



# NORMA TÉCNICA

L5.017

Dez/1992  
20 PÁGINAS

Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda:  
procedimento

**Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**

Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345  
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP  
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS DE TESTES DE TOXICIDADE AGUDA</b>	L5.017
	Procedimento	Dez/92

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Definições.....	1
3 Condições gerais.....	2
4 Condições específicas.....	2
Anexo A - Fluxograma para determinação de CL50 e CE50.....	19
Anexo B - Referências bibliográficas.....	20

## 1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma fixa as condições exigíveis para a análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda, utilizadas para determinar a concentração de um agente tóxico, letal ou efetiva, a 50% de uma população de organismos-teste, num determinado período de exposição.

1.2 Esta Norma descreve os seguintes métodos: gráfico, Litchfield-Wilcoxon e probitos.

## 2 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 2.1 a 2.5.

### 2.1 Agente tóxico

Substância ou outros materiais, tais como formulações, efluentes líquidos ou águas continentais, que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

### 2.2 Concentração efetiva mediana (CE50)

Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo, imobilidade, a 50% dos organismos em um dado período de exposição, nas condições de teste.

### 2.3 Concentração letal mediana (CL50)

Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo, letalidade, a 50% dos organismos-teste em um dado período de exposição, nas condições de teste.

### 2.4 Efeito agudo

Efeito deletério causado por agentes tóxicos a organismos vivos, em curto período de exposição.

## 2.5 Teste de toxicidade

Método utilizado para detectar e avaliar a capacidade, inerente do agente tóxico, de produzir efeitos deletérios em organismos vivos.

## 3 CONDIÇÕES GERAIS

3.1 Os métodos descritos nesta Norma se baseiam no princípio de que, construindo-se um gráfico com os resultados de teste de toxicidade, isto é, as porcentagens de efeito observado em função das concentrações testadas, obtém-se uma curva tipo "S" ou sigmóide. Após a transformação dos valores das concentrações testadas em logaritmo ou probitos, traça-se, entre os pontos obtidos, uma reta através da qual se determina a CL50 ou a CE50.

3.2 Para os valores de CL50 ou CE50 obtidos deve, se possível, ser calculado o intervalo de confiança com coeficiente de confiança de 95%, ou seja,  $p = 0,05$ .

Nota: Alternativamente, o cálculo da CL50 ou CE50 pode ser efetuado através de programas computadorizados, tais como Probit Method (vide anexo B-B-1) e Trimmed Spearman-Kärber Method (vide Anexo B-B-2). No Anexo A, é apresentado um fluxograma para a determinação da CL50 ou CE50 de testes de toxicidade aguda.

## 4 CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

### 4.1 Método gráfico

#### 4.1.1 Princípio do método

Este método consiste na elaboração de um gráfico a partir dos dados obtidos no teste de toxicidade aguda para determinar a CL50 ou CE50 do agente tóxico. Utiliza-se o papel monolog (ver Figura 1), no qual são colocadas, no eixo logarítmico (x), as concentrações testadas e, no eixo linear (y), as porcentagens de efeito observado.

Nota: Este método fornece uma estimativa da CL50 sem o intervalo de confiança, podendo ser utilizado nos testes em que não são obtidas porcentagens intermediárias de efeitos observados (entre 0 e 100% de efeito).

#### 4.1.2 Procedimento geral (ver Anexo B-B-3)

4.1.2.1 Plotar em papel monolog as porcentagens de efeito observado (da escala linear) em função das concentrações testadas (da escala logarítmica).

