas condições em causa. Caso a substância em estudo seja estável e não ocorra uma adsorção significativa nas paredes do recipiente, o valor de A_{t_i} em cada instante t_i é calculado através da equação:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

em que:

A_{t_i} = percentagem de adsorção no instante t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massa de substância em estudo adsorvida no solo no instante t_i (μg);

m_0 = massa de substância em estudo presente no recipiente de ensaio, no início do mesmo (μg).

O Anexo 5 fornece informações pormenorizadas sobre o modo de cálculo da percentagem de adsorção A_{t_i} tanto no caso do método paralelo como do método sequencial.

O coeficiente de distribuição K_d é a razão entre o teor de substância na fase edáfica e a concentração mássica da mesma na solução aquosa ao atingir o equilíbrio de adsorção, nas condições de ensaio.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{solo}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

em que:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = teor de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = concentração mássica da substância na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção ($\mu\text{g cm}^{-3}$), cuja determinação analítica tem em conta os valores obtidos nos ensaios em branco;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa de substância presente na solução, no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

m_{solo} = quantidade de fase edáfica, expressa em massa seca de solo (g);

V_0 = volume inicial de fase aquosa em contacto com o solo (cm^3).

A relação entre A_{eq} e K_d é dada por:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{solo}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

em que:

A_{eq} = percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção, %.

O coeficiente de adsorção normalizado relativo ao carbono orgânico K_{oc} exprime o coeficiente de distribuição K_d em função do teor de carbono orgânico da amostra de solo:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

em que:

$\%OC$ = percentagem de carbono orgânico na amostra de solo (g g^{-1}).

O coeficiente K_{oc} constitui um parâmetro característico da partição do carbono orgânico entre o solo ou sedimento e a água, nomeadamente no caso de compostos orgânicos não-polares. Existe uma correlação entre a adsorção das referidas substâncias e o teor de carbono orgânico do sólido adsorvente (7); os valores de K_{oc} dependem das características específicas das fracções húmicas cuja capacidade de adsorção diferem de modo considerável, devido, nomeadamente, à sua origem ou génese diversa.

2.1.1 **Isotérmicas de adsorção**

A equação que exprime as isotérmicas de adsorção de Freundlich relaciona a quantidade de substância em estudo adsorvida com a concentração da substância em estudo na solução, no estado de equilíbrio (equação 8).

Os dados são processados de modo idêntico ao descrito na secção "Adsorção", calculando-se, para cada recipiente de ensaio, o teor de substância em estudo adsorvida no solo após o ensaio de adsorção ($C_s^{ads}(eq)$, por vezes designado por x/m). Presume-se que o equilíbrio foi atingido e que $C_s^{ads}(eq)$ representa o valor no estado de equilíbrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{solo}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{solo}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

A equação de adsorção de Freundlich é dada por (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

ou, na forma linear:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

em que:

K_F^{ads} = Coeficiente de adsorção de Freundlich, cujas dimensões são de $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ apenas nos casos em que $1/n = 1$; em todos os restantes casos, o declive $1/n$ é introduzido na dimensão de K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$);

n = constante de regressão; $1/n$ situa-se, de modo geral, entre 0,7 e 1,0, mostrando que os dados de adsorção/dessorção são, com frequência, ligeiramente não-lineares.

Aplicam-se as equações (8) e (9), sendo os valores de K_F^{ads} e $1/n$ calculados por regressão linear, com o auxílio da equação 9. Calcula-se também o coeficiente de correlação r^2 da equação logarítmica. A figura 2 fornece um exemplo das representações em causa.

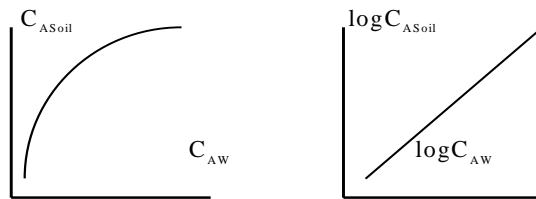


Fig. 2. Gráficos de adsorção de Freundlich (normal e linearizado)

2.1.2

Balço de massas

O balço de massas (MB) é definido como a percentagem de substância inicialmente presente que pode ser analiticamente recuperada na sequência de um ensaio de adsorção.

O tratamento dos dados é diferente no caso de solventes totalmente miscíveis em água, podendo aplicar-se o método descrito na secção "Dessorção" para determinar a quantidade de substância recuperada por extracção com solvente. Se o solvente for menos miscível em água, deve determinar-se a quantidade recuperada.

O balço de massas MB do processo de adsorção é calculado do modo que se segue; assume-se que o termo (m_E) corresponde à soma das massas da substância em estudo extraídas do solo e das paredes do recipiente de ensaio com um solvente orgânico:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

em que:

MB = balço de massas (%);

m_E = massa total de substância em estudo extraída do solo e das paredes do recipiente de ensaio em duas etapas (μg);

C_0 = concentração ponderal inicial da solução de ensaio em contacto com o solo ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

V_{rec} = volume de sobrenadante recuperado após atingir o equilíbrio de adsorção (cm^3).

2.2

DESSORÇÃO

A dessorção (D) é definida como a percentagem dessorvida de substância em estudo, relativamente à quantidade previamente adsorvida, nas condições de ensaio:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

em que:

D_{t_i} = percentagem de dessorção no instante t_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo dessorvida do solo no instante t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância em estudo adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg).

O Anexo 5 fornece directrizes para o cálculo da percentagem de dessorção D_{t_i} no caso dos métodos paralelo e sequencial.

O coeficiente de dessorção aparente (K_{des}) é a razão entre a quantidade de substância que permanece na fase edáfica e a concentração mássica da substância dessorvida na solução aquosa, ao atingir o estado de equilíbrio de dessorção, nas condições de ensaio:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{solo}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (12)$$

em que:

K_{des} = coeficiente de dessorção ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa total de substância em estudo dessorvida do solo no estado de equilíbrio de dessorção (μg);

V_T = volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção (cm^3).

A secção “Dessorção” do Anexo 5 fornece directrizes para o cálculo de $m_{aq}^{des}(eq)$.

Nota

Caso o ensaio de adsorção precedente tenha sido efectuado pelo método paralelo, considera-se que o volume V_T da equação (12) é igual a V_0 .

2.2.1

Isotérmicas de dessorção

A equação que exprime as isotérmicas de dessorção de Freundlich relaciona o teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo com a concentração de substância em estudo presente na solução no estado de equilíbrio de dessorção (equação 16).

Para cada recipiente de ensaio, o teor de substância que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção é calculado através da equação:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{solo}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ é definida como :

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_F} - m_{aq}^A \quad (\mu g) \quad (14)$$

em que:

$C_s^{des}(eq)$ = teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção ($\mu g g^{-1}$);

$m_m^{des}(eq)$ = massa de substância determinada analiticamente na fase aquosa, no estado de equilíbrio de dessorção (μg);

m_{aq}^A = massa de substância em estudo remanescente do equilíbrio de adsorção devido a uma substituição incompleta de volumes (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa de substância na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_F^F = volume de solução recolhido do recipiente para determinação da substância em estudo, no estado de equilíbrio de dessorção (cm^3);

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo ao atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3);

A equação de dessorção de Freundlich é dada por (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

ou, na forma linear:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

em que:

K_F^{des} = coeficiente de dessorção de Freundlich;

n = constante de regressão;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentração mássica da substância na fase aquosa, no estado de equilíbrio de dessorção ($\mu g cm^{-3}$).

As equações (16) e (17) podem ser representadas graficamente, calculando-se os valores de K_F^{des} e $1/n$ por regressão linear, através da equação 17.

Nota:

Caso o expoente $1/n$ da equação de adsorção ou dessorção de Freundlich seja unitário, a constante de adsorção ou dessorção de Freundlich (K_F^{ads} e K_F^{des}) é igual à constante de equilíbrio de adsorção ou dessorção (K_d e K_{des}), respectivamente, sendo lineares as representações de C_s em função de C_{aq} . Caso os referidos expoentes sejam diferentes de 1, a representação de C_s *versus* C_{aq} será não-linear, variando as constantes de adsorção e dessorção ao longo das isotérmicas.

2.2.2 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

- Identificação completa das amostras de solo utilizadas, incluindo:
 - identificação geográfica do local (latitude, longitude);
 - data de recolha das amostras;
 - perfil de utilização do solo (por exemplo, solo agrícola, florestal, etc.);
 - profundidade da recolha de amostras;
 - teor de areia/sedimentos/argila;
 - valores de pH (em solução de CaCl_2 0,01 M);
 - teor de carbono orgânico;
 - teor de matéria orgânica;
 - teor de azoto;
 - razão C/N;
 - capacidade de permuta catiónica (mmol/kg);
 - todas as informações relativas à recolha e armazenagem das amostras de solo;
 - se adequado, quaisquer informações relevantes para a interpretação dos processos de adsorção - dessorção da substância em estudo;
 - referência aos métodos utilizados para a determinação de cada parâmetro.
- informações adequadas sobre a substância em estudo;
- temperatura de ensaio;
- condições de centrifugação;
- processo analítico utilizado para a análise da substância em estudo;
- justificação do eventual recurso a um agente de solubilização na preparação da solução-mãe da substância em estudo;
- explicação das correcções efectuadas nos cálculos, se for caso disso;
- dados apresentados em conformidade com o formulário do Anexo 6 e representações gráficas;
- quaisquer informações e observações úteis para a interpretação dos resultados do ensaio.

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

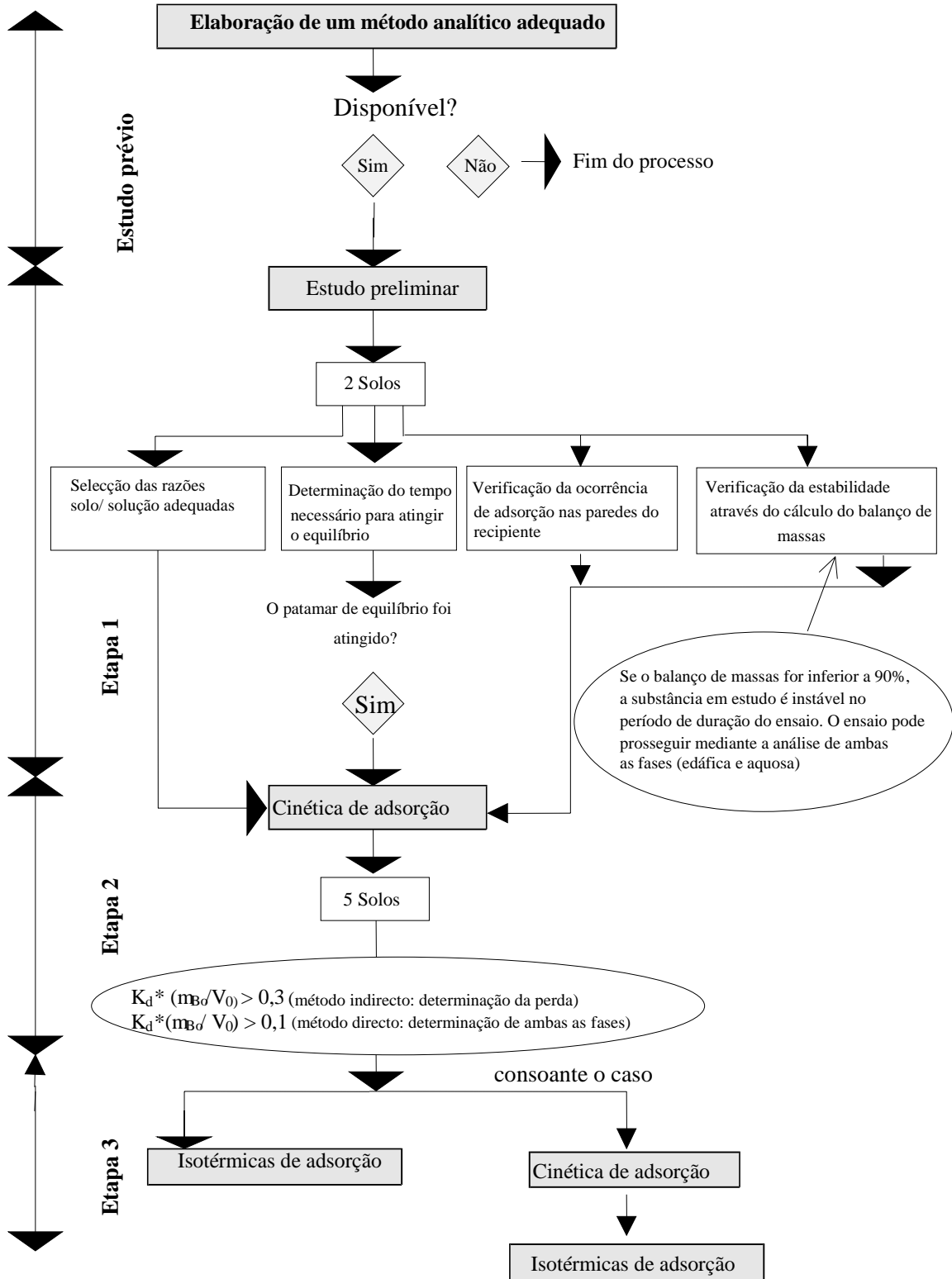
21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorpton estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", *CREAMS*, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. " Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), " Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D. (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

ANEXO 1

Protocolo de ensaio



ANEXO 2

INFLUÊNCIA DO RIGOR DO MÉTODO ANALÍTICO E DAS ALTERAÇÕES DE CONCENTRAÇÃO

NOS RESULTADOS DE ADSORÇÃO

A análise do quadro infra (84) torna evidente que, caso a diferença entre a massa inicial ($m_0=110 \mu\text{g}$) e a massa de equilíbrio ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})=100\mu\text{g}$) da substância em estudo na solução seja bastante reduzida, um erro de 5% na determinação da concentração de equilíbrio resulta num erro de 50% no cálculo do teor de substância adsorvida no solo ($m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$) e de 52,4% no cálculo de K_d .

