

CETESB	ÁGUA DO MAR – TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <u>ARTEMIA</u> Método de ensaio	L5.021 JUN/91
--------	---	------------------

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Norma complementar.....	1
3 Definições.....	1
4 Princípio do método.....	2
5 Aparelhagem.....	2
6 Execução do ensaio.....	3
7 Resultados.....	9
Anexo A - Figuras.....	11
Anexo B - Referências bibliográficas.....	15

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de determinação da concentração de um dispersante químico de petróleo que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos, nas condições estabelecidas de teste.

Nota: Com algumas modificações, este método pode ser aplicado a outros agentes tóxicos.

2 NORMA COMPLEMENTAR

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.017 - Análise estatística dos resultados de testes de toxicidade aguda.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.10.

3.1 Agente tóxico

Substância ou formulação química que pode causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

3.2 Água de diluição

Água utilizada para obtenção dos náuplios de Artemia e realização de testes.

3.3 Concentração letal inicial média [CL(I)50; 48 h]

Concentração nominal do agente tóxico, no início do teste, que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos, em 48 h de exposição,

nas condições do teste.

3.4 Dispersante químico de petróleo

Mistura constituída principalmente de surfactante e solvente, a qual, em contato com o óleo, reduz a tensão interfacial entre o óleo e a água, provocando a dispersão do primeiro.

3.5 Efeito agudo

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

3.6 Organismo-teste

Organismo utilizado no teste de toxicidade: náuplios de Artemia.

3.7 Soluções-estoque

Soluções do agente tóxico, em diferentes concentrações, a partir das quais são preparadas as soluções-teste.

3.8 Soluções-teste

Soluções finais do agente tóxico, nas quais são colocados os organismos-teste.

3.9 Substância de referência

Substância química utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste.

3.10 Teste de toxicidade

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

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de náuplios de Artemia, de cerca de 24 horas de idade, a várias concentrações de um agente tóxico, nas condições prescritas nesta Norma, por um período de 48 h. Tal procedimento permite determinar a CL(I)50; 48 h do agente tóxico em teste.

4.2 O método pode ser executado em duas etapas:

- a) teste preliminar, para estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo;
- b) teste definitivo, para determinar a CL(I)50; 48 h.

5 APARELHAGEM

5.1 Equipamentos

5.1.1 Medidor de oxigênio dissolvido.

5.1.2 Medidor de pH (potenciômetro).

5.1.3 Microscópio estereoscópico.

5.1.4 Misturador elétrico com velocidade angular de 10 000 rpm ou menos, acoplado a uma haste com três hélices de aço inox.

5.2 Vidraria

5.2.1 Béqueres de vidro, de 1 000 mL.

5.2.2 Béqueres de vidro, de 30 mL.

5.2.3 Cuba de vidro, de 4 000 mL, com divisória de vidro, ou funil de separação, de 2 000 mL.

5.2.4 Pipetas de Mohr, de 1, 5 e 10 mL.

5.2.5 Pipetas de Pasteur, com ponta arredondada.

5.2.6 Placas de vidro, com aproximadamente 8,9 cm de diâmetro e 3,8 cm de altura.

5.2.7 Provetas de vidro, de 50 e 100 mL.

5.2.8 Seringa de vidro, de 1 mL, com êmbolo com ponta de "teflon".

Nota: Todo material que entre em contato com o agente tóxico deve ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução dos testes devem ser de grau analítico.

6.1.1 Ácido bórico (H_3BO_3).

6.1.2 Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$).

6.1.3 Brometo de potássio (KBr).

6.1.4 Cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$).

6.1.5 Cloreto de estrôncio ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$).

6.1.6 Cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).

6.1.7 Cloreto de potássio (KCl).

6.1.8 Cloreto de sódio (NaCl).

6.1.9 Dodecil sulfato de sódio (DSS).

6.1.10 Fluoreto de sódio (NaF).

6.1.11 Metassilicato de sódio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$).

6.1.12 Sal tetrassódio do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-Na).

6.1.13 Sulfato de sódio (Na_2SO_4).

6.2 Lavagem do material

6.2.1 A vidraria nova a ser utilizada em testes de toxicidade deve ser lavada com detergente neutro e enxaguada com água de torneira, acetona pura, solução de ácido nítrico a 5% e água destilada.

6.2.2 Todo o material utilizado nos testes de toxicidade com dispersante e DSS deve ser lavado com detergente neutro e enxaguado com água de torneira, solvente (metanol ou etanol), água de torneira e água destilada.

6.3 Armazenamento do dispersante

A amostra do dispersante deve ser armazenada em frascos de vidro de pequeno volume, totalmente cheios, bem vedados, no escuro e à temperatura ambiente de aproximadamente 22°C . Estes cuidados devem ser tomados para evitar a perda de voláteis e outras modificações na amostra.

6.4 Água de diluição

Para a realização do teste prescrito nesta Norma, utiliza-se como água de diluição água do mar reconstituída.