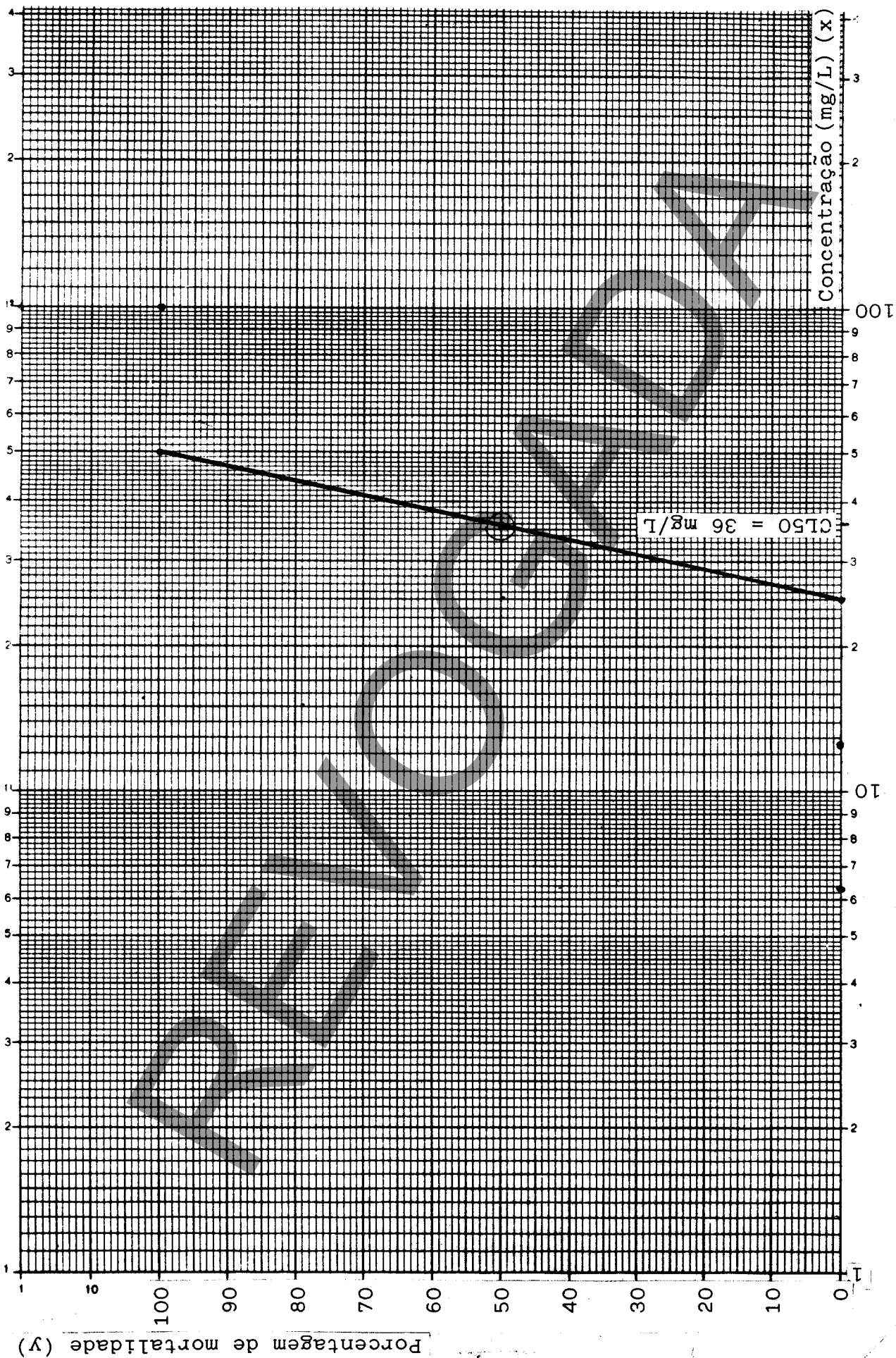


FIGURA 1 - Representação gráfica da CL50

4.1.2.2 Conectar os pontos obtidos mais próximos a 50% de efeito observado, isto é, a maior concentração que não causa o efeito tóxico e a menor concentração que causa o efeito tóxico.

4.1.2.3 A partir da reta traçada, obter no eixo linear a concentração correspondente a 50% de efeito observado. Esse valor corresponderá em tão a CL50 ou CE50 do agente tóxico estudado.

4.1.2.4 Abaixo é dado um exemplo para o cálculo da CL50 através deste método, utilizando dados hipotéticos:

- a) tabular os dados obtidos no teste, como indicado na Tabela 1, e colocá-los em papel monolog (ver Figura 1);
- b) conectar os dois pontos mais próximos (inferior e superior) de 50% de efeito observado;
- c) obter no eixo dos x, a partir da reta traçada, o valor da CL50, neste caso igual a 36 mg/L.

TABELA 1 - Resultados hipotéticos de um teste

Concentração da substância testada (mg/L) (x)	Porcentagem de mortalidade de organismos-teste (y)
100,00	100
50,00	100
25,00	0
12,50	0
6,25	0

## 4.2 Método de Litchfield-Wilcoxon

### 4.2.1 Princípio do método

Este método consiste na elaboração de um gráfico a partir dos dados obtidos no teste de toxicidade aguda de um agente tóxico. Utiliza-se o papel prob-log (ver figura 4), no qual devem ser colocadas no eixo logarítmico (x), as concentrações estudadas e, no eixo probabilístico (y), a porcentagem de efeito observado.

Nota: Para o cálculo da CL50 ou CE50 por esse método é necessário obter, pelo menos, uma porcentagem intermediária de efeito observado (valores entre 0 e 100% de efeito).

### 4.2.2 Procedimento geral (ver Anexo B-B-4)

#### 4.2.2.1 Preparo da tabela e do gráfico

- a) Preparar uma tabela com as concentrações utilizadas no teste, o número de organismos afetados sobre o número de organismos testados e a porcentagem de efeito observado. Não colocar na tabela mais que duas concentrações consecutivas 100% e 0% de efeito observado.
- b) Plotar em papel prob-log, a porcentagem de efeito observado (no eixo probabilístico) em função das concentrações testadas (no eixo logarítmico), exceto os valores de 0% e 100%. Ajustar uma reta através dos pontos plotados, levando em consideração principalmente os pontos que se encontram na região entre 40 e 60% de efeito observado.

#### 4.2.2.2 Obtenção das porcentagens de efeito esperado

A partir do ponto de intersecção da reta traçada com os valores das concentrações estudadas, obter as respectivas porcentagens de efeito esperado (no eixo probabilístico) e anotá-las na coluna apropriada na tabela. Não considerar os valores de porcentagem esperada para qualquer uma das concentrações testadas que estiverem abaixo de 0,01% e acima de 99,9%.

#### 4.2.2.3 Introdução dos valores 0% e 100% do efeito observado

Utilizando a porcentagem de efeito esperado, obter através da Tabela 2 os valores corrigidos para as porcentagens 0 e 100% de efeito. Tabular esses valores ao lado das porcentagens de efeito observado. Colocar no gráfico esses valores corrigidos e verificar se a reta traçada parece adequada. Se a reta se mostrar obviamente inadequada, refazer a reta e repetir o procedimento (ver etapas anteriores) para obter um rearranjo dos valores esperados e corrigidos.

TABELA 2 - Valores corrigidos para 0% ou 100% de efeito

Valor esperado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,4	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7

#### 4.2.2.4 Avaliação da reta obtida, através do teste do CHI-quadrado ( $\chi^2$ )

- a) Para cada concentração testada, listar a diferença entre o valor da porcentagem de efeito observado e o valor da porcentagem de efeito esperado. Para os valores de 0 e 100% fazer a diferença entre os valores da porcentagem de efeito observado corrigido e os valores da porcentagem de efeito esperado obtidos através do gráfico. Listar as diferenças em valores absolutos.
- b) Utilizando o nomográfico da Figura 2 e uma régua, conectar o valor da escala porcentagem de efeito esperado com o valor da diferença entre o valor esperado e o observado, sendo que no ponto de intersecção na escala do  $\chi^2$  serão obtidos os valores de contribuição do  $\chi^2$  para cada concentração selecionada.
- c) Somar as contribuições do  $\chi^2$  e multiplicar pelo número médio de animais por concentração (N), isto é, o número total de animais dividido pelo número de concentrações testadas. O valor assim obtido é o  $\chi^2$  da reta.
- d) Achar os graus de liberdade (n) da seguinte maneira: diminuir duas unidades do número de pontos colocados no gráfico (K), inclusive os valores de 0 e 100% (portanto,  $n=K-2$ ).
- e) Verificar na Tabela 3 se o  $\chi^2$  calculado para a reta é menor que o valor do  $\chi^2$  dado pela tabela para n graus de liberdade. Portanto, neste caso admite-se que a reta está bem ajustada. Caso contrário, refazer a reta e calcular novamente o  $\chi^2$ .