Quantidade de solo $m_{\text{solo}} = 10 \text{ g}$
 Volume de solução $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}
	(μg)	($\mu\text{g cm}^{-3}$)		(μg)	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	A = 9%							
	100	1,000	valor real	10	1,00	valor real	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	A = 55%							
	50,0	0,500	valor real	60,0	6,00	valor real	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	A = 99%							
	1,100	0,011	valor real	108,9	10,89	valor real	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})]V_0}{m_{\text{solo}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{solo}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa da substância em estudo no solo, no estado de equilíbrio, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa da substância em estudo na fase aquosa, no estado de equilíbrio, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = teor da substância em estudo no solo, no estado de equilíbrio, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = concentração mássica da substância em estudo na fase aquosa, no estado de equilíbrio, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = erro analítico na determinação de $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R^\dagger = erro calculado devido ao erro analítico R.

ANEXO 3

TÉCNICAS DE ESTIMATIVA DE K_d

1. O recurso a técnicas de estimativa permite prever o valor de K_d com base na correlação, nomeadamente com os valores de P_{ow} (12)(39)(63-68), solubilidade em água (12)(19)(21)(39)(68-73) ou polaridade decorrentes da análise por HPLC de fase reversa (74-76). Como se mostra nos quadros 1 e 2, os valores de K_{oc} e K_{om} são calculados com base nas equações que se seguem, sendo o valor de K_d determinado de forma indirecta:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. As referidas correlações baseiam-se em dois pressupostos: (1) o teor de matéria orgânica de um solo é o principal factor determinante da adsorção de uma substância nesse solo; (2) As interacções envolvidas são principalmente não-polares. Em consequência, as referidas correlações: (1) não são aplicáveis, ou apenas são parcialmente aplicáveis, a substâncias polares; (2) não são aplicáveis aos casos em que o teor de matéria orgânica dos solos seja bastante reduzido (12). Além disso, embora seja possível obter correlações satisfatórias entre os valores de P_{ow} e da adsorção (19), o mesmo não sucede no que respeita à relação entre a solubilidade em água e a extensão da adsorção (19)(21); os estudos realizados até ao presente têm-se revelado bastante contraditórios.

3. Os quadros 1 e 2, respectivamente, fornecem alguns exemplos de correlações entre os coeficientes de adsorção e os coeficientes de partição octanol-água, bem como a solubilidade em água.

Quadro 1. Exemplos de correlações entre o coeficiente de distribuição de adsorção e o coeficiente de partição octanol-água; para mais exemplos, ver as referências (12) (68).

Substâncias	Correlações	Autores
Ureias substituídas	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Compostos aromáticos clorados	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarbonetos aromáticos	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles e Mantoura (1987) (67)

Quadro 2. Exemplos de correlações entre o coeficiente de distribuição de adsorção e a solubilidade em água; para mais exemplos, ver as referências (68) (69).

Substâncias	Correlações	Autores
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Compostos alifáticos e aromáticos clorados	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Compostos cíclicos (alifáticos e aromáticos)	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Diversas substâncias	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

ANEXO 4

CÁLCULOS PARA A DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CENTRIFUGAÇÃO

1. O tempo de centrifugação é dado pela seguinte fórmula, presumindo que as partículas possuem forma esférica:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Por motivos de simplificação, todos os parâmetros são apresentados em unidades não pertencentes ao SI (g, cm).

ω	=	velocidade angular (=2 π rpm/60), rad s ⁻¹ ;
rpm	=	rotações por minuto;
η	=	viscosidade da solução, g s ⁻¹ cm ⁻¹ ;
r_p	=	raio das partículas, cm;
ρ_s	=	densidade do solo, g cm ⁻³ ;
ρ_{aq}	=	densidade da solução, g cm ⁻³ ;
R_t	=	distância do centro do rotor da centrifugadora ao topo da solução no tubo de ensaio, cm;
R_b	=	distância do centro do rotor da centrifugadora à base do tubo de ensaio, cm;
R_b-R_t	=	altura da mistura solo/solução no tubo de ensaio, cm.

Na prática, devem utilizar-se tempos duplos dos calculados, de modo a garantir a separação completa.

2. A equação (1) pode ser simplificada, considerando que a viscosidade (η) e a densidade (ρ_{aq}) da solução são iguais à viscosidade e densidade da água a 25 °C; obtém-se, assim, $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$ g s⁻¹ cm⁻¹ e $\rho_{aq} = 1,0$ g.cm⁻³.

O tempo de centrifugação é dado pela fórmula (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. A equação (2) mostra a importância de dois parâmetros, designadamente o tempo (t) e a velocidade (rpm), na definição das condições de centrifugação tendo em vista a separação de partículas de dimensões específicas (no caso em estudo 0,1 μ m radianos): (1) a densidade do solo e (2) a altura da mistura no tubo de ensaio (R_b-R_t), ou seja, a distância entre o topo da solução e a base do tubo; como é óbvio, para um determinado volume, a altura da mistura no tubo depende do quadrado do respectivo raio.

4. A figura 1 apresenta o gráfico da variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm), para solos de densidades diversas (ρ_s) (Fig.1a) e diversas alturas da mistura nos tubos de ensaio (Fig.2a). A figura 1a evidencia a influência da densidade do solo; por exemplo, para um perfil de centrifugação clássico de 3000 rpm, o tempo de centrifugação é da ordem de, 240 min para um solo de 1,2 g cm³ de densidade, sendo de apenas 50 min para uma densidade de 2,0 g cm³. Do mesmo modo, a figura 1b mostra que, para um perfil de centrifugação clássico de 3000 rpm, o tempo de centrifugação é de cerca de 50 min para uma altura da mistura de 10 cm e apenas 7 min para uma altura de 1 cm. Todavia, é conveniente adoptar um equilíbrio adequado entre o requisito de menor altura possível na centrifugação e a facilidade de manipulação pelo experimentador na separação das fases após a centrifugação.

5. Além disso, na definição das condições experimentais para a separação de fases solo/solução é conveniente ter em conta a possível existência de uma “pseudo-fase” coloidal. As partículas coloidais, de diâmetro inferior a 0,2 μm , podem apresentar um impacto considerável no mecanismo de adsorção de uma substância numa suspensão de solo. Sempre que se executa uma centrifugação do modo descrito supra, os colóides permanecem na fase aquosa, sendo objecto de análise juntamente com esta última. Perdem-se, pois, as informações referentes ao seu impacto.

Caso o laboratório possua condições para efectuar ultracentrifugação ou ultrafiltração, a adsorção/dessorção de uma substância no solo pode ser estudada de modo mais aprofundado, permitindo obter informações sobre a adsorção da substância nos colóides. Neste caso, deve efectuar-se uma ultracentrifugação a 60.000 rpm/min ou uma ultrafiltração com um filtro de 100.000 Daltons de porosidade, de modo a separar as três fases (solo, colóides, solução). O protocolo de ensaio deve também ser alterado de modo a assegurar a determinação da substância em estudo nas três fases.

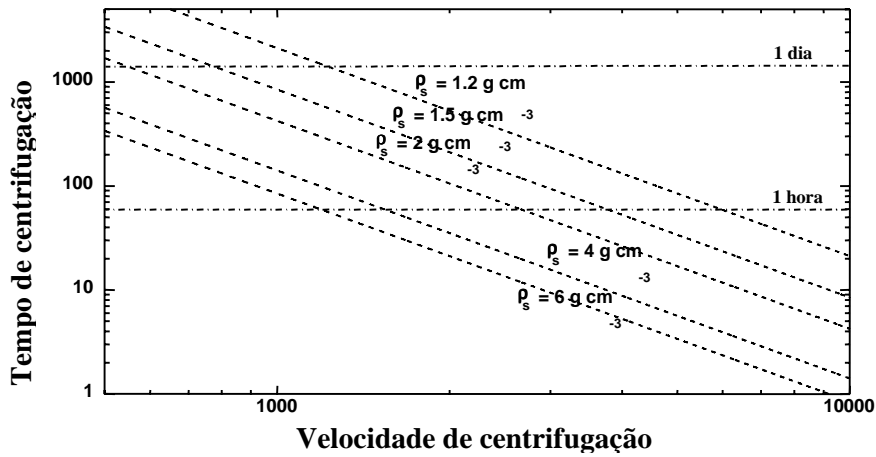


Fig. 1a. Variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm), para solos de diversas densidades (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$ a 25°C .

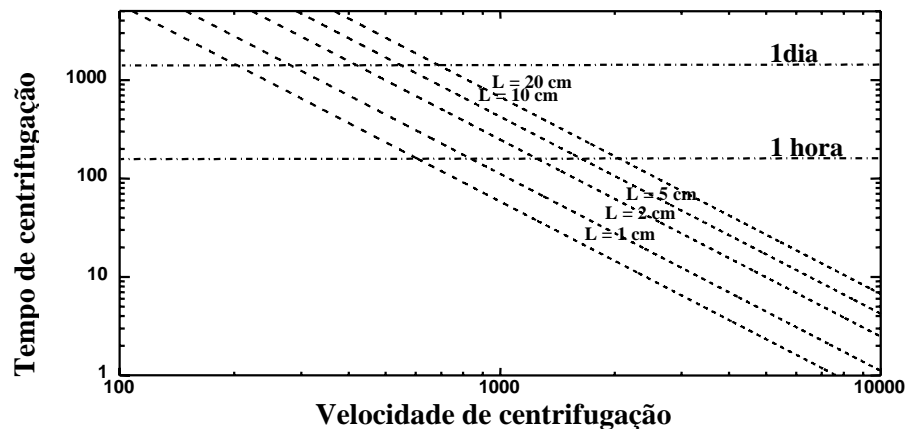
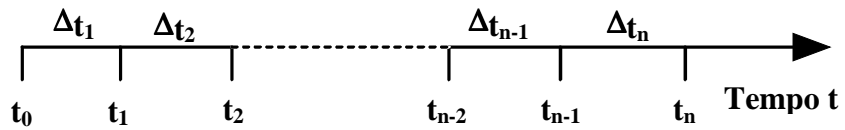


Fig. 1b. Variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm) para diversas alturas da mistura nos tubos de ensaio $(R_b - R_t) = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$ a 25°C e $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

ANEXO 5

CÁLCULO DA ADSORÇÃO A (%) E DA DESSORÇÃO D (%)

O esquema cronológico do ensaio é o seguinte:



Em todos os cálculos, presume-se que a substância de ensaio é estável e não exhibe uma adsorção significativa nas paredes do recipiente.

ADSORÇÃO A (A%)

a) Método paralelo

Para cada tubo de ensaio (i), a percentagem de adsorção em cada instante (t_i) é calculada de acordo com a equação:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Os termos da equação podem ser calculados do seguinte modo:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

em que:

A_{t_i} = percentagem de adsorção (%) no instante t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massa da substância em estudo presente no solo no instante t_i em que a análise é efectuada (μg);

m_0 = massa da substância em estudo presente no tubo de ensaio no início do mesmo (μg);

C_0 = concentração ponderal inicial da solução em contacto com o solo ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = concentração ponderal da substância na fase aquosa no instante t_i em que a análise é efectuada ($\mu\text{g cm}^{-3}$); a determinação analítica desta concentração tem em conta os valores obtidos nos ensaios em branco.

V_0 = volume inicial de solução em contacto com o solo (cm^3).

Os valores relativos à percentagem de adsorção A_{t_i} ou $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio. As figuras 1 e 2, respectivamente, fornecem exemplos das representações em causa.

⁴ Equação aplicável tanto no caso do método directo como do método indirecto. As restantes equações são aplicáveis apenas no caso do método indirecto.

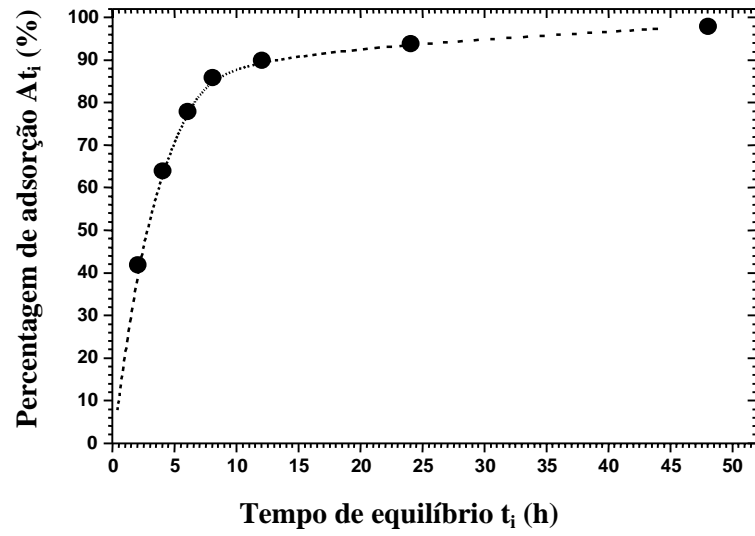


Fig. 1. Representação gráfica do equilíbrio de adsorção

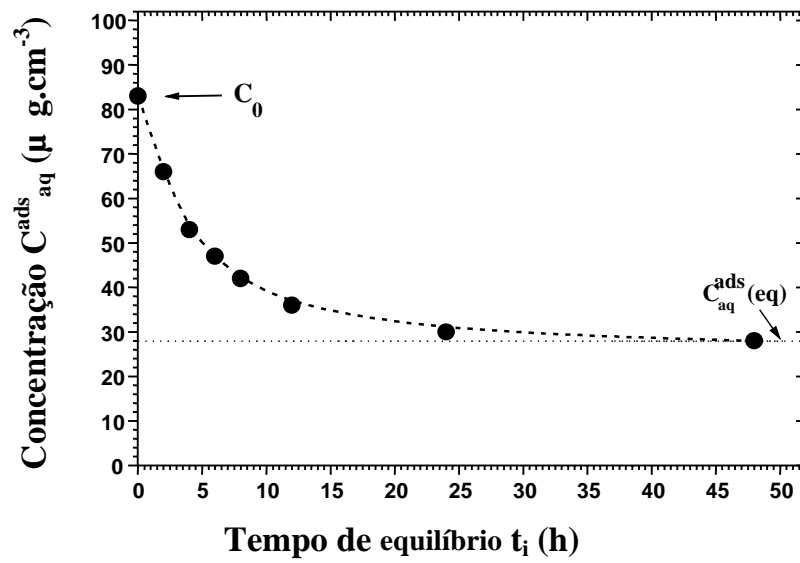


Fig.2. Concentração mássica da substância em estudo na fase aquosa (C_{aq}) em função do tempo

b) Método sequencial

As equações que se seguem têm em consideração o facto de o ensaio de adsorção se basear em determinações da substância em estudo em pequenas alíquotas da fase aquosa, a intervalos específicos.

- A quantidade de substância adsorvida no solo em cada intervalo é calculada do seguinte modo:

- primeiro intervalo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

- segundo intervalo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

- terceiro intervalo $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

- enésimo intervalo $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- A percentagem de adsorção em cada intervalo, $A_{\Delta t_i}$, é calculada por recurso à seguinte equação:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

enquanto que a percentagem de adsorção (A_{t_i}) no instante t_i é dada por:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Equações aplicáveis tanto no caso do método directo como do método indirecto. As restantes equações são aplicáveis apenas no caso do método indirecto.

Os valores correspondentes à adsorção, A_{t_i} ou $A_{\Delta t_i}$ (de acordo com o objectivo do estudo) são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio.

- No instante de equilíbrio t_{eq} :

- a massa de substância em estudo adsorvida no solo é dada por:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- a massa de substância em estudo na solução é dada por:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- a percentagem de adsorção no estado de equilíbrio é calculada com base na equação:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

Os parâmetros utilizados são definidos do seguinte modo:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa de substância adsorvida no solo nos intervalos

$\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ respectivamente (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = massa de substância em estudo determinada numa alíquota v_a^A nos intervalos t_1, t_2, \dots, t_n respectivamente (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa de substância presente na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

v_a^A = volume da alíquota em que se determina a substância em estudo (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = percentagem de adsorção correspondente ao intervalo Δt_i (%);

A_{eq} = percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção (%).

DESSORÇÃO D (%)

Considera-se que o ensaio de cinética de dessorção tem início no instante t_0 em que o volume máximo recuperado da solução da substância em estudo (após atingir o equilíbrio de adsorção) é substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M.

a) Método paralelo

Num determinado instante t_i determina-se a massa da substância em estudo presente na fase aquosa recolhida do tubo i (V_R^i), calculando-se a massa dessorvida de acordo com a equação:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_R^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

No estado de equilíbrio de dessorção, $t_i = t_{eq}$ e, portanto, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

A massa de substância em estudo dessorvida no intervalo Δt_i é dada pela equação:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

A percentagem de dessorção é calculada do seguinte modo:

- num instante t_i , com base na equação:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- num intervalo Δt_i , com base na equação:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

em que:

D_{t_i} = percentagem de dessorção no instante t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = percentagem de dessorção correspondente ao intervalo Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo dessorvida no instante t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = massa de substância em estudo dessorvida no intervalo Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo determinada analiticamente no instante t_i num volume V_R^i de solução recolhida para análise (μg);

m_{aq}^A = massa de substância em estudo excluída do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa da substância em estudo presente na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo depois de atingido o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de CaCl_2 0,01 M (cm^3);

V_T^i = volume de solução recolhido do tubo (i) para a determinação da substância em estudo, no ensaio de cinética de dessorção (cm^3).

Os valores correspondentes à dessorção D_{t_i} ou $D_{\Delta t_i}$ (de acordo com o objectivo do estudo) são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio.

b) Método sequencial

As equações que se seguem têm em consideração o facto de o ensaio de adsorção precedente se basear em determinações da substância em estudo em pequenas alíquotas (v_a^{A}) da fase aquosa (método sequencial descrito na secção 1.9. “Realização do ensaio”). Presume-se que: a) o volume de sobrenadante removido do tubo na sequência do ensaio de cinética de adsorção foi substituído pelo mesmo volume de solução de CaCl_2 0,01 M (V_R) e b) o volume total da fase aquosa em contacto com o solo (V_T) durante o ensaio de cinética de dessorção permanece constante, sendo dado pela equação:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

Num determinado instante t_i :

- Determina-se a massa da substância em estudo presente numa pequena alíquota (v_a^{D}), calculando-se a massa dessorvida de acordo com a equação:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^{\text{D}})}{V_T} \right) \quad (19)$$

- No estado de equilíbrio de dessorção $t_i = t_{\text{eq}}$ e, portanto, $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$.
- A percentagem de dessorção D_{t_i} é calculada por recurso à equação:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

Num intervalo (Δt_i):

- A quantidade de substância desorvida em cada intervalo é calculada do seguinte modo:

— primeiro intervalo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{e} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— segundo intervalo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad \text{e}$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— enésimo intervalo $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$\text{e } m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Por fim, a percentagem de desorção em cada intervalo, $D_{\Delta t_i}$, é calculada por recurso à seguinte equação:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

enquanto que a percentagem de desorção D_{t_i} no instante t_i é dada por:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

os parâmetros supra são definidos do seguinte modo:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = massa de substância que permanece adsorvida no solo nos intervalos $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$, respectivamente (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = massa de substância em estudo desorvida nos intervalos $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ respectivamente (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = massa de substância determinada numa alíquota nos instantes t_1, t_2, \dots, t_n respectivamente (μg);

V_T = volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial (cm^3);

m_{aq}^A = massa de substância em estudo excluído do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo após atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de CaCl_2 0,01 M (cm^3);

v_a^D = volume da alíquota recolhida do tubo para fins analíticos (i), durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial (cm^3);

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

ANEXO 6

ADSORÇÃO-DESSORÇÃO EM SOLOS: FICHA DE APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Adequabilidade do método analítico

Massa da amostra de solo	g	
Massa seca de solo	g	
Volume de solução de CaCl ₂	cm ³	
Concentração nominal final da solução	µg cm ⁻³	
Concentração analítica final da solução	µg cm ⁻³	

Princípio do método analítico utilizado:

Calibração do método analítico:

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Metodologia analítica adoptada:

Método indirecto

Método paralelo

Método sequencial

Método directo

Ensaio de adsorção: amostras

	Símbolo	Unidades	Tempo necessário para atingir equilíbrio	Tempo necessário para atingir o equilíbrio	Tempo necessário para atingir o equilíbrio	Tempo necessário para atingir o equilíbrio
Tubo N°						
Solo: massa determinada	-	g				
Solo: massa seca	m_{solo}	g				
Volume calculado de humidade no solo	V_{WS}	cm^3				
Volume de solução de CaCl_2 0,01 M necessário para equilibrar o solo		cm^3				
Volume de solução-mãe		cm^3				
Volume total da fase aquosa em contacto com o solo	V_0	cm^3				
Concentração inicial da solução de ensaio	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Massa de substância em estudo no início do ensaio	m_0	μg				
Após agitação e centrifugação						
Método indirecto						
Método paralelo						
Concentração da substância em estudo na fase aquosa, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{\text{ad}}^{\text{ads}}(t_i)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Método sequencial						
Massa de substância em estudo determinada na alíquota v_a^A	$m_m^{\text{ads}}(t_i)$	μg				
Método directo						
Massa da substância em estudo adsorvida no solo	$m_s^{\text{ads}}(t_i)$	μg				
Cálculo da adsorção						
Adsorção	A_{t_i}	%				
	$A_{\Delta t_i}$	%				
Método						
Coefficiente de	K_d	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$				
Método						
Coefficiente de adsorção	K_{oc}	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$				
Método						

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca de solo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Adsorção: ensaios em branco e de controlo

			Branco		Branco		Controlo	
Tubo N°								
Massa da amostra de solo	-	g					0	0
Teor de humidade calculado no solo		cm ³					-	-
Volume de solução de CaCl ₂ 0,01 M adicionado		cm ³						
Volume de solução-mãe da substância em estudo adicionado		cm ³	0	0				
Volume total da fase aquosa (calculado)		cm ³					-	-
Concentração inicial da substância em estudo na fase aquosa		µg						
Após agitação e centrifugação								
Concentração da fase aquosa		µg						

Nota: Aditar colunas suplementares, se necessário

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 °C 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Balço de massas

	Símbolo	Unidades				
Tubo No.						
Massa da amostra de solo	-	g				
Massa seca de solo	msolo	g				
Volume de água calculado no solo	V _{ws}	ml				
Volume de solução de CaCl ₂ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		ml				
Volume de solução-mãe		cm ³				
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo	V ₀	cm ³				
Concentração inicial da solução de ensaio	C ₀	µg cm ⁻³				
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	-	h				
Após agitação e centrifugação						
Concentr.da subst. em estudo na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	C _{aq} ^{ads} (eq)	µg cm ⁻³				
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	t _{eq}	h				
Primeira diluição com solvente						
Volume de fase aquosa removido	V _{rec}	cm ³				
Volume de solvente adicionado	ΔV	cm ³				
Primeira extração com solvente						
Intensidade do sinal do detector (solvente)	S _{E1}	var.				
Conc. da subst. em estudo no solvente	C _{E1}	µg cm ⁻³				
Massa de substância extraída do solo e das paredes do recipiente	m _{E1}	µg				
Segunda diluição com solvente						
Volume de solvente removido	ΔV _s	cm ³				
Volume de solvente adicionado	ΔV'	cm ³				
Segunda extração com solvente						
Intensidade do sinal do detector (solvente)	S _{E2}					
Conc. da subst. em estudo no solvente	C _{E2}	µg cm ⁻³				
Massa de substância extraída do solo e das paredes do recipiente	m _{E2}	µg				
Massa total de subst em estudo extraída nas duas etapas	m _E					
Balço de massas	MB	%				

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca de solo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Isotérmicas de adsorção

	Símbolo	Unidades								
Tubo No.										
Massa da amostra de solo	-	g								
Massa seca de solo	E	g								
Volume de água calculado no solo	V_{ws}	cm^3								
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		cm^3								
Volume de solução-mãe adicionado		cm^3								
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo (calculado)	V_0	cm^3								
Concentração da solução	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Tempo necessário para atingir o equilíbrio		h								
Após agitação e centrifugação										
Concentração da substância na fase aquosa, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatura		°C								
Massa adsorvida por unidade de solo	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Análise por regressão linear:

valor de K_F^{ads} :

valor de 1/n:

coeficiente de regressão r^2 :

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Metodologia analítica adoptada:

Método
indirecto

Método
paralelo

Método
sequencial

Ensaio de dessorção

	Símbolo	Unidades	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo
Nº do tubo no ensaio de adsorção						
Massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	$m_s^{ads} (eq)$	μg				
Volume de fase aquosa removido e substituído por sol. de $CaCl_2$ 0,01 M	V_R	cm^3				
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo	PM V_0	cm^3				
	SM V_T	cm^3				
Massa de substância em estudo excluída do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes	m_{aq}^A	μg				
Cinética de dessorção						
Massa determinada de substância dessorvida do solo no instante t_i	$m_m^{des}(t_i)$	μg				
Volume de solução recolhida do tubo (i) para determinação da substância em estudo	PM v_f^i	cm^3				
	SM v_a^D	cm^3				
Massa de substância dessorvida do solo no instante t_i (calculada)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Massa de substância dessorvida do solo no intervalo Δt_i (calculada)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				
Porcentagem de dessorção						
Dessorção no instante t_i	D_{t_i}	%				
Dessorção no intervalo Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coeficiente de dessorção aparente	K_{des}					

PM: Método paralelo

SM: Método sequencial

C.19. ESTIMATIVA DO VALOR DO COEFICIENTE DE ADSORÇÃO (K_{oc}) EM SOLOS E EM LAMAS DE DEPURAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

1. MÉTODO

O presente Método baseia-se na publicação OECD TG121 (2000) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O comportamento absorptivo e/ou adsorptivo das substâncias presentes em solos ou lamas de depuração pode ser descrito por meio de parâmetros determinados experimentalmente, através do Método de Ensaio C18. O coeficiente de adsorção é um parâmetro importante, definido como a razão entre a concentração da substância no solo/lamas e a concentração da substância na fase aquosa, em condições de equilíbrio de adsorção. O coeficiente de adsorção normalizado para o teor de carbono orgânico no solo (K_{oc}), é um indicador útil da capacidade de ligação de um composto químico à matéria orgânica presente no solo e nas lamas de depuração, permitindo que se estabeleçam comparações entre os diferentes compostos químicos. Este parâmetro pode ser estimado através de correlações com a solubilidade em água e com o coeficiente de partição n-octanol/água (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

O método experimental descrito no presente ensaio utiliza a técnica HPLC para estimar o coeficiente de adsorção K_{oc} em solos e em lamas de depuração (8). Os valores estimados são mais fiáveis que os obtidos através do método de cálculos QSAR (“Quantitative Structure-Activity Relationships”, relações quantitativas estrutura/atividade) (9). Por se tratar de um método estimativo, o presente método experimental não pode substituir completamente as experiências em reator descontínuo que são utilizadas no Método de Ensaio C18. No entanto, o valor estimado para K_{oc} pode ser útil na escolha dos parâmetros de ensaio adequados para estudos de adsorção/dessorção de acordo com o Método de Ensaio C18, através do cálculo de K_d (coeficiente de distribuição) ou de K_f (coeficiente de adsorção de Freundlich), segundo a equação 3 (ver ponto 1.2).