TABELA 3 - Valores de  $\chi^2$  (P = 0,05)

Graus de liberdade (n)	$\chi^2$
1	3,84
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,1
6	12,6
7	14,1
8	15,5
9	16,9
10	18,8

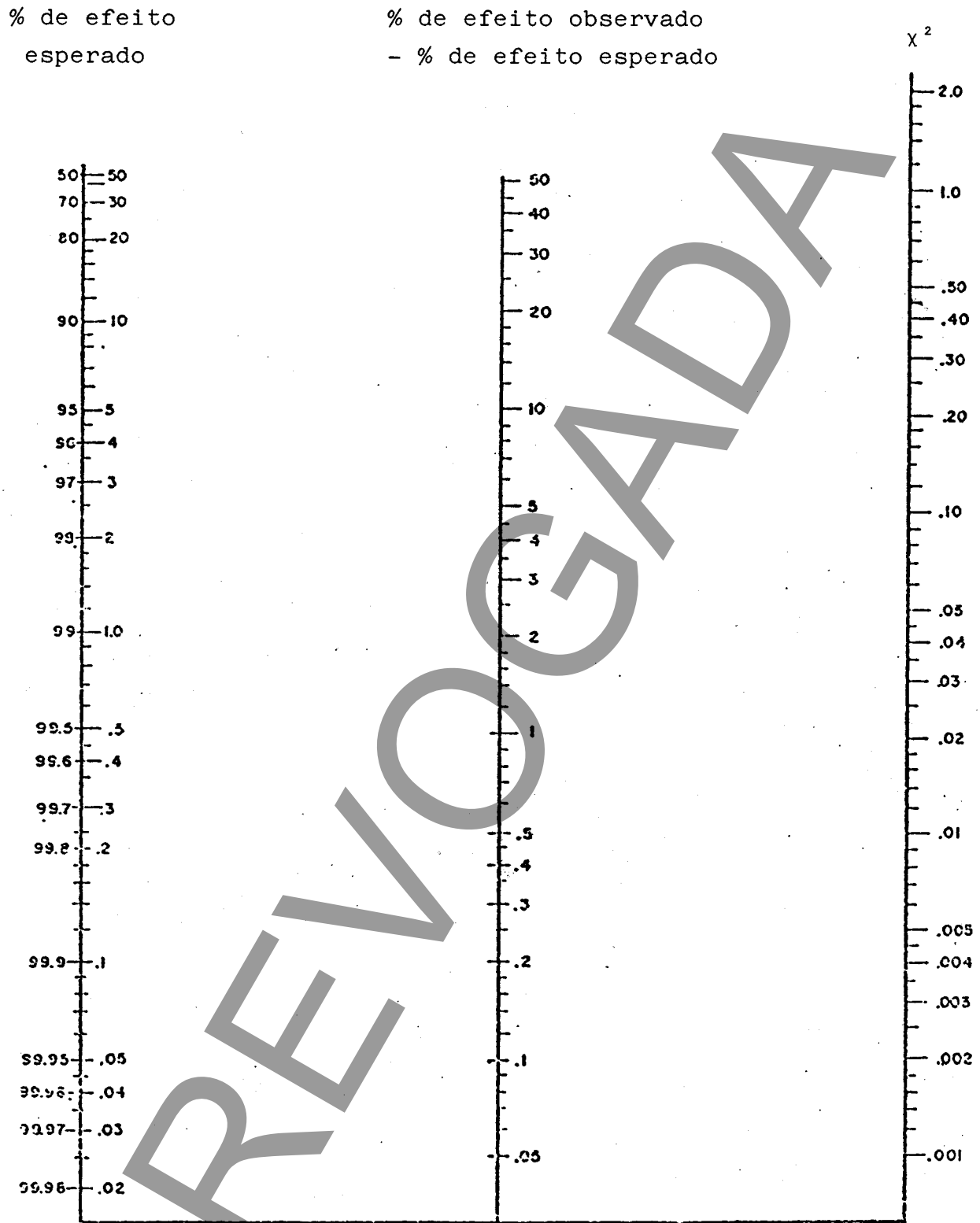


FIGURA 2 - Nomográfico para obtenção do  $\chi^2$



#### 4.2.2.5 Determinação da CL50 ou CE50

Através da reta traçada, obter no eixo logarítmico a concentração correspondente a 50% de efeito observado no eixo probabilístico. A concentração assim obtida é a CL50 ou CE50.

#### 4.2.2.6 Cálculo do intervalo de confiança (a nível de 95%)

a) Obter no gráfico as concentrações correspondentes a 16, 50 e 84% de efeito esperado.

b) Calcular a inclinação da reta (S) da seguinte maneira:

$$S = \frac{CL84/CL50 + CL50/CL16}{2}$$

c) Obter o valor de N', isto é, o número total de organismos utilizados nas concentrações testadas, nas quais obteve-se uma porcentagem de efeito esperado entre 16 e 84%.

d) Calcular o expoente E para a inclinação da reta (S) e o fator (fCL50) conforme as expressões abaixo:

$$E = 2,77/\sqrt{N'}$$

$$fCL50 = S^E = S^{2,77/\sqrt{N'}}$$

O fCL50 ou fCE50 podem ser obtidos diretamente no nomográfico da Figura 3, utilizando o expoente E e o valor de S, conectando esses pontos com o auxílio de uma régua. Dessa forma o ponto de intersecção, no centro da escala nomográfica, será o fCL50.

e) Para o cálculo dos limites de confiança utilizar as expressões abaixo:

$$CL50 \cdot fCL50 = \text{limite superior com 95\% de confiança}$$

$$CL50/fCL50 = \text{limite inferior com 95\% de confiança}$$

#### 4.2.3 Exemplo de cálculo da CE50:

Cálculo da CE50 através do método de Litchfield-Wilcoxon

- Tabular os dados obtidos no experimento, como na Tabela 4.
- Utilizando papel prob-log, plotar os dados de porcentagem de efeito observado em função das respectivas concentrações testadas. Ajustar uma reta através dos pontos obtidos.
- Da reta traçada, verificar os valores esperados e tabulá-los na coluna "% de efeito esperado" da Tabela 4.
- Ver na Tabela 2, os valores corrigidos de 0 e 100%, verificar se a reta traçada parece adequada, tabular estes valores na coluna "% de efeito observado" e colocá-los no gráfico (ver Figura 4).
- Se a reta traçada parecer bem ajustada fazer o cálculo do