1.2 DEFINIÇÕES

K_d : Coeficiente de distribuição. Este coeficiente é definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio (C), de uma substância de ensaio dissolvida num sistema bifásico constituído por um componente com comportamento absorptivo e/ou adsorptivo (solo ou lamas de depuração) e uma fase aquosa. Esta grandeza é adimensional quando as concentrações em ambas as fases são expressas em peso/peso. No caso da concentração da fase aquosa ser expressa em peso/volume, as unidades utilizadas são ml.g^{-1} . O valor de K_d pode variar com as propriedades do componente com comportamento absorptivo e/ou adsorptivo, assim como depender da sua concentração.

$$K_d = \frac{C_{solo}}{C_{aq}} \text{ ou } \frac{C_{lamas}}{C_{aq}} \quad (1)$$

em que:

C_{solo} = concentração da substância de ensaio no solo, no equilíbrio ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

C_{lamas} = concentração da substância de ensaio nas lamas, no equilíbrio, ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

C_{aq} = concentração da substância de ensaio na fase aquosa, no equilíbrio, ($\mu\text{g.g}^{-1}$, $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

K_f : Coeficiente de adsorção de Freundlich. Este coeficiente é definido como a concentração da substância de ensaio no solo ou nas lamelas de depuração (x/m) quando a concentração de equilíbrio na fase aquosa (C_{aq}) é igual a um. Esta grandeza é expressa em µg.g⁻¹ de componente com comportamento adsorptivo e/ou adsorptivo. O valor de K_f pode ser afectado pelas propriedades desse componente.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

em que:

x/m = quantidade da substância de ensaio x (µg) adsorvida numa quantidade m (g) de componente com comportamento adsorptivo e/ou adsorptivo, no equilíbrio

1/n = declive da isotérmica de adsorção de Freundlich

C_{aq} = concentração da substância de ensaio na fase aquosa, no equilíbrio (µg.ml⁻¹)

$$\text{Quando } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Coeficiente de distribuição (K_d) ou coeficiente de adsorção de Freundlich (K_f) normalizados para o teor de carbono orgânico (f_{oc}), de um componente com comportamento adsorptivo e/ou adsorptivo. Esta grandeza é um indicador adequado do grau de adsorção entre a substância e o componente com comportamento adsorptivo e/ou adsorptivo, principalmente no caso de compostos químicos não ionizados, permitindo que sejam feitas comparações entre diferentes compostos químicos. Dependendo das unidades de K_d ou de K_f, o K_{oc} pode ser adimensional ou expresso em ml.g⁻¹ ou µg.g⁻¹ de matéria orgânica:

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (adimensional ou ml.g}^{-1}\text{)} \text{ ou } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Embora a relação entre K_{oc} e K_d não seja sempre linear, pelo que os valores de K_{oc} podem variar de solo para solo, esta variabilidade é significativamente reduzida comparativamente à registada para os valores de K_d ou K_f.

O coeficiente de adsorção (K_{oc}) é deduzido a partir do factor de capacidade (k'), utilizando uma curva de calibração de log k' em função de log K_{oc} dos compostos de referência seleccionados.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

em que:

t_R : tempo de retenção em HPLC da substância de ensaio e da substância de referência (em minutos)

t₀ : tempo-limite em HPLC (minutos) (ver ponto 1.8.2).

P_{ow} : Coeficiente de partição octanol-água. Este coeficiente define-se como a razão entre as concentrações da substância dissolvida em n-octanol e em água. Trata-se de uma grandeza adimensional

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

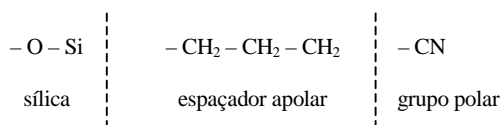
1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Antes da utilização do método, é necessário conhecer a fórmula estrutural, o grau de pureza e a constante de dissociação (caso seja adequado). Será útil dispor de informações relativas à solubilidade em água e em solventes orgânicos, ao coeficiente de partição octanol-água e às características de hidrólise.

De forma a correlacionar os valores de retenção, medidos em HPLC, de uma substância de ensaio com o seu coeficiente de adsorção, K_{oc} , deverá ser traçada uma curva de calibração de $\log K_{oc}$ em função de $\log k'$. Deverão ser utilizados, no mínimo, seis valores de referência, dos quais, pelo menos um deverá estar acima e outro abaixo do valor esperado para a substância de ensaio. O grau de exactidão do método será melhorado significativamente se forem utilizadas substâncias de referência estruturalmente relacionadas com a substância de ensaio. Caso estes dados não estejam disponíveis, cabe ao analista seleccionar as substâncias de calibração adequadas. Nesse caso, deverá ser escolhido um conjunto mais abrangente de substâncias, estruturalmente heterogêneas. Nas Tabelas 1 e 3 do Anexo apresentam-se listas das substâncias e valores de K_{oc} que podem ser utilizados para as lamas de depuração e para os solos, respectivamente. A selecção de outras substâncias de calibração deverá ser devidamente justificada.

1.4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O HPLC é realizado em colunas analíticas com enchimento de cianopropilo comercial em fase sólida, contendo grupos lipofílicos e grupos polares. É utilizada uma fase estacionária com polaridade moderada baseada numa matriz de sílica.



O princípio do método de ensaio é semelhante ao utilizado no Método de Ensaio A.8 (Coeficiente de Partição, Método de HPLC). A substância de ensaio interage com a fase estacionária ao passar pela coluna juntamente com a fase móvel, sendo retardada em resultado da partição entre as fases móvel e estacionária. A composição mista da fase estacionária, que contém grupos polares e grupos apolares, permite que a interacção dos grupos polares e apolares de determinada molécula ocorra de forma semelhante à que se verifica com a matéria orgânica em matrizes de solo ou de lamas de depuração, possibilitando o estabelecimento de uma relação entre o tempo de retenção na coluna e o coeficiente de adsorção à matéria orgânica.

O pH tem uma influência significativa no comportamento adsorptivo e/ou adsorvido, sobretudo no caso de substâncias polares. Em solos agrícolas ou em tanques de estações de tratamento de águas residuais, o pH varia normalmente entre 5,5 e 7,5. Relativamente a substâncias ionizáveis, deverão ser efectuados dois ensaios, um com a forma ionizada e outro com a forma não ionizada em soluções tampão adequadas, apenas nos casos em que pelo menos 10 % do composto de ensaio se encontre dissociado a pH entre 5,5 e 7,5.

Uma vez que, para avaliar os resultados, utiliza-se apenas a relação entre a retenção na coluna de HPLC e o coeficiente de adsorção, não é necessário utilizar qualquer método quantitativo, determinar o tempo de retenção. Caso se disponha de um conjunto adequado de substâncias de referência e estejam estabelecidas condições experimentais padrão, o presente método constitui um modo rápido e eficaz para estimar o valor do coeficiente de adsorção K_{oc} .

O método de HPLC é aplicável a substâncias químicas (marcadas ou não) para as quais exista um sistema de detecção adequado (por ex., espectrofotômetro, detector de radioatividade) e que sejam suficientemente estáveis durante o período de ensaio. O método pode ser particularmente útil no caso de produtos químicos que sejam difíceis de estudar com outros sistemas experimentais (ou seja, substâncias voláteis, substâncias que não são solúveis em água em concentrações que possam ser determinadas analiticamente, substâncias que apresentem uma elevada afinidade para a superfície dos sistemas de incubação). O método pode ser utilizado para misturas que apresentam bandas de eluição não resolvidas. Nesse caso, devem ser referidos os limites superior e inferior dos valores de $\log K_{oc}$ dos compostos presentes na mistura de ensaio.

As impurezas podem por vezes representar um problema para a interpretação dos resultados de HPLC. No entanto, a sua influência pode ser minimizada se a substância de ensaio puder ser inequivocamente identificada pelo método analítico e separada das impurezas.

O presente método encontra-se validado para as substâncias descritas na Tabela 1 do Anexo, tendo sido igualmente aplicado a uma série de outros compostos químicos pertencentes às seguintes famílias de compostos:

- Aminas aromáticas (por ex., trifluralina, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilnilina, N-metilnilina, 1-naftilamina);
- Ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (por ex., éster metílico do ácido benzóico, éster etílico do ácido 3,5-dinitrobenzóico);
- Hidrocarbonetos aromáticos (por ex., tolueno, xileno, etilbenzeno, nitrobenzeno);
- Ésteres do ácido ariloxifenoxipropiónico (por ex., diclofop-metilo, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-P-etilo);
- Fungicidas benzimidazólicos e imidazólicos (por ex., carbendazim, fuberidazol, triazóxido);
- Amidas de ácidos carboxílicos (por ex., 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida);
- Hidrocarbonetos clorados (por ex., endosulfan, DDT, hexaclorobenzeno, quintozeno, 1,2,3-triclorobenzeno);
- Inseticidas organo-fosforados (por ex., azinfos-metilo, dissulfotão, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);
- Fenóis (por ex., fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol);
- Derivados da fenilureia (por ex., isoproturão, monolinurão, pencicurão);
- Corantes (por ex., Amarelo Ácido 219, Azul Básico 41, Vermelho Directo 81);
- Hidrocarbonetos poliaromáticos (por ex., acenafteno, naftaleno);
- Herbicidas do tipo 1,3,5-triazina (por ex., prometrino, propazina, simazina, terbutrina);
- Derivados de triazole (por ex., tebuconazole, triadimefona, tradimenol, triapentenol).

O presente método não é aplicável a substâncias que reajam com o eluente ou com a fase estacionária nem a substâncias que interajam de forma específica com componentes inorgânicos (por ex., formação de agregados de complexos com minerais argilosos). O presente método pode não ser adequado para a análise de surfactantes, compostos inorgânicos ou ácidos e bases moderadamente fortes ou fortes. O presente método permite determinar valores de $\log K_{oc}$ entre 1,5 e 5,0. Na medição de substâncias ionizáveis deve utilizar-se uma fase móvel tamponada, sendo necessário tomar precauções de modo a evitar a precipitação dos componentes do tampão ou da substância de ensaio.

1.6 CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.6.1 **Exactidão**

De um modo geral, o coeficiente de adsorção de uma substância de ensaio pode ser estimado com uma margem de erro de $\pm 0,5$ unidades de logaritmo, relativamente ao valor determinado em reactor descontínuo (ver Tabela 1 do Anexo). Poderá obter-se um grau de exactidão superior se se utilizarem substâncias de referência estruturalmente relacionadas com a substância de ensaio.

1.6.2 **Repetitividade**

Cada determinação deve ser feita pelo menos em duplicado. Os valores de $\log K_{oc}$ obtidos em cada medição devem encontrar-se numa gama de 0,25 unidades de logaritmo.

1.6.3 **Reprodutibilidade**

A experiência obtida até ao momento com a aplicação do presente método suporta a sua validade. Numa análise do método de HPLC, realizada com 48 substâncias (pesticidas, na sua maior parte) relativamente às quais existiam valores fiáveis de K_{oc} em solos, o coeficiente de correlação obtido foi de $R = 0,95$ (10)(11).

De modo a melhorar e validar o presente método, foi efectuado um ensaio comparativo inter-laboratorial no qual participaram 11 laboratórios (12). Os resultados desse ensaio são apresentados na Tabela 2 do Anexo.

1.7 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1 **Estimativa Preliminar do Coeficiente de Adsorção**

O coeficiente de partição octanol-água P_{ow} ($= K_{ow}$), assim como, em certa medida, a solubilidade em água, podem ser utilizados como indicadores da extensão da adsorção, em particular para substâncias não-ionizáveis, podendo assim ser utilizados numa primeira aproximação com vista a determinar a gama de variação do valor do coeficiente de adsorção. Relativamente a vários grupos de compostos químicos. Têm sido publicadas uma série de correlações úteis relativamente a vários grupos de compostos químicos (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 **Equipamento**

É necessário um cromatógrafo de fase líquida equipado com uma bomba de pulsação livre e um equipamento de detecção adequado. Recomenda-se a utilização de uma válvula de injeção com ciclos de injeção. Deverão ser utilizadas resinas comerciais de cianopropilo quimicamente ligado a uma base de sílica (por ex., Hypersil e Zorbax CN). Poderá interpor-se uma coluna de protecção do mesmo material entre o sistema de injeção e a coluna analítica. A eficiência de separação das colunas poderá variar substancialmente em função do fabricante. Como referência, relativamente aos factores de capacidade k' deverão ser atingidos os seguintes valores: $\log k' > 0,0$ para $\log K_{oc} = 3,0$ e $\log k' > -0,4$ para $\log K_{oc} = 2,0$, quando se utiliza uma fase móvel de metanol/água nas proporções de 55/45 %.

1.7.3 Fases móveis

Foram ensaiadas diversas fases móveis, sendo recomendadas as duas seguintes:

- metanol/água (55/45 % v/v)
- metanol/0,01 M tampão citrato pH 6,0 (55/45 % v/v)

Na preparação do solvente de eluição, deve utilizar-se metanol com grau de pureza para HPLC e água destilada ou tampão citrato. Os gases da mistura devem ser eliminados antes da sua utilização. Deve utilizar-se uma eluição isocrática. Se o uso de misturas metanol/água não for apropriado, pode tentar utilizar-se outras misturas água/ solventes orgânicos como, por exemplo, etanol/água ou acetonitrilo/água. Para compostos ionizáveis, é recomendada a utilização da solução tampão, de modo a estabilizar o pH. Deverão tomar-se precauções para evitar a precipitação de sais e a deterioração da coluna, que podem ocorrer com algumas misturas de fase orgânica/tampão.

Não devem ser utilizados aditivos, como reagentes de pares iónicos, uma vez que estes podem afectar as propriedades absorptivas e/ou adsorptivas da fase estacionária, de uma forma que poderá ser irreversível. É por esta razão, obrigatório que os ensaios com aditivos sejam realizados em colunas separadas do mesmo tipo.

1.7.4 Solutos

Tanto as substâncias de ensaio como as de referência devem ser dissolvidas na fase móvel.

1.8 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.8.1 Condições de ensaio

Deve ser registada a temperatura à qual se efectuam as medidas. É fortemente recomendada a utilização de um compartimento de colunas com controlo de temperatura, de modo a garantir condições de temperatura constante durante a calibração, de avaliação prévia e das medições da substância de ensaio.

1.8.2 Determinação do tempo limite t_0

Podem ser utilizados dois métodos diferentes na determinação do tempo limite t_0 (ver também ponto 1.2).

1.8.2.1 *Determinação do tempo limite t_0 através de uma série homóloga*

Este procedimento provou dar origem a valores de t_0 fiáveis e padronizados. Pormenores sobre este método podem ser encontrados no Método de Ensaio A.8: Coeficiente de Partição (n-octanol/água), Método de HPLC.

1.8.2.2 *Determinação do tempo limite t_0 através de substâncias inertes que não são retidas pela coluna*

Esta técnica baseia-se na injeção de soluções de formamida, ureia ou nitrato de sódio. As medições devem ser feitas, pelo menos, em duplicado.

1.8.3 **Determinação dos tempos de retenção t_R**

As substâncias de referência devem ser seleccionadas de acordo com o procedimento descrito no ponto 1.3. Para determinar os respectivos tempos de retenção, podem ser injectadas misturadas desde que se tenha confirmado que o tempo de retenção de cada um dos padrões não é afectado pela presença dos outros padrões. A calibração deve ser efectuada a intervalos regulares, pelo menos duas vezes por dia, de modo a poder detectar quaisquer alterações inesperadas no comportamento da coluna. Para uma boa prática laboratorial, as injeções de calibração devem ser efectuadas antes e depois da injeção da substância de ensaio, de modo a confirmar se não houve alterações nos tempos de retenção. As substâncias de ensaio são injectadas separadamente, em quantidades o mais reduzidas possível (de modo a evitar a sobrecarga da coluna), e determinados os seus tempos de retenção.

Para aumentar o grau de confiança das medições, as determinações devem ser feitas pelo menos em duplicado. Os valores de $\log K_{oc}$ obtidos em cada medição devem manter-se numa gama de 0,25 unidades de logaritmo.

1.8.4 **Avaliação**

Os factores de capacidade k' são calculados a partir do tempo limite t_0 e dos tempos de retenção t_R das substâncias de referência seleccionadas, de acordo com a equação 4 (ver ponto 1.2.)

Os valores de $\log k'$ das substâncias de referência são em seguida representados graficamente em função dos respectivos valores de $\log K_{oc}$, obtidos nos ensaios em reactor descontínuo fornecidos nas Tabelas 1 e 3 do Anexo. Através deste gráfico, o valor de $\log k'$ de uma substância de ensaio é então utilizado para determinar o seu valor de $\log K_{oc}$. Se os resultados obtidos revelarem que o valor de $\log K_{oc}$ da substância de ensaio se encontra fora da curva de calibração, o ensaio deve ser repetido com outras substâncias de referência, mais adequadas.

2. **DADOS E RELATÓRIO**

O relatório deve incluir a seguinte informação:

- a identidade das substâncias de ensaio e de referência, e o seu grau de pureza e, se relevante, os respectivos valores de pK_a ;
- a descrição do equipamento e das condições de funcionamento, por ex., o tipo e a dimensão da coluna analítica (e da coluna de protecção), os meios de detecção, a fase móvel (composição relativa e pH), a gama de temperaturas observadas durante o decorrer das medições;
- o tempo limite e o método utilizado para a sua determinação;
- as quantidades das substâncias de ensaio e de referência introduzidas na coluna;
- os tempos de retenção dos compostos de referência utilizados para a calibração;
- as características da regressão linear dos pontos experimentais ($\log k'$ em função de $\log K_{oc}$) e um gráfico da recta obtida por regressão linear;
- os dados sobre o tempo médio de retenção e o valor estimado para $\log K_{oc}$ do composto de ensaio;
- cromatogramas.

3. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

ANEXO

Tabela 1

Comparação entre os valores de K_{oc} para solos e lamas de depuração e os valores calculados pelo método de HPLC^{1,2}

Substância	N.º CAS	log K_{oc} lamas de depuração	Log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} solos	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linurão	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentião	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monurão	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreno	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Éster fenílico do ácido benzóico	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamida	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamida	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilida	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dicloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

¹ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, **35**(1/2), 121 - 128.

² W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. *Chemosphere*, **35** (1/2), 107 – 119.

Tabela 2

Resultados de um ensaio comparativo inter-laboratorial (11 laboratórios participantes), efectuado com o objectivo de melhorar e validar o método de HPLC¹

substância	N.º CAS	log K_{oc} [OCDE 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[método de HPLC]	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monurão	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linurão	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentião	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

¹ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, **30**(7), 1373-1384.

Tabela 3

Substâncias de referência recomendadas para o método de HPLC baseado em dados de adsorção em solos.

Substância de referência	N.º CAS	Valores médios de log K _{oc} em reator descontínuo	Número de valores de K _{oc}	log D.P.*	fonte
Acetanilida	103-84-4	1,25	4	0,48	a
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	a
2-Nitrobenzamida	610-15-1	1,45	3	0,90	b
N,N-dimetilbenzamida	611-74-5	1,52	2	0,45	a
4-Metilbenzamida	619-55-6	1,78	3	1,76	a
Benzoato de metilo	93-58-3	1,80	4	1,08	a
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	c
Isoproturão	34123-59-6	1,86	5	1,53	c
3-Nitrobenzamida	645-09-0	1,95	3	1,31	b
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	a
3,5-Dinitrobenzamida	121-81-3	2,31	3	1,27	b
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	c
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	c
Triazóxido	72459-58-6	2,44	3	1,66	c
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	c
Linurão	330-55-2	2,59	3	1,97	c
Naftaleno	91-20-3	2,75	4	2,20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	c
Metiocarbe	2032-65-7	3,10	4	2,39	c
Amarelo Ácido 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	a
1,2,3-Triclorobenzeno	87-61-6	3,16	4	1,40	a
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	a
Fentião	55-38-9	3,31	3	2,49	c
Vermelho Directo 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	a
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	c
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	c
Diclofop-metilo	51338-27-3	4,20	3	3,77	c
Fenantreno	85-01-8	4,09	4	3,83	a
Azul Básico 41 (mistura)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	a
DDT	50-29-3	5,63	1	–	b

* D.P. – Desvio-padrão

/a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC.

UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

/b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

/c/ Dados fornecidos por entidades industriais.

C.20 ENSAIO SOBRE A REPRODUÇÃO DE *Daphnia magna*

1. MÉTODO

Este método de ensaio de toxicidade na reprodução baseia-se na publicação OECD TG 211 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O principal objectivo do ensaio consiste em determinar o efeito de produtos químicos sobre a produção de descendência de *Daphnia magna*.

1.2 DEFINIÇÕES E UNIDADES

Animais progenitores: as fêmeas *Daphnia* presentes no início do ensaio e cuja reprodução é o objecto do estudo.

Descendência: os juvenis *Daphnia* produzidos pelos animais progenitores no decorrer do ensaio.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): a menor concentração testada em que a substância ensaiada produz um efeito observável estatisticamente significativo sobre a reprodução e mortalidade dos progenitores (a $p < 0,05$), comparativamente ao controlo, durante um período de exposição definido. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito nocivo igual ou superior ao verificado para a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, conseqüentemente, a NOEC).

Concentração sem efeito observável (NOEC): a mais elevada concentração ensaiada que, quando comparada com o controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um período de exposição definido (corresponde à concentração ensaiada imediatamente abaixo da LOEC).

CE_x: a concentração da substância de ensaio dissolvida em água que provoca uma redução de x por cento na reprodução da *Daphnia magna*, durante um período de exposição definido.

Taxa intrínseca de crescimento: uma medida do crescimento da população que integra a produção de descendência e a mortalidade específica da idade (20, 21 e 22). O seu valor será igual a zero nas populações estáveis, positivo para as populações em crescimento e negativo para populações em declínio. Manifestamente, a última situação não é sustentável e, em última análise, conduzirá à extinção.

Limite de detecção: a menor concentração que pode ser detectada, mas não quantificada.

Limite de determinação: a menor concentração que pode ser medida de forma quantitativa.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece imóvel, isto é, quando não é capaz de nadar ou quando não se observa movimento dos apêndices ou do pós-abdómen no intervalo de 15 segundos após agitação suave do recipiente de ensaio. (Se for utilizada outra definição, esta deve ser mencionada juntamente com a sua referência.)

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As fêmeas jovens *Daphnia* (os animais progenitores), com menos de 24 horas de vida no início do ensaio, são expostas à substância de ensaio misturada na água em diversas concentrações. A duração do ensaio é de 21 dias. No fim do ensaio, é determinado o número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor que esteja vivo. Isto significa que são excluídos dos cálculos os juvenis produzidos por adultos que morreram durante o ensaio. A produção de descendência pelos animais progenitores pode expressar-se de outras formas (por exemplo, pelo número de descendentes vivos produzidos por animal e por dia, desde o primeiro dia em que se observou descendência), mas estas devem ser descritas juntamente com o número total de juvenis produzidos por progenitor vivo no fim do ensaio. A produção de descendência pelos animais expostos à substância de ensaio é comparada com a obtida no(s) controlo(s), a fim de determinar a menor concentração com efeito observável (LOEC) e, conseqüentemente, a concentração sem efeito observável (NOEC). Adicionalmente, e na medida do possível, os dados são analisados utilizando um modelo de regressão de modo a estimar a concentração que causaria uma redução de x % na produção de descendência (isto é CE₅₀, CE₂₀ ou CE₁₀).

É necessário registar também a sobrevivência dos animais progenitores e o tempo que decorreu até ao aparecimento dos primeiros juvenis. Podem ainda ser examinados outros efeitos relacionados com a substância, em parâmetros como o crescimento (o comprimento, por exemplo) e, possivelmente, a taxa intrínseca de crescimento.

1.4 INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis os resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver Método C.2, Parte I) realizado com a *Daphnia magna*. Estes resultados podem ser úteis para seleccionar um intervalo apropriado de concentrações a usar nos ensaios de reprodução. A solubilidade em água e a pressão de vapor da substância de ensaio deverão ser conhecidas, e deverá estar disponível um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções de ensaio, relativamente ao qual esteja descrita a eficiência de recuperação e o limite de determinação.

A fórmula estrutural, o grau de pureza da substância, a estabilidade à luz, a estabilidade nas condições do ensaio, o pKa, o P_{ow} e os resultados do ensaio para a biodegradabilidade “fácil” constituem informações relativas à substância que podem ser úteis para o estabelecimento das condições do ensaio (ver Método C.4).

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

Para que um ensaio seja válido, deverão ser satisfeitos os seguintes critérios relativamente ao(s) controlo(s):

- a mortalidade dos animais progenitores (fêmea *Daphnia*) no fim do ensaio não deve exceder 20 %;
- o número médio da descendência viva, produzida por animal progenitor sobrevivente no fim do ensaio deve ser ≥ 60 .

1.6 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1 Equipamento

Os recipientes de ensaio e outros aparelhos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser, exclusivamente, de vidro ou outro material quimicamente inerte. Os recipientes de ensaio utilizados serão, normalmente, copos de vidro.

Adicionalmente, será necessário utilizar parte ou a totalidade do seguinte equipamento:

- medidor de oxigénio (com microeléctrodo ou outro equipamento adequado para a medição de oxigénio dissolvido em amostras com volume reduzido);
- aparelhos adequados para o controlo da temperatura;
- medidor de pH;
- equipamento para a determinação da dureza da água;
- equipamento para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT) da água ou equipamento para a determinação da carência química de oxigénio (CQO);

— aparelho adequado para o controlo do regime de luz e a medição da intensidade da luz.

1.6.2 Organismos de ensaio

A espécie a ser utilizada no ensaio é a *Daphnia magna* Straus. Podem ser utilizadas outras espécies de *Daphnia*, desde que obedeçam aos critérios de validade (o critério de validade relativo à produção de descendência nos controlos deve ser aplicável à espécie de *Daphnia*). Se forem utilizadas outras espécies de *Daphnia*, estas devem ser claramente identificadas e o seu uso justificado.

É desejável que os clones tenham sido identificados, por genotipagem. A investigação já efectuada nesse domínio (1) demonstrou que a reprodução do Clone A (proveniente do IRCHA, em França) (3) obedece de forma satisfatória ao critério de validade de uma média ≥ 60 descendentes por animal progenitor sobrevivente, quando cultivado nas condições descritas no presente método. No entanto, são aceitáveis outros clones, desde que se demonstre que a cultura de *Daphnia* satisfaz os critérios de validade para o ensaio.

No início do ensaio, os animais devem ter menos de 24 horas de vida e não devem fazer parte da primeira ninhada do progenitor. Devem provir de um lote saudável (isto é, não evidenciar sinais de distúrbio, tais como elevada mortalidade, presença de machos e ovos de repouso (*ephippia*), atraso na produção da primeira ninhada, animais descorados, etc.). O lote de animais deve ser mantido em condições de cultura (luz, temperatura, meio, alimentação e número de animais por unidade de volume) semelhantes às que irão ser utilizadas no ensaio. Se o meio de cultura da *Daphnia* a ser utilizado no ensaio for diferente do utilizado para a cultura de rotina da *Daphnia*, é boa prática incluir um período de aclimação de cerca de 3 semanas antes do ensaio (isto é, uma geração) para evitar perturbações nos animais progenitores.