$\chi^2$  como indicado no item 4.2.2.4 sendo que:

- número médio de animais por concentração: 20
- cálculo do CHI-quadrado:  $\chi^2 = N \times \Sigma \chi^2 = 20 \times 0,0660 = 1,32$
- graus de liberdade:  $n = K - 2$ ;  $K = 6$  portanto  $n = 4$
- da Tabela 3, o  $\chi^2$  para 4 graus de liberdade é igual a 9,49
- o valor de  $\chi^2$  encontrado é menor que o dado pela Tabela 3 para  $n = 4$ , portanto, admite-se que a reta esteja bem ajustada;

TABELA 4 - Exemplo de cálculo de CE50 pelo método Litchfield-Wilcoxon

conc. (mg/L)	nº org. afetados / nº org. testados	% efeito observado	% efeito esperado	% efeito observado menos % efeito esperado	$\chi^2$
0,17	20/20	100(98)	94	4	0,03
0,13	14/20	70	76	6	0,022 5
0,10	10/20	50	48	2	0,001 8
0,08	4/20	20	23	3	0,005
0,062	1/20	5	5	1	0,001 9
0,048	0/20	0 (0,3)	1,1	0,8	0,004 75
				Total	0,066 0

N = 20

K = 6

f) Determinar a CE50 e o intervalo de confiança a nível de 95%:

- obter no gráfico (ver Figura 4) os valores das concentrações correspondentes a 16, 50 e 84% de efeito esperado:

$$CE_{84} = 0,14 \text{ mg/L}$$

$$CE_{50} = 0,10 \text{ mg/L}$$

$$CE_{16} = 0,074 \text{ mg/L}$$

- inclinação da reta (S):

$$S = \frac{CE_{84}/CE_{50} + CE_{50}/CE_{16}}{2}$$

$$S = \frac{0,14/0,10 + 0,10/0,074}{2}$$

$$S = 1,38$$

- determinar N' como descrito em 4.2.2.6 (c), analisando a Tabela 4

- calcular o expoente (E) e o fator (fCE50).

$$E = 2,77 / \sqrt{N'}$$

$$E = 2,77 / \sqrt{60}$$

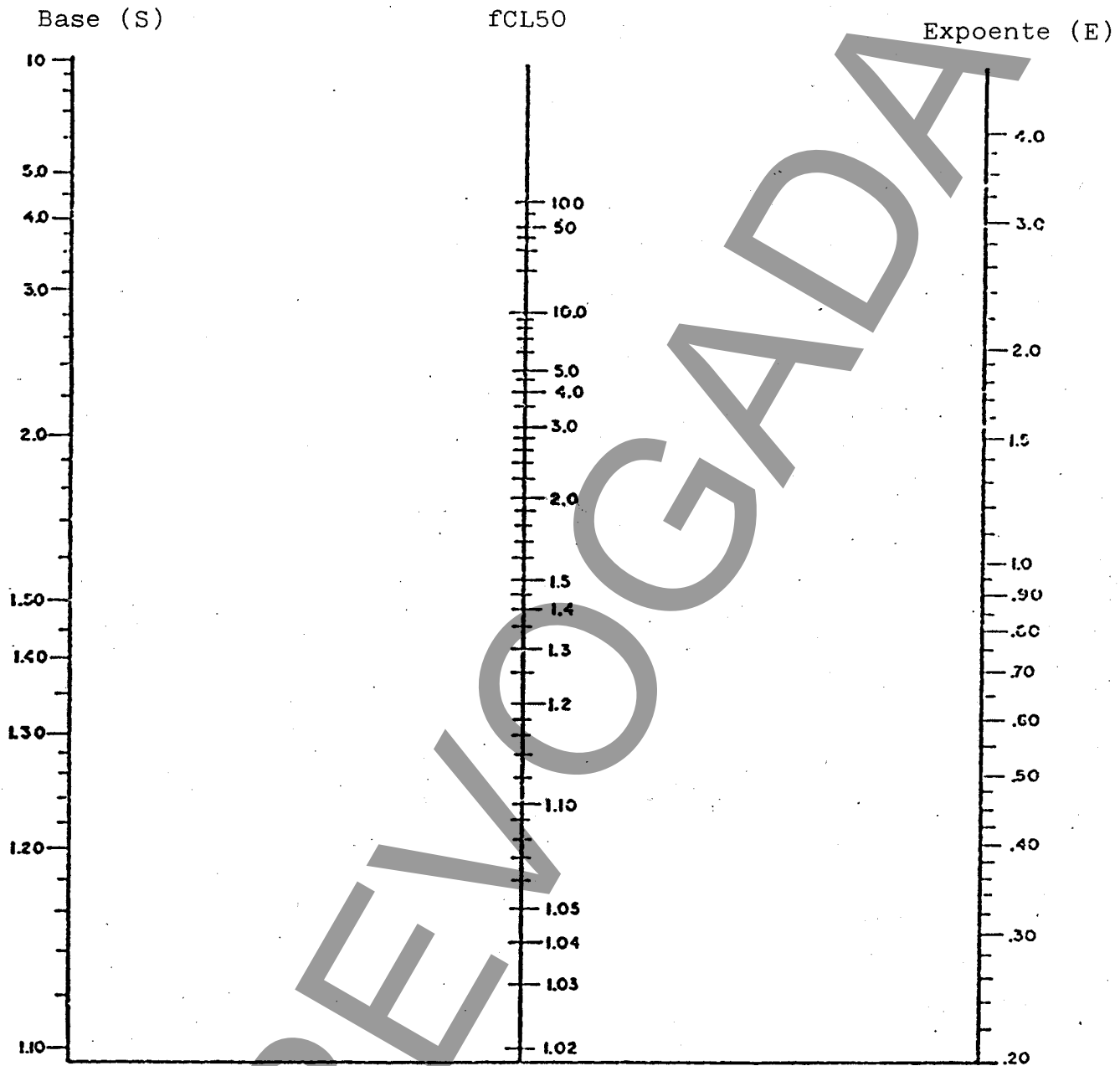


FIGURA 3 - Nomográfico para elevar a base S ao expoente fracional

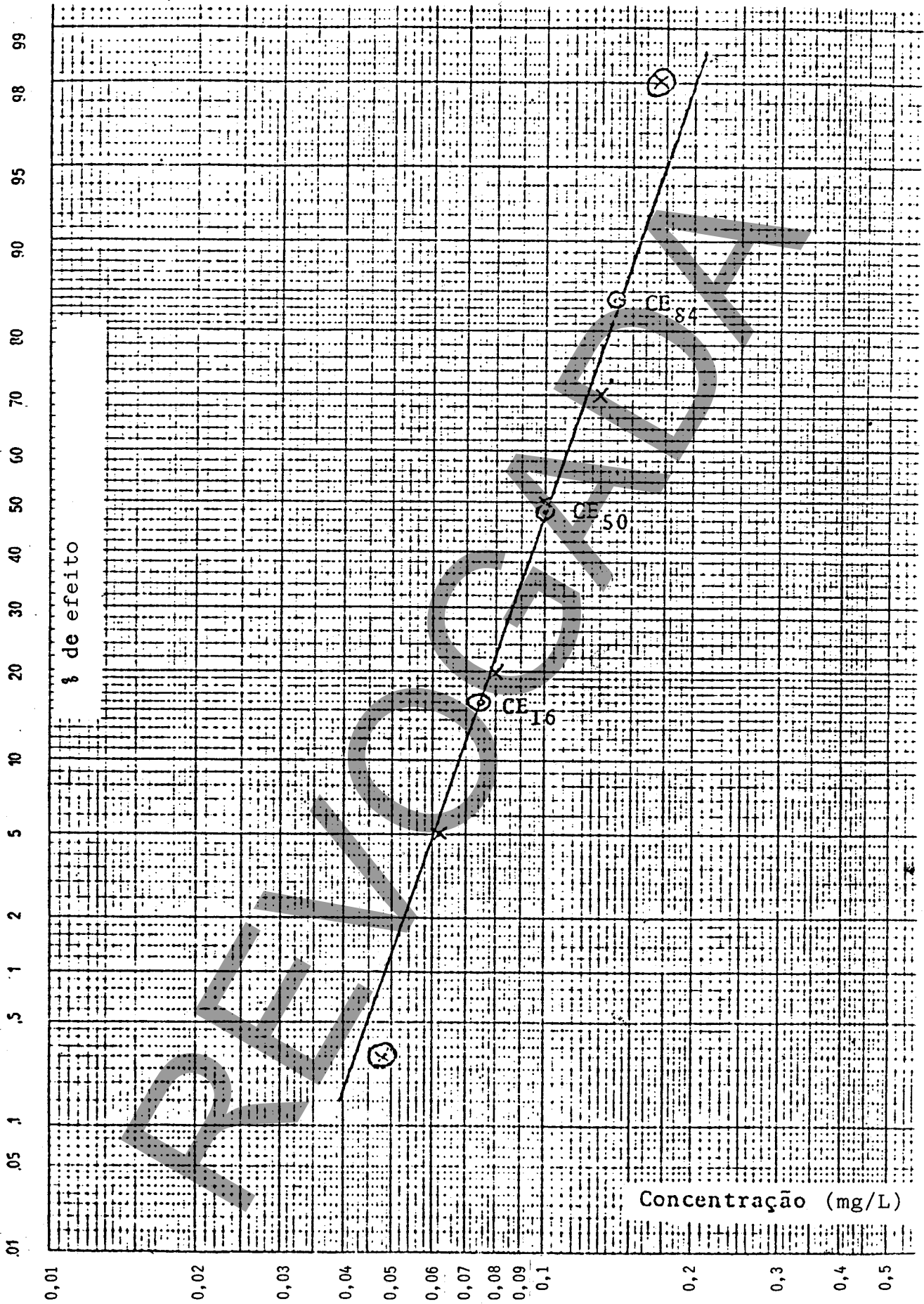


FIGURA 4 - Representação gráfica da CE50

$$E = 0,36$$

$$fCE50 = S^E$$

$$fCE50 = 1,38^{0,36}$$

$$fCE50 = 1,12$$

- pode-se calcular fCE50 também pela Figura 3, conectando os valores de S e E com o auxílio de uma régua. Ler o valor de fCE50 no centro da escala nomográfica (fCE50 = 1,12).

- calcular o intervalo de confiança a nível de 95%:

limite superior:

$$CE50 \cdot fCE50 = 0,10 \times 1,12 = 0,11$$

limite inferior:

$$CE50/fCE50 = 0,10/1,12 = 0,09$$

Portanto, a CE50 será igual a 0,1 mg/L, sendo que o intervalo de confiança ao nível de 95% será de 0,09 a 0,11 mg/L.

### 4.3 Método dos probitos

#### 4.3.1 Princípio do método

Este método consiste na elaboração de um gráfico a partir dos dados obtidos no teste de toxicidade aguda para determinar a CE50 ou CL50 de um agente tóxico. Utilizam-se neste método as porcentagens de organismos afetados convertidos em probitos (unidades de probabilidade) e as concentrações do agente tóxico testados transformados em logaritmos. Uma forma simplificada da aplicação deste método para o cálculo da CL50 ou CE50 é dada a seguir, utilizando-se um exemplo hipotético.

É importante ressaltar que as tabelas fornecidas nesta Norma são resumidas. Tabelas mais completas podem ser obtidas em Finney (1964) (ver Anexo B-B-5)

Nota: Para o cálculo da CL50 ou CE50 por este método, é necessário obter, pelo menos, duas porcentagens intermediárias de efeito observado (valores entre 0 e 100%)

#### 4.3.2 Exemplo do método simplificado (ver Anexo B-B-4)

4.3.2.1 Elaborar uma tabela (ver Tabela 5) com os seguintes dados:

- a) concentrações da substância testada, usadas no teste (em %);
- b)  $\log_{10}$  das concentrações do agente tóxico testado (x);
- c) número de organismos em cada concentração (N);
- d) número de organismos mortos em cada concentração (r);
- e) porcentagem de mortalidade em cada concentração (P);
- f) probito empírico (PE);
- g) probito esperado ou calculado (Y);

Nota: As alíneas a a e são provenientes de dados experimentais; as alíneas f e g são descritas nas seções 4.3.2.2 (a) e 4.3.2.3 (b), respectivamente.