1.6.3 Meio de ensaio

É recomendada a utilização, neste ensaio, de um meio totalmente definido. Isto permite evitar o uso de aditivos (por exemplo, algas marinhas, extracto de solo, etc.), que são difíceis de caracterizar, e assim melhorar o processo de padronização entre laboratórios. Foram considerados adequados para este fim os meios Elendt M4 (4) e M7 (ver Anexo 1). São aceitáveis, no entanto, outros meios (ver, por exemplo, (5) e (6)) desde que as características da cultura de *Daphnia* satisfaçam os critérios de validade para o ensaio.

Se for utilizado um meio que inclui aditivos não definidos, estes deverão ser claramente especificados e o relatório do ensaio deverá incluir informações sobre a composição, nomeadamente no que diz respeito ao teor de carbono, já que este poderá contribuir para o alimento fornecido. Recomenda-se que o carbono orgânico total (COT) e/ou a carência química de oxigénio (CQO) da solução de reserva do aditivo orgânico sejam determinados, e feita uma estimativa da contribuição resultante para os valores COT/CQO no meio de ensaio. Recomenda-se que os níveis de COT no meio (isto é, antes da adição das algas) sejam inferiores a 2 mg/l (7).

Quando as substâncias de ensaio contêm metais, é importante reconhecer que as propriedades do meio de ensaio (por exemplo, a dureza, capacidade quelante) podem ter influência na toxicidade da substância de ensaio. Por esta razão, é desejável utilizar um meio cuja composição seja totalmente conhecida. No entanto, actualmente, os únicos meios totalmente definidos que se sabe serem adequados para a cultura a longo prazo da *Daphnia magna* são os meios Elendt M4 e M7. Ambos os meios contêm o agente quelante EDTA. Alguns estudos (2) demonstram que a "toxicidade aparente" do cádmio é geralmente menor quando o ensaio de reprodução é realizado em meios M4 e M7 do que quando é realizado num meio que não contém EDTA. Em consequência, os meios M4 e M7 não são recomendados para o ensaio de substâncias contendo metais, devendo igualmente ser evitados outros meios contendo agentes quelantes. Para substâncias que contenham metais, poderá ser aconselhável utilizar um meio alternativo, como, por exemplo, água dura ASTM reconstituída (7), que não contém EDTA, com adição de extracto de algas marinhas (8). Esta combinação de água dura ASTM reconstituída e extracto de algas marinhas é também adequada para culturas de longo prazo e ensaios de *Daphnia magna* (2), embora ainda exerça uma fraca acção quelante devido ao componente orgânico existente no extracto de algas marinhas adicionado.

A concentração de oxigénio dissolvido no início e ao longo do ensaio deve ser superior a 3 mg/l. O valor de pH deve estar situado entre 6 e 9 e não deve variar em nenhum ensaio mais do que 1,5 unidades. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (como CaCO₃). Ensaios a este nível e superiores demonstraram que, nessas condições, a produção de descendência cumpre os critérios de validade (9 e 10).

1.6.4 Soluções de ensaio

De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução de reserva. As soluções de reserva devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância no meio de ensaio.

Em alguns casos, pode ser necessário recorrer a solventes orgânicos ou dispersantes de modo a produzir uma solução de reserva com uma concentração adequada, mas deverão ser feitos todos os esforços de modo a evitar a utilização de tais substâncias. A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem exemplos de solventes adequados. Como exemplos de dispersantes adequados, podem citar-se o Cremophor RH40, a metilcelulose 0,01% e o HCO-40. Em qualquer um dos casos, a substância de ensaio presente nas soluções nunca deve exceder o limite de solubilidade no meio de ensaio.

Utilizam-se solventes com o fim de preparar uma solução de reserva que permita o doseamento exacto da substância no meio de cultura. Na concentração recomendada para meio de ensaio final (isto é $\leq 0,1$ ml/l), os solventes acima indicados não são tóxicos, nem aumentam a solubilidade da substância em água.

Os dispersantes podem ser úteis para o doseamento e dispersão correctos da substância. Na concentração recomendada para o meio de ensaio final ($\leq 0,1$ ml/l), os dispersantes acima indicados não são tóxicos, nem aumentam a solubilidade da substância em água.

1.7 PLANEAMENTO DO ENSAIO

Os tratamentos devem ser distribuídos pelos recipientes de ensaio e todos os processos de manuseamento subsequentes devem ser efectuados de modo aleatório. O não cumprimento destas recomendações pode provocar desvios nos resultados que poderão ser erradamente interpretados como um efeito da concentração. Em particular, se as unidades experimentais forem manuseadas por ordem de tratamento ou concentração, alguns efeitos relacionados com o tempo, como a fadiga do operador ou outro tipo de erro, poderão ter efeitos e repercussões de maior dimensão nas concentrações mais elevadas. Além disso, se houver indicações de que os resultados do ensaio podem ser afectados por uma condição inicial ou ambiental do ensaio, como a localização no laboratório, deve considerar-se a possibilidade de efectuar o ensaio por agrupamento de recipientes.

1.8 PROCEDIMENTO

1.8.1 Condições de exposição

1.8.1.1 Duração

A duração do ensaio é de 21 dias.

1.8.1.2 Carga

Os animais progenitores são mantidos individualmente, um em cada recipiente de ensaio, contendo cada recipiente 50-100 ml de meio.

Por vezes, podem ser necessários volumes maiores de modo a possibilitar o cumprimento dos requisitos do procedimento analítico utilizado para a determinação da concentração da substância de ensaio, embora seja também permitida a junção de repetições para análise química. Se forem utilizados volumes superiores a 100 ml, poderá ser necessário aumentar a ração fornecida às *Daphnia* de modo a assegurar uma disponibilidade adequada de alimento e o cumprimento dos critérios de validade. Em ensaios por escoamento, podem ser considerados, por razões técnicas, planos alternativos (por exemplo, quatro grupos de 10 animais num volume de ensaio maior), devendo, no entanto, qualquer alteração do plano do ensaio ser indicada no relatório.

1.8.1.3 *Número de animais*

Para ensaios semiestáticos, deverão ser mantidos individualmente, pelo menos, 10 animais em cada concentração de ensaio e 10 animais nas séries de controlo.

Para ensaios por escoamento, concluiu-se ser adequado dividir 40 animais por quatro grupos de 10 animais para cada concentração de ensaio (1). Pode ser utilizado um número menor de organismos de ensaio, sendo recomendado um mínimo de 20 animais para cada concentração, repartidos por duas ou mais repetições com igual número de animais (por exemplo, quatro repetições com cinco animais cada). Convém salientar que nos ensaios em que os animais são mantidos em grupos, não será possível expressar a produção de descendência em termos de número total de descendentes vivos produzidos por animal progenitor vivo no fim do ensaio se os animais progenitores morrerem. Nestes casos, a produção de descendência deve ser expressa em termos de “número total de descendentes vivos produzidos por progenitor presente no início do ensaio”.

1.8.1.4 *Alimentação*

Para ensaios semiestáticos, a alimentação deve ser fornecida de preferência diariamente, no mínimo, três vezes por semana (isto é, correspondendo às mudanças de meio). Qualquer desvio em relação a essa norma (por exemplo, para ensaios por escoamento) deverá ser indicado no relatório.

Durante o ensaio, a dieta dos animais progenitores deverá consistir, de preferência, em células de algas vivas de uma ou mais das seguintes espécies: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (agora *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) e *Scenedesmus subspicatus*. A dieta fornecida deve basear-se na quantidade do carbono orgânico (C) fornecida a cada animal progenitor. Os dados da investigação já realizada nesta área (12) demonstraram que, para a *Daphnia magna*, níveis de ração entre 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/dia são suficientes para atingir o número de descendentes necessário para satisfazer o critério de validade do ensaio. A ração pode ser fornecida a uma taxa constante ao longo de todo o período do ensaio ou, se for desejável, pode ser utilizada uma taxa inferior no início, que será depois aumentada durante o ensaio de modo a compensar o crescimento dos animais progenitores. Neste caso, a ração deverá continuar a manter-se dentro da gama recomendada de 0,1 – 0,2 mg C/*Daphnia*/dia.

Se forem utilizados medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância, para determinar o nível de ração necessário (por razões de conveniência, uma vez que as medições do teor de carbono são muito mais demoradas), cada laboratório deve produzir o seu próprio nomograma em que relacione a medida alternativa com o conteúdo em carbono da cultura de algas (ver Anexo 2 para conselhos sobre a elaboração do nomograma). Os nomogramas devem ser verificados pelo menos anualmente, e com maior frequência se tiverem sido alteradas as condições de cultura das algas. Verificou-se que a absorvância é uma medida alternativa mais adequada para a determinação do teor de carbono do que o número de células (13).

De modo a reduzir o volume do meio de cultura de algas transferido para os recipientes de ensaio, a suspensão de algas fornecida às *Daphnia* deve ser concentrada. A concentração das algas pode ser efectuada por centrifugação seguida de re-suspensão em água destilada, água desionizada ou meio de cultura de *Daphnia*.

1.8.1.5 *Luz*

Período de exposição à luz de 16 horas com uma intensidade que não exceda $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatura*

A temperatura do meio de ensaio deve situar-se entre 18 e 22°C. No entanto, para qualquer ensaio, a temperatura não deve, se possível, variar mais do que 2°C dentro destes limites (por exemplo, 18-20, 19-21 ou 20-22°C). Poderá ser vantajoso utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

1.8.1.7 *Arejamento*

Os recipientes de ensaio não devem ser arejados durante o ensaio.

1.8.2 **Concentrações de ensaio**

Normalmente deverão ser testadas pelo menos cinco concentrações de ensaio, dispostas numa série geométrica com um factor de separação que não exceda de preferência 3,2 e deverá ser utilizado um número de repetições apropriado para cada concentração de ensaio (ver ponto 1.8.1.3). Se forem utilizadas menos de cinco concentrações, deverá ser apresentada uma justificação. As substâncias não devem ser ensaiadas acima do seu limite de solubilidade no meio de ensaio.

Na escolha da gama de concentrações, importa ter presente o seguinte:

- i. Se o objectivo consistir em determinar a LOEC/NOEC, o valor da menor concentração de ensaio deve ser suficientemente baixo de modo a que a fecundidade àquela concentração não seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio terá de ser repetido reduzindo a da menor concentração ensaiada.
- ii. Se o objectivo for a determinação da LOEC/NOEC, o valor da maior concentração de ensaio deve ser suficientemente elevado para que a fecundidade àquela concentração seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio terá de ser repetido com um aumento da maior concentração.
- iii. Se for estimada a CE_x para os efeitos sobre a reprodução, é aconselhável utilizar concentrações suficientes de modo a definir a CE_x com um nível de confiança apropriado. Se for estimada a CE_{50} para os efeitos sobre a reprodução, é aconselhável que a maior concentração de ensaio seja superior a este valor CE_{50} . De outro modo, embora seja ainda possível estimar o valor CE_{50} , o intervalo de confiança para o valor CE_{50} será muito alargado e poderá não ser possível estabelecer satisfatoriamente o nível de adequação do modelo ajustado.
- iv. A gama de concentrações de ensaio não deverá incluir, de preferência, quaisquer concentrações que tenham um efeito estatisticamente significativo na sobrevivência de adultos, pois tal alteraria a natureza do ensaio, transformando um ensaio de reprodução simples num ensaio combinado de reprodução e mortalidade, o que exigiria uma análise estatística muito mais complexa.

O conhecimento prévio da toxicidade da substância de ensaio (obtido a partir de um ensaio de toxicidade aguda e/ou de estudos preliminares para determinação das concentrações, por exemplo) deverá ajudar na selecção das concentrações de ensaio apropriadas.

Quando for utilizado um solvente ou dispersante na preparação de soluções de ensaio (ver ponto 1.6.4), a sua concentração final nos recipientes de ensaio não deverá ser superior a 0,1 ml/l e deverá ser a mesma em todos os recipientes de ensaio.

1.8.3 **Controlos**

A par das séries de ensaio, deve ser realizada uma série de ensaios de controlo do meio e, se aplicável, uma série de controlo contendo o solvente ou o dispersante. Quando forem utilizados solventes ou dispersantes, a sua concentração deve ser igual à utilizada nos recipientes contendo a substância de ensaio. Deve utilizar-se um número apropriado de repetições (ver ponto 1.8.1.3).

Em geral, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação relativamente ao número médio de descendentes vivos produzidos por animal progenitor no(s) controlo(s) deve ser $\leq 25\%$, o que deverá ser descrito nos planos de ensaio que utilizem animais mantidos individualmente.

1.8.4 **Renovação do meio de ensaio**

A frequência da renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio, mas deve ser no mínimo de três vezes por semana. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4) a concentração da substância de ensaio não for estável (isto é, se ela se situar fora da gama de 80 - 120 % do valor nominal ou abaixo de 80 % da concentração inicial medida) durante o período máximo de renovação (isto é, 3 dias), deve considerar-se uma renovação mais frequente do meio ou efectuar um ensaio por escoamento.

Nos ensaios semiestáticos, quando o meio é renovado, deverá preparar-se uma segunda série de recipientes de ensaio e para onde se transferem os animais progenitores utilizando, por exemplo, uma pipeta de vidro de diâmetro adequado. O volume do meio transferido com a *Daphnia* deve ser reduzido ao mínimo.

1.8.5 **Observações**

Os resultados das observações realizadas durante o ensaio devem ser registados em folhas de dados (ver exemplos nos Anexos 3 e 4). Se tiverem de ser efectuadas outras medições, poderá ser necessário efectuar observações adicionais (ver pontos 1.3 e 1.8.8).