TABELA 5 - Exemplo do cálculo da CL50 através do método dos probitos

Concentração do agente tóxico (%)	$\log_{10}$ das concentrações (x)	Número de organismos (N)	Número de organismos mortos (r)	% de mortalidade (P)	Probita empírico (PE)	Probita calculado (Y)
100	2,00	20	15	75	5,67	5,53
50	1,70	20	9	45	4,87	4,96
25	1,40	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,10	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,80	20	1	5	3,36	3,27

#### 4.3.2.2 Cálculo da CL50

- O probito empírico (PE) é obtido da Tabela 6, entrando com o valor da porcentagem de mortalidade observada em cada concentração (P), nas margens da Tabela.
- Fazer um gráfico (em papel quadriculado) colocando  $\log_{10}$  das concentrações da substância testada (x) e o probito empírico (PE). Ajustar uma reta através dos pontos (ver Figura 5).
- Verificar no gráfico o valor da CL50, isto é, o  $\text{antilog}_{10}$  da concentração (m) que corresponderá ao probito empírico de 5,0. Neste exemplo  $m = 1,72$ , portanto,  $CL50 = 52,5 \text{ mg/L}$ .

TABELA 6 - Relação entre probito empírico e porcentagem de mortalidade

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 <sup>a</sup>	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

a = valores entre 99,0 e 99,9.

#### 4.3.2.3 Cálculo do probito esperado ou calculado

- a) Da reta traçada, calcule "S" (a taxa de aumento do log da concentração (x) por unidade de aumento do probito esperado) da seguinte maneira: tomar o  $\log_{10}$  da concentração em que foi observada maior e menor porcentagem de efeito e os valores correspondentes do probito empírico no gráfico (ver Figura 5).

No exemplo, ter-se-á:

$$x = 0,80 \quad PE = 3,30$$

$$x = 2,00 \quad PE = 5,55$$

$$\text{Portanto: } S = \frac{(2,00 - 0,80)}{(5,55 - 3,30)}$$

$$S = 0,533$$

- b) Os valores do probito esperado ou calculado (Y), para cada concentração podem ser calculados através da expressão:

$$Y = 5 + \frac{(x - m)}{S}$$

Colocar os valores assim obtidos na Tabela 5.

#### 4.3.2.4 Teste do CHI-Quadrado ( $\chi^2$ )

Para testar a hipótese de não associação entre a concentração da substância tóxica e a resposta em probito é necessário realizar o teste do  $\chi^2$ . Os dados para o cálculo do  $\chi^2$  são colocados na Tabela 7, do seguinte modo:

- concentração da substância testada;
- $\log_{10}$  das concentrações testadas (x);
- probita calculado ou esperado (Y);
- porcentagem do efeito esperado (P');
- número de organismos (N);
- mortalidade observada (r);

Nota: Os itens a, b, c, e, f são obtidos na Tabela 5. O item d é obtido da Tabela 6 entrando com os valores de Y, isto é probito calculado ou esperado, no corpo da tabela. Ler os valores da porcentagem esperada nas margens da Tabela 6. Colocar estes valores na Tabela 7, dividindo cada um deles por 100.

- calcular a mortalidade esperada, multiplicando o número de organismos em cada concentração (N) pela porcentagem de efeito esperado (P');
- calcular o desvio na mortalidade, subtraindo da mortalidade observada (r) a mortalidade esperada (NP');
- calcular a contribuição para o CHI-quadrado ( $\chi^2$ ) de cada

um destes valores, da seguinte maneira:

$$\frac{(r - NP')^2}{NP' (1 - P')}$$

j) somar estas contribuições;

k) calcular os graus de liberdade (n)

$n = K - 2$  (K = número de concentrações utilizadas na análise dos probitos). No exemplo, K = 5; portanto, n = 3.

l) ver na Tabela 3 o valor de  $\chi^2$  correspondente a 3 graus de liberdade. Verifica-se assim que para n = 3 o  $\chi^2$  máximo aceitável é 7,82. Comparando-se este com a contribuição para o  $\chi^2$  dos dados experimentais (0,482), observa-se que este último é menor do que o tabelado; portanto, a reta está bem ajustada.

TABELA 7 - Determinação do CHI-Quadrado ( $\chi^2$ )

Concentração da substância testada (%)	$\log_{10}$ das concentrações (x)	Probitos calculado (Y)	% de efeito esperado (P')	Nº de organismos testados (N)	Mortalidade observada (r)	Mortalidade esperada (NP')	Desvio (r-NP')	Contribuição para o CHI-quadrado ( $\chi^2$ ) $\frac{(r - NP')^2}{NP' (1 - P')}$
100	2,00	5,53	0,705	20	15	14,1	0,9	0,81/4,16=0,195
50	1,70	4,96	0,485	20	9	9,7	-0,7	0,49/4,99=0,098
25	1,40	4,40	0,275	20	5	5,5	-0,5	0,25/3,99=0,063
12,5	1,10	3,84	0,125	20	2	2,5	-0,5	0,25/2,19=0,114
6,25	0,80	3,27	0,045	20	1	0,9	0,1	0,01/0,86=0,012
								0,482

#### 4.3.2.5 Preparo dos dados para o cálculo do erro padrão

Colocar em uma tabela (Tabela 8) os seguintes dados:

- $\log_{10}$  das concentrações testadas (x);
- número de organismos testados em cada concentração (N);
- probitos esperado ou calculado (Y);
- fator p, deve ser obtido através da Tabela 9, entrando com o valor de Y (probitos calculado) nas margens da referida tabela. Para melhor utilização da Tabela 9 recomenda-se que sejam utilizados os valores de Y com dois algarismos significativos;
- produtos  $Np$ ,  $Npx$  e  $Npx^2$ , calculados através dos dados contidos nessa mesma tabela. A soma desses produtos corresponde aos valores  $\sum Np$ ,  $\sum Npx$  e  $\sum Npx^2$ .



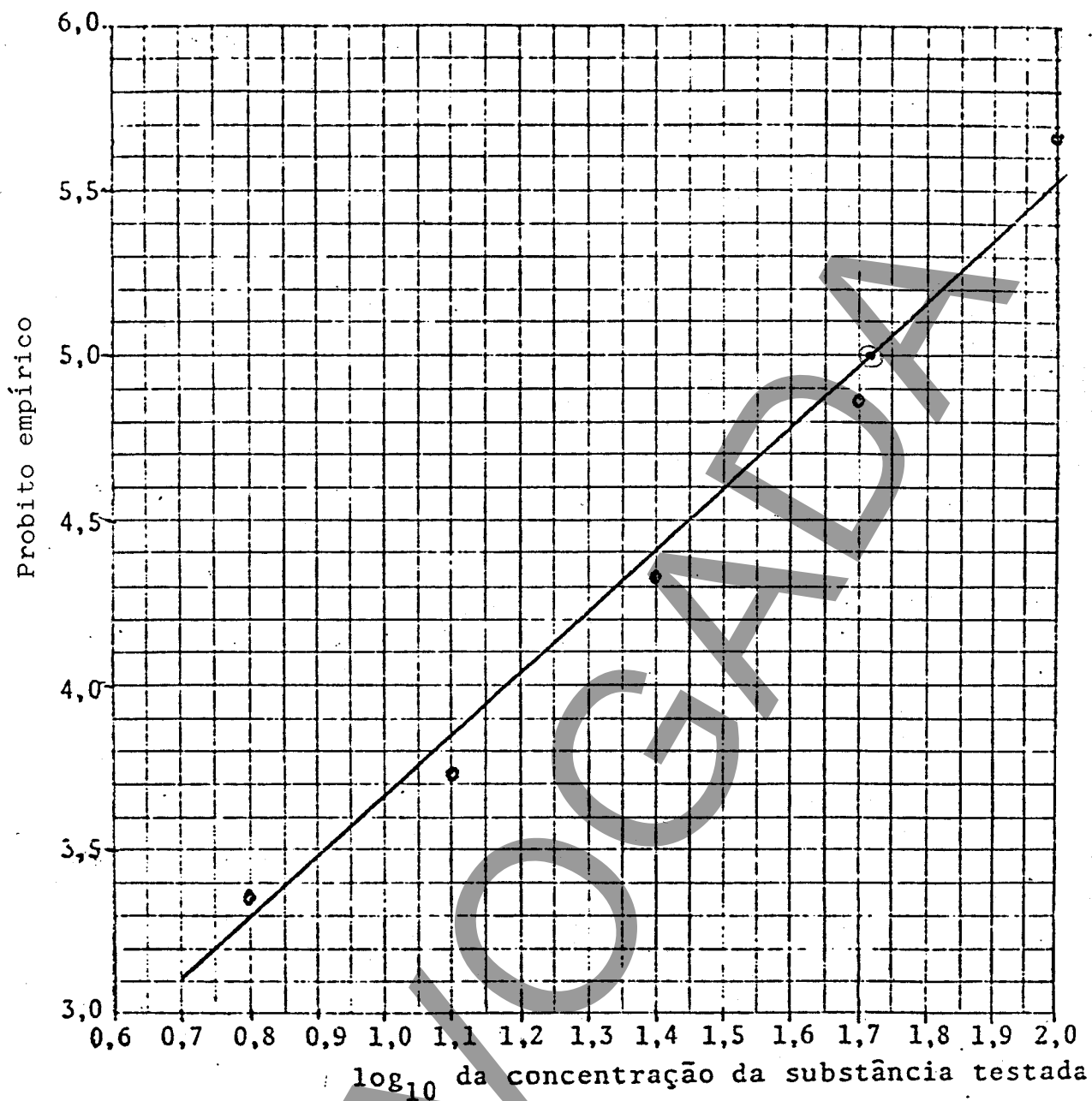


FIGURA 5 - Representação gráfica da CL50

#### 4.3.2.6 Cálculo do erro padrão

a) O erro padrão do log da concentração letal a 50% dos organismos ( $EP \log_{10} CL_{50}$ ) deve ser obtido através da seguinte expressão, utilizando os dados da Tabela 8:

$$EP \log_{10} CL_{50} = \left\{ S^2 \left[ \frac{1}{\sum Np} + \frac{(m-x)^2}{\sum Np(x-x^2)} \right] \right\}^{0,5}$$

onde, no exemplo dado:

$$S = 0,533 \text{ (ver 4.3.2.3 a)}$$

$$x = \frac{\sum Npx}{\sum Np} = 1,527$$

$$m = 1,72 \text{ (ver 4.3.2.2 c)}$$

$$\sum Np = 46,88 \text{ (ver Tabela 8)}$$

$$\Sigma Npx = 71,61 \text{ (ver Tabela 8)}$$

$$\Sigma Npx^2 = 115,96 \text{ (ver Tabela 8)}$$

$$\Sigma Np(x-x^2) = Npx^2 - [(\Sigma Npx)^2 / \Sigma Np] = 6,574$$

Substituindo estes valores na expressão acima, tem-se:

$$EP \log_{10} CL50 = 0,0875$$

b) Para calcular a EPCL50, utilizar a seguinte expressão:

$$EPCL50 = \log_e 10 \times EP \log_{10} CL50 \times 10^m$$

$$\text{onde: } \log_e 10 = 2,3026$$

$$EP \log_{10} CL50 = 0,0875$$

$$10^m = 52,5 \text{ (ver 4.3.2.2 c)}$$

Substituindo estes valores na expressão, temos:

$$EPCL50 = 10,58$$

TABELA 8 - Cálculo do erro padrão de  $\log_{10} CL50$

$\log_{10}$ das concentrações (x)	Nº de organis- mos testados (N)	Probitos calculado (Y)	Fator (p)	Produto (Np)	Produto (Npx)	Produto (Npx <sup>2</sup> )
2,00	20	5,53	0,569	11,38	22,76	45,52
1,70	20	4,96	0,635	12,70	21,59	36,70
1,40	20	4,40	0,558	11,16	15,62	21,87
1,10	20	3,84	0,388	7,76	8,54	9,39
0,80	20	3,27	0,194	<u>3,88</u>	<u>3,10</u>	<u>2,48</u>
			Soma ( $\Sigma$ ) <sup>a</sup>	46,88	71,61	115,96

a = ver 4.3.2.5

TABELA 9 - Fator (p) para o probito calculado (Y)