1.8.6 **Descendência**

Os descendentes produzidos por cada animal progenitor devem ser retirados e contados, de preferência diariamente desde o aparecimento dos primeiros juvenis, para evitar que estes consumam a comida destinada aos adultos. Embora para atingir o objectivo deste método apenas seja necessário contar o número de descendentes vivos, a presença de ovos abortados ou descendentes mortos também deverá ser indicada no relatório.

1.8.7 **Mortalidade**

A mortalidade entre os animais progenitores deve ser registada, de preferência diariamente ou, no mínimo, quando se efectua a contagem dos descendentes.

1.8.8 **Outros parâmetros**

Embora este método seja planeado sobretudo para avaliar os efeitos sobre a reprodução, é possível que outros efeitos possam também ser suficientemente quantificados de modo a permitir uma análise estatística. As medições relativas ao crescimento são desejáveis, pois fornecem informação sobre possíveis efeitos subletais, que podem ser mais úteis que a simples medição relativa à reprodução. Recomenda-se a medição do comprimento dos animais progenitores (isto é, o comprimento do corpo excluindo o espinho anal) no fim do ensaio. O tempo necessário para a produção da primeira ninhada (e seguintes), o número e tamanho das ninhadas por animal progenitor, o número de ovos abortados, a presença de machos ou ovos de repouso (*ephippia*) e a taxa intrínseca de crescimento da população são outros parâmetros que podem ser medidos ou calculados.

1.8.9 **Frequência das determinações analíticas e medições**

Pelo menos uma vez por semana, deve ser medida a concentração de oxigénio, a temperatura, o grau de dureza e os valores de pH nos meios frescos e velhos, nos controlo(s) e na maior concentração da substância de ensaio.

As concentrações da substância de ensaio são determinadas a intervalos regulares durante o ensaio.

Nos ensaios semiestáticos, em que a concentração da substância de ensaio deverá manter-se entre $\pm 20\%$ do valor nominal (isto é, dentro da gama dos 80 - 120 % – ver 1.4 e 1.8.4), recomenda-se que, no mínimo, sejam analisadas a maior e menor concentrações de ensaio quando acabadas de preparar e uma vez durante a primeira semana do ensaio, na altura da renovação do meio (isto é, devem efectuar-se análises numa amostra da solução no momento em que esta acaba de ser preparada e no momento da renovação do meio). A partir de então, estas determinações devem ser repetidas, pelo menos, a intervalos semanais.

Para os ensaios em que não é esperado que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de $\pm 20\%$ do valor nominal, é necessário analisar todas as concentrações de ensaio no momento em que as soluções acabam de ser preparadas e na altura da renovação do meio. No entanto, para os ensaios em que a concentração inicial medida da substância de ensaio não se encontra no intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal, mas em que é possível fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, mantêm-se dentro da gama dos 80 - 120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas para concentrações de ensaio poderão ser reduzidas na segunda e terceira semana do ensaio, limitando-se à maior e menor concentração. Em todos os casos, a determinação das concentrações da substância de ensaio antes da renovação do meio só precisa de ser efectuada no recipiente de uma das repetições, para cada concentração de ensaio.

Se for efectuado um ensaio por escoamento, é adequado aplicar um método de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semiestáticos (não sendo, neste caso, aplicável a medição de soluções “usadas”). No entanto pode ser aconselhável aumentar o número de amostragens durante a primeira semana (efectuando três conjuntos de medições, por exemplo) de modo a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis. Nestes tipos de ensaio, a taxa de fluxo do diluente e da substância de ensaio deverá ser verificada diariamente.

Se existirem provas de que, durante o ensaio, a concentração da substância de ensaio não excedeu $\pm 20\%$ do valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se o desvio em relação ao valor nominal ou da concentração inicial medida for superior a $\pm 20\%$, os resultados devem ser expressos através da média ponderada em função do tempo (ver o Anexo 5).

2. DADOS E RELATÓRIO

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

O objectivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância de ensaio no número total de descendentes vivos produzidos por animal progenitor vivo no fim do ensaio. Deverá calcular-se o número total de descendentes por animal progenitor em cada recipiente de ensaio (isto é, em cada repetição). Se, em qualquer repetição, se observar a presença de animais progenitores mortos durante o ensaio ou se o progenitor for um macho, a repetição é excluída do ensaio. A análise basear-se-á então num número reduzido de repetições.

Para determinar a LOEC e, conseqüentemente, a NOEC em relação aos efeitos da substância química na produção de descendência, é necessário calcular a produção da descendência média nas repetições de cada concentração e o desvio-padrão residual conjunto, o que poderá ser feito através de uma análise de variância (ANOVA). A média para cada concentração deve ser então comparada com a média observada no controlo, utilizando um método de comparações múltiplas apropriado. Os testes de Dunnett ou Williams (14, 15, 16 e 17) poderão ser úteis para o efeito. É necessário verificar se se verifica a presunção de homogeneidade da variância calculada através da ANOVA. Recomenda-se que isso seja realizado graficamente e não por meio de um teste de significância formal (18); uma alternativa adequada consiste em realizar um teste de Bartlett. Se esta presunção não se verificar, deve considerar-se a transformação dos dados de modo a homogeneizar as variâncias antes de realizar a ANOVA, ou a realização de uma ANOVA ponderada. Deve ser calculada e registada a dimensão do efeito detectável através da ANOVA (isto é, a diferença menos significativa).

Para efectuar uma estimativa da concentração que causaria uma redução de 50 % no resultado reprodutivo (isto é, a CE_{50}), deverá ajustar-se aos dados uma curva adequada (curva logística, por exemplo), utilizando um método estatístico como, por exemplo, o método dos mínimos quadrados. A curva pode ser parametrizada de modo a que a CE_{50} e o seu desvio-padrão possam ser estimados directamente, o que facilitaria enormemente o cálculo dos limites de confiança da CE_{50} . Deverão ser utilizados limites de confiança de mais ou menos 95 %, a não ser que existam boas razões para preferir níveis de confiança diferentes. É aconselhável que o procedimento de ajuste da curva permita avaliar a significância dos desvios. Isto poderá ser realizado graficamente ou dividindo a soma residual dos quadrados em “desvios de ajuste” e “componentes de erro puro” e realizando um teste de significância para os desvios. Uma vez que os tratamentos que resultam em elevada fecundidade são susceptíveis de registar, relativamente ao número de juvenis produzidos, uma variação superior à que se verifica nos tratamentos que resultam em baixa fecundidade, deverá considerar-se a ponderação dos valores observados de modo a reflectir as diferentes variâncias nos diferentes grupos de tratamento (para informação sobre este assunto, ver ref. 18).

Na análise dos dados do ensaio interlaboratorial final (2), a curva logística foi ajustada utilizando o modelo seguinte, embora possam ser adoptados outros modelos adequados:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

em que:

Y: é o número total de juvenis por animal progenitor vivo no fim do ensaio (calculado para cada recipiente)

x: é o valor da concentração da substância

c : é o número esperado de juvenis quando $x = 0$

x_0 : é o valor CE_{50} na população

b : é o parâmetro de declive

Este modelo deverá ser adequado num elevado número de situações, embora possivelmente não o seja para todos os ensaios. Como se propõe acima, deve realizar-se um teste para verificar a validade do modelo. Em alguns casos, poderá ser apropriado utilizar um modelo hormesis, no qual os efeitos observados a baixas concentrações são ampliados (19).

Poderão também ser estimadas outras concentrações, tais como a CE_{10} ou CE_{20} , embora neste caso possa ser preferível utilizar uma parametrização do modelo diferente da utilizada para estimar a CE_{50} .

2.2 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

2.2.1 Substância de ensaio:

- natureza física e propriedades físico-químicas relevantes;
- dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

2.2.2 Espécie de ensaio:

- o clone (quer tenha sido ou não geneticamente identificado), o fornecedor ou fonte (se conhecidos) e as condições de cultura utilizadas. Se for utilizada uma espécie diferente de *Daphnia magna*, tal deverá ser registado e justificado.

2.2.3 Condições do ensaio:

- o método de ensaio utilizado (por exemplo, semiestático ou por escoamento, o volume, a carga expressa em número de *Daphnia* por litro);
- fotoperíodo e intensidade da luz;
- plano do ensaio (número de repetições, número de progenitores por repetição, por exemplo);
- informações pormenorizadas sobre o meio de cultura utilizado;
- eventuais adições de material orgânico, incluindo a composição, a fonte, o método de preparação, o COT/CQO de preparações de reserva, a estimativa do COT/CQO resultante no meio de ensaio;
- informação pormenorizada sobre a alimentação, incluindo as quantidades (em mg C/*Daphnia*/dia) e a descrição (o tipo de alimento(s), incluindo – para as algas – o nome específico (espécie) e, se conhecida, a estirpe e as condições de cultura, por exemplo);
- método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação do meio (quando utilizados, devem ser fornecidas as concentrações do solvente ou dispersante).

2.2.4

Resultados:

- resultados de quaisquer estudos preliminares sobre a estabilidade da substância de ensaio;
- o valor nominal das concentrações de ensaio e os resultados de todas as análises para determinar a concentração da substância de ensaio nos recipientes de ensaio (ver exemplo de folha de dados no Anexo 4); a eficiência de recuperação do método e o limite de determinação também deverão ser registados;
- a qualidade da água nos recipientes de ensaio (isto é, o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido, assim como o COT e/ou a CQO e a dureza, quando aplicável) (ver exemplo de folha de dados no Anexo 3);
- o registo completo da descendência viva de cada animal progenitor (ver exemplo nas folhas de dados do Anexo 3);
- o número de animais progenitores mortos e o dia em que ocorreu a morte (ver exemplo de folha de dados no Anexo 3);
- o coeficiente de variação da fecundidade no controlo (baseado no número total de descendentes vivos por animal progenitor vivo no fim do ensaio);
- representação gráfica do número total de descendentes vivos por animal progenitor vivo (para cada repetição) no fim do ensaio, em função da concentração da substância de ensaio;
- a menor concentração com efeito observável (LOEC) na reprodução, incluindo uma descrição dos métodos estatísticos utilizados, uma indicação da dimensão do efeito que poderia ser detectada e a concentração sem efeito observável (NOEC) na reprodução; quando for apropriado, também deverão ser registados os valores LOEC/NOEC para a mortalidade dos animais progenitores;
- quando for apropriado, o valor CE_x para a reprodução, os intervalos de confiança, um gráfico do modelo ajustado utilizado para o seu cálculo, o declive da curva de dose/resposta e o seu desvio-padrão;
- outras medições ou efeitos biológicos observados; descrição de qualquer outro efeito biológico que tenha sido observado ou medido (crescimento de animais progenitores, por exemplo), incluindo qualquer justificação apropriada;
- uma explicação para qualquer desvio do método de ensaio.

3.

REFERÊNCIAS

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-782.

- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
- 16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510-531.
- 18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of População Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

ANEXO 1

PREPARAÇÃO DOS MEIOS TOTALMENTE DEFINIDOS ELENDT M7 E M4

Aclimação aos meios Elendt M7 e M4

Alguns laboratórios tiveram dificuldades na transferência directa de *Daphnia* para os meios M4 (1) e M7. No entanto, obteve-se algum sucesso com uma aclimação gradual, isto é, transferindo do próprio meio para Elendt a 30%, a 60% e, por fim, a 100%. Os períodos de aclimação necessários podem atingir a duração de um mês.

PREPARAÇÃO

Elementos vestigiais

Em primeiro lugar, preparam-se soluções de reserva separadas (I) de elementos vestigiais individuais em água com um grau de pureza adequado – por exemplo, desionizada, destilada ou submetida a osmose inversa. A partir destas soluções de reserva individuais (I), é preparada uma segunda solução de reserva simples (II), que contém todos os elementos vestigiais (solução combinada), isto é:

Soluções de reserva I (substância simples)	Quantidade adicionada à água mg/l	Concentração (em relação ao meio M4) X (vezes)	Para preparar a solução de reserva combinada II, adicionar a seguinte quantidade de solução de reserva I à água ml/l	
			M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	2 000	–	–
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000	–	–
Ambas as soluções Na ₂ EDTA e FeSO ₄ são preparadas individualmente, juntas e imediatamente autoclavadas. Isto dá:				
21 solução Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

Meios M4 e M7

Os meios M4 e M7 são preparados utilizando a solução de reserva II, os macronutrientes e as vitaminas tal como indicado:

	Quantidade adicionada à água mg/l	Concentração (relacionada com o meio M4) X (vezes)	Quantidade de solução de reserva adicionada para preparar o meio ml/l	
			M 4	M 7
Solução de reserva II elementos vestigiais combinados		20	50	50
Soluções de reserva de macronutrientes (substância única)				
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Solução de reserva de vitaminas	–	10 000	0,1	0,1
A solução de reserva de vitaminas é preparada adicionando as 3 vitaminas a 1 l de água como se mostra em baixo:				
Hidrocloreto de Tiamina	750	10 000	–	–
Cianocobalamina (B ₁₂)	10	10 000	–	–
Biotina	7,5	10 000	–	–

A solução de reserva de vitaminas é armazenada e congelada em pequenas alíquotas. As vitaminas são adicionadas ao meio imediatamente antes da utilização.

N.B. Para evitar a precipitação dos sais quando se prepara o meio completo, adicionar as alíquotas de soluções de reserva a cerca de 500-800 ml de água desionizada e perfazer até 1 l.

N.N.B. A primeira publicação relativa ao meio M4 tem a seguinte referência: Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

ANEXO 2

ANÁLISE DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT) E

PRODUÇÃO DE UM NOMOGRAMA PARA O TEOR COT DAS ALGAS QUE SERVEM DE ALIMENTO

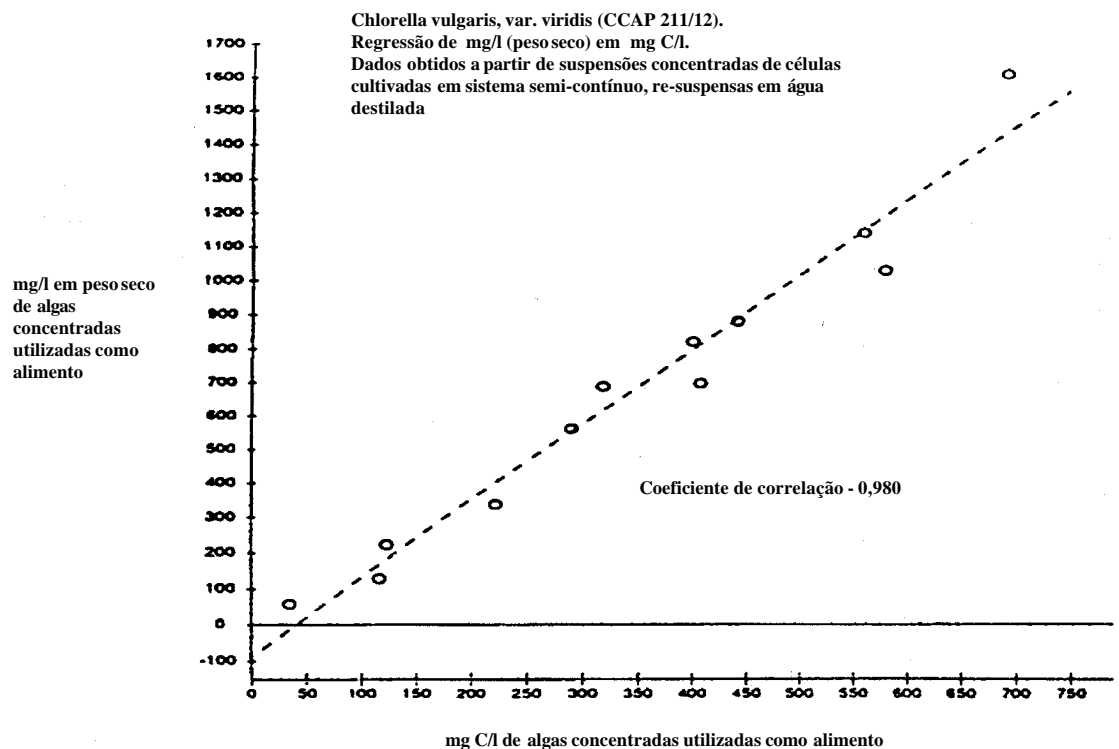
Reconhece-se que o teor de carbono das algas que servem de alimento não será normalmente medido directamente, mas sim através de correlações (isto é, nomogramas) com medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância).

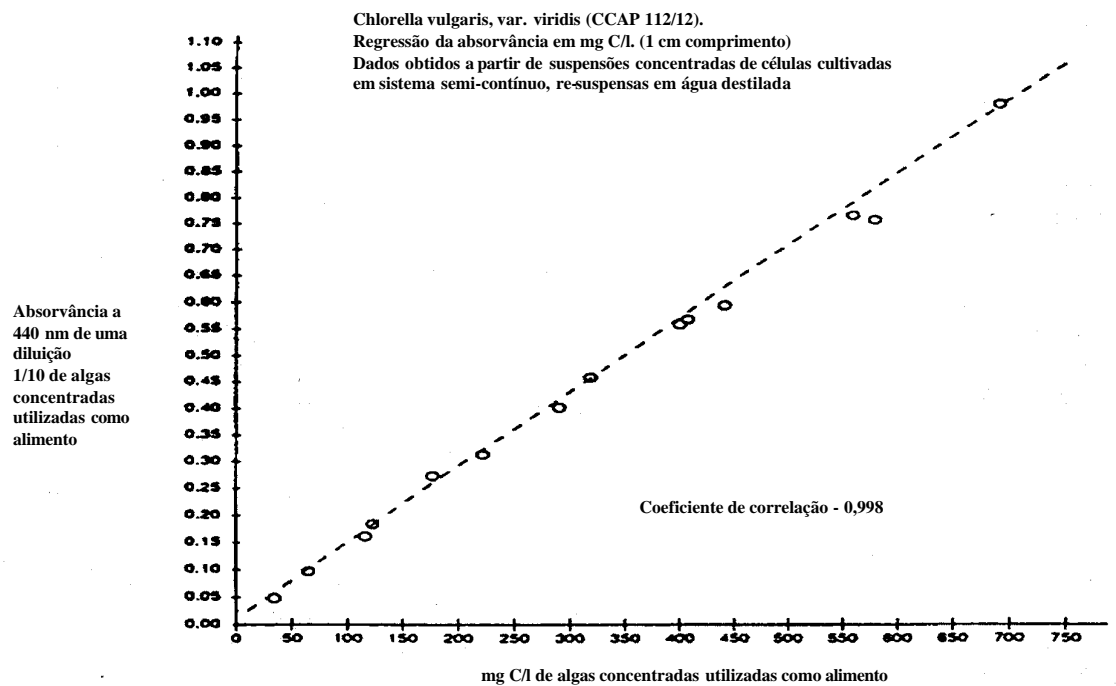
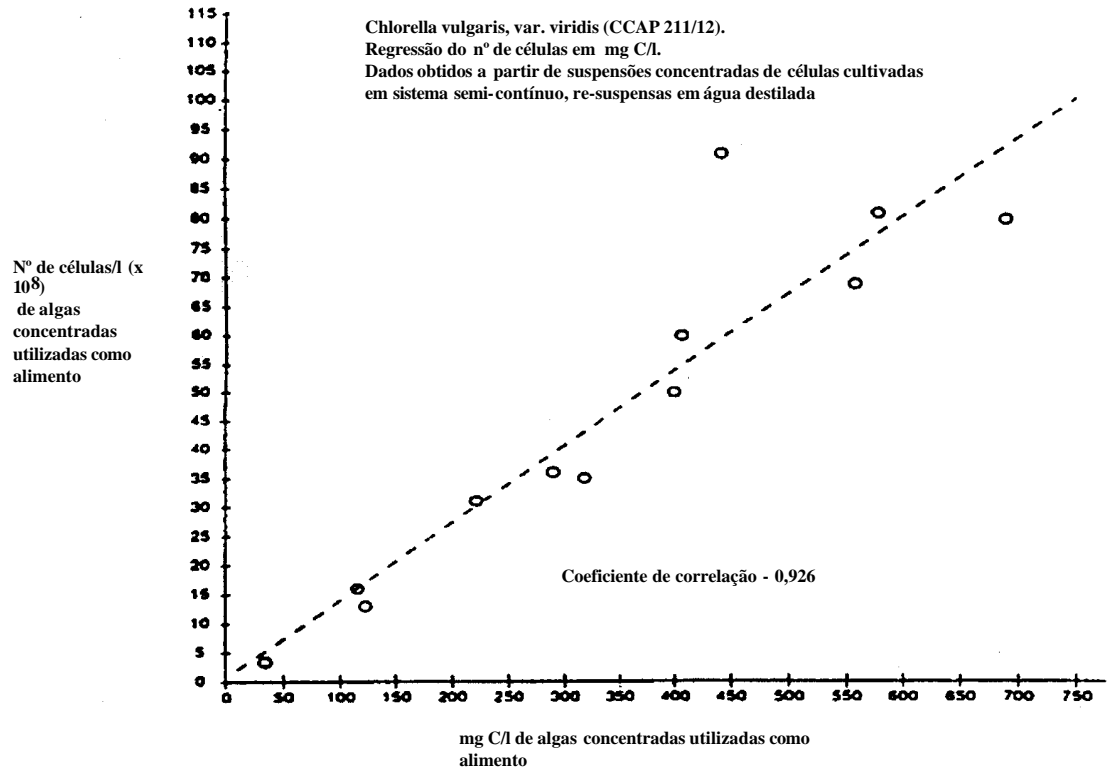
O COT deve ser medido por oxidação a alta temperatura em vez de utilizar métodos de UV ou persulfato. (Ver: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para a elaboração do nomograma, as algas devem ser separadas do meio de crescimento por centrifugação, seguida de re-suspensão em água destilada. Medir o parâmetro de substituição e a concentração de COT em cada amostra em triplicado. Devem ser analisados "brancos" de água destilada e a concentração de COT deverá ser deduzida a partir da concentração de COT presente na amostra de algas.

O nomograma deve ser linear em toda a gama de concentrações de carbono necessária. São indicados a seguir alguns exemplos.

N.B. Estes exemplos não deverão ser aproveitados para efectuar conversões; é essencial que os laboratórios preparem os seus próprios nomogramas.





ANEXO 3

EXEMPLO DE FOLHAS DE DADOS COM REGISTO DA RENOVACÃO DOS MEIOS, DADOS DE MONITORIZAÇÃO FÍSICA/QUÍMICA, ALIMENTAÇÃO,

REPRODUÇÃO DE DAPHNIA E MORTALIDADE DE ADULTOS

Experiência N^o: Dados iniciais : Clone : Meio : Tipo de alimento : Substância de ensaio: Conc. Nominal:

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renovação do meio (assinalar os dias)																								
PH *																								novos
																								velhos
O ₂ mg/l *																								novos
																								velhos
Temp (°C) *																								novos
																								velhos
Alimentos fornecidos (assinalar os dias)																								
N ^o de descendentes vivos †																								Total
Recipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Total
Mortalidade cumulativa de adultos †																								

*Indicar o recipiente utilizado na experiência

† Registrar a mortalidade de quaisquer animais adultos com a referência "M" na caixa apropriada

† Registrar os juvenis abortados com a referência “AB” na caixa apropriada

ANEXO 5

CÁLCULO DA MÉDIA PONDERADA EM FUNÇÃO DO TEMPO

Média ponderada em função do tempo

Considerando que a concentração da substância de ensaio pode diminuir durante o período entre renovações do meio, é necessário determinar um valor de concentração representativo da gama de concentrações a que os progenitores *Daphnia* foram expostos. A determinação desse valor deve basear-se tanto em considerações biológicas como estatísticas. Por exemplo, se se considerar que a reprodução é afectada principalmente pela concentração máxima experimentada, deverá utilizar-se a concentração máxima. No entanto, se se considerar que o efeito acumulado ou a longo prazo da substância tóxica tem um peso mais importante, será mais adequado utilizar um valor médio de concentração. Neste caso, a concentração média ponderada em função do tempo será um valor apropriado, uma vez que considera a variação da concentração instantânea ao longo do tempo.

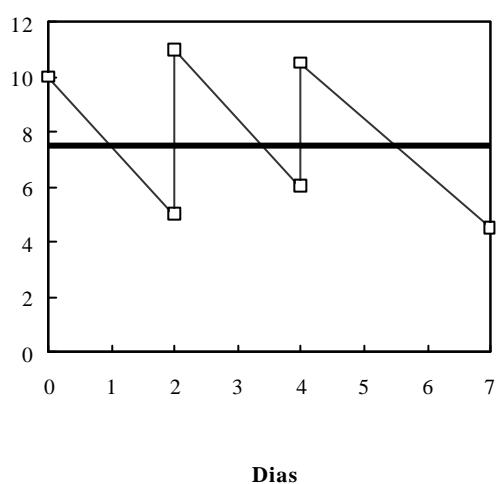


Figura 1 : Exemplo de média ponderada em função do tempo

A figura 1 mostra um exemplo de um ensaio (simplificado) com a duração de 7 dias, em que o meio é renovado nos Dias 0, 2 e 4.

- A linha em ziguezague representa a concentração ao longo do tempo. Assume-se que a queda do valor de concentração segue uma curva exponencial.
- Os 6 pontos representados no gráfico representam as concentrações medidas no início e fim de cada período de renovação.
- A linha mais espessa indica a posição da média ponderada em função do tempo.

A média ponderada em função do tempo é calculada de modo a que a área abaixo desse valor seja igual à área abaixo da curva de concentração. O Quadro 1 apresenta em pormenor o cálculo correspondente ao exemplo da figura 1.

Quadro 1: Cálculo da média ponderada em função do tempo

Nº da Renovação	Dias	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Área
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Total de Dias : 7					Área Total	50,091
					MPFT	7,156

A coluna *Dias* corresponde ao número de dias no período de renovação

A coluna *Conc0* corresponde à concentração medida no início de cada período de renovação

A coluna *Conc1* corresponde à concentração medida no fim de cada período de renovação

A coluna *Ln(Conc0)* corresponde ao logaritmo natural de *Conc0*

A coluna *Ln(Conc1)* corresponde ao logaritmo natural de *Conc1*

A coluna *Área* corresponde à área abaixo da curva exponencial para cada período de renovação. É calculada através da seguinte fórmula :

$$\text{Área} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{Dias}$$

A média ponderada em função do tempo (MPFT) é a *Área Total* dividida pelo *Total de Dias*.

Para o ensaio de reprodução de *Daphnia*, o quadro deverá, obviamente, ser aumentado de modo a abranger 21 dias.

É óbvio que, quando as observações se limitam ao princípio e ao fim de cada período de renovação, não é possível confirmar se o decaimento segue, de facto, uma curva exponencial. Uma curva diferente resultará num cálculo diferente para os valores da *Área*. No entanto, o decaimento seguindo uma curva exponencial constitui um modelo plausível, que não é de excluir e que, na ausência de outras informações, constituirá, provavelmente, a curva mais adequada..

No entanto, é necessário tomar algum cuidado no caso de a análise química não permitir detectar a substância no fim do período de renovação. A não ser que seja possível estimar a velocidade a que a substância desapareceu da solução, é impossível obter uma área realista abaixo da curva e, conseqüentemente, é impossível obter uma média ponderada em função do tempo que seja razoável.