Y	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,060	0,062	0,076	0,092	0,110
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,269	0,302	0,336	0,370	0,406
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,581	0,601	0,616	0,627	0,634
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,581	0,558	0,532	0,503	0,471
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,154
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,050	0,050	0,031	0,025	0,019
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001

4.3.2.7 Através dos cálculos efetuados com base nos dados hipotéticos, temos:

CL50 = 52,5 mg/L (ver 4.3.2.2 c)

Intervalo de confiança =  $52,5 \pm 10,58$  ou seja, de 41,9 a 63,1 mg/L.

---

/ANEXO A

REVOGADA

## ANEXO A

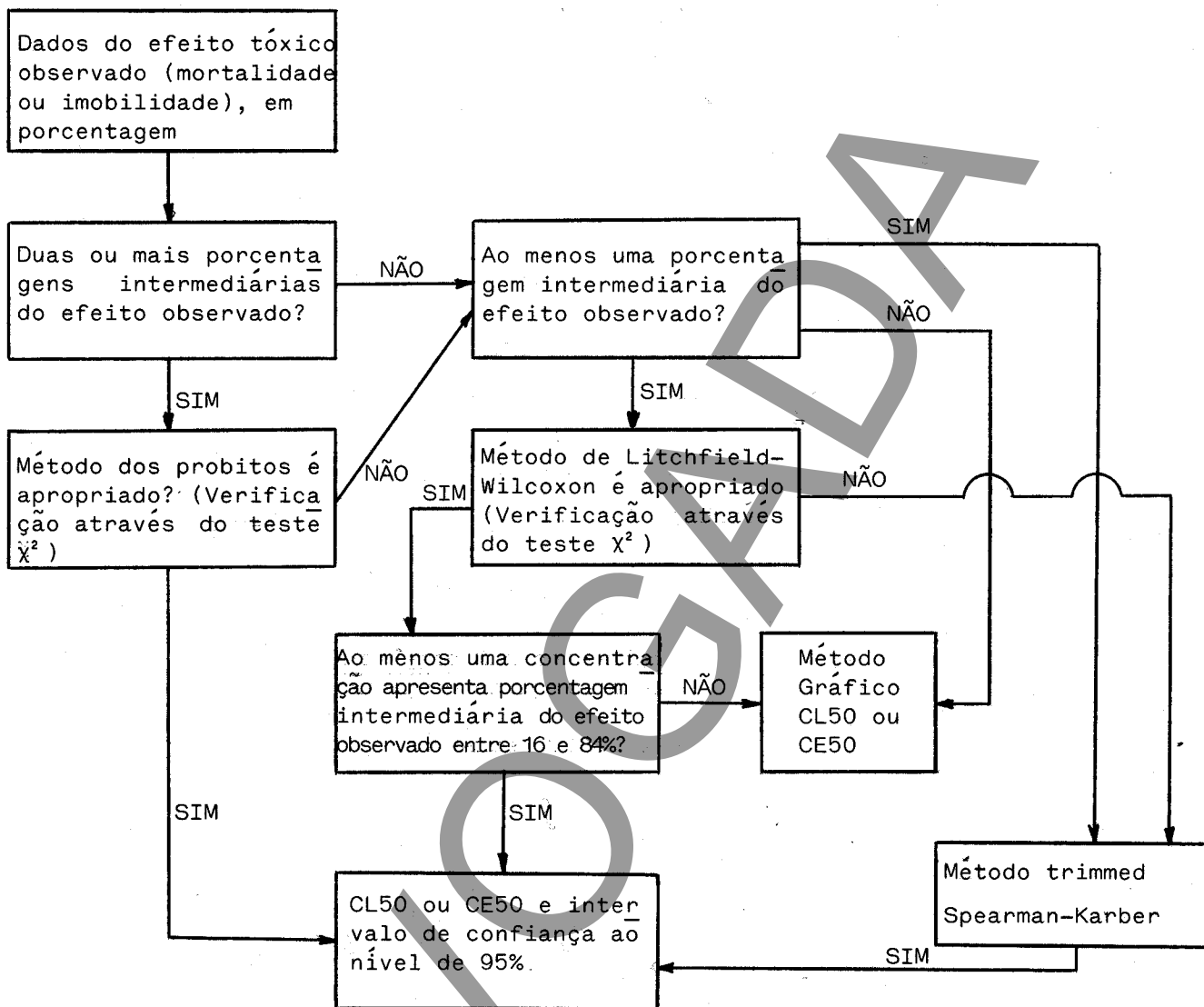


FIGURA A-1 - Fluxograma para determinação da CL50 ou CE50 de teste de toxicidade aguda

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA), Probit Method de desenvolvido pela EMSL - Cincinnati. Programa escrito em IBM PC BASIC para PC compatível IBM, por Computer Science Corporation (26W, Martin Luther King Drive, Cincinnati, Ohio, 45268 - USA).
- B-2 U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA), Trimmed Spearman Karber Method modificado para EMSL-Cincinnati. Programa escrito em Borland Turbo C para PC compatível IBM, por Computer Science Corporation (26W, Martin Luther King Drive, Cincinnati, Ohio, 45268 USA).
- B-3 PELTIER, W.H. & WEBER, C.I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 3rd. ed. EPA/600/4-85/013. Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 1985, p. 50-90.
- B-4 LITCHFIELD, J.T. & WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose effect experiments. J.Pharm.Exp.Theor. 96:99-113, 1949.
- B-5 FINNEY, D.J. Statistical method in biological assay. 2nd. ed. Hafner Publ. Company, New York, 1964, 668 p.