6.4.1 Utilizar água destilada ou desionizada, com condutividade igual ou menor que $10 \mu\text{S}/\text{cm}$, isenta de contaminantes.

6.4.2 Dissolver os sais e adicioná-los na ordem e quantidades listados na Tabela 1, em 900 mL de água destilada ou desionizada. Cada sal deve ser previamente dissolvido em pequena quantidade de água e, em seguida, acrescentado à mistura.

6.4.3 Após adição de todos os sais, adicionar água destilada ou desionizada até completar 1 000 mL.

6.4.4 A água assim preparada deve ter salinidade de $(20 \pm 1)^\circ/\text{oo}$ e pH entre $8,0 \pm 0,2$. Caso isto não ocorra, a salinidade final deverá ser ajustada para este valor. Diluir com quantidade suficiente de água destilada ou desionizada para obter água com salinidade adequada. Se necessário, acertar o pH com solução de bicarbonato de sódio.

6.4.5 Antes de utilizar a água, filtrar através de membrana de acetato de celulose de porosidade $0,22 \mu\text{m}$.

TABELA 1 - Água do mar reconstituída

Sal	Quantidade* (g)
NaF	0,001 9
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,013
H ₃ BO ₃	0,020
KBr	0,067
KCl	0,466
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,733
Na ₂ SO ₄	2,660
MgCl ₂ .6H ₂ O	3,330
NaCl	15,650
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	0,013
EDTA	0,000 4
NaHCO ₃	0,133

* Quantidade dos sais para o preparo de 1 000 mL de água de diluição.

6.5 Organismos-teste

6.5.1 Neste teste são utilizados náuplios de Artemia com 24 horas de vida, obtidos através da hidratação de cistos de origem conhecida. Estes podem ser mantidos por longos períodos em condições viáveis, o que permite a obtenção de organismos para a realização dos testes sempre que for necessário, utilizando-se um procedimento adequado para eclosão dos cistos.

6.5.2 Os náuplios de Artemia podem ser obtidos através dos procedimentos descritos em 6.5.2.1 e 6.5.2.2.

6.5.2.1 Utilizar uma cuba de vidro de 4 000 mL, com uma divisória de vidro que vá desde a superfície até 1,9 a 1,3 cm do fundo. Acrescentar 1 500 mL de água do mar reconstituída e espalhar, sobre a superfície, cerca de 0,2 g de cistos de Artemia em uma das divisões da cuba. Cobrir essa parte da cuba com um pano escuro ou material similar para manter os cistos ao abrigo da luz até que se complete o processo de eclosão. Após a eclosão dos cistos (cerca de 20 h), direcionar uma luz para a parte não coberta da cuba. Como a Artemia possui fototactismo positivo, os organismos recém-eclodidos direcionar-se-ão para o lado iluminado. Assim, os náuplios poderão ser facilmente coletados, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur com ponta arredondada. Os organismos devem ser transferidos para um cuba de vidro com água de diluição e devem ser mantidos nesse recipiente

até o início do teste.

6.5.2.2 Usar um funil de separação de vidro. Colocar aeração no fundo do funil, de modo que a taxa de aeração seja suficiente apenas para manter os cistos em suspensão. Após a eclosão dos cistos, remover a aeração. Os náuplios recém-eclodidos permanecerão no fundo do funil, enquanto as cascas vazias dos cistos ficarão na superfície. Assim, os náuplios poderão ser facilmente retirados, abrindo-se a torneira e transferindo-os diretamente para uma cuba de vidro com água de diluição. Manter os organismos nesse recipiente até o início do teste.

6.6 Sensibilidade

A sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada com a substância de referência, dodecil sulfato de sódio, sempre em paralelo ao teste com dispersante, segundo o método descrito nesta Norma.

6.7 Preparo da amostra

O preparo das soluções e todas as etapas de teste devem ser realizadas em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas, à temperatura de aproximadamente 22°C.

6.7.1 Solução-estoque

As soluções-estoque do dispersante a ser testado e substância de referência (DSS), devem ser preparadas no momento da execução do teste.

6.7.1.1 Preparar a solução-estoque de dispersante em um béquer de vidro de 1 000 mL. Acrescentar a esse frasco 550 mL de água do mar reconstituída e 0,55 mL da amostra do dispersante. Adicionar o dispersante, utilizando uma seringa de vidro com êmbolo com ponta de "teflon". Agitar a solução por 5 segundos a uma velocidade angular menor que 10 000 rpm (para evitar a formação de espuma e minimizar a perda de frações voláteis).

6.7.1.2 Pesar a substância de referência DSS, em um frasco de vidro. Dissolver em água destilada ou desionizada e transferir para um balão volumétrico.

6.7.2 Soluções-teste

As soluções-teste devem ser preparadas diretamente nas placas, imediatamente após o preparo da solução-estoque, utilizando-se as devidas proporções de soluções-estoque e água de diluição. Utilizar pipetas de Mohr para adicionar as quantidades adequadas das soluções-estoque de dispersante e DSS.

6.8 Procedimento geral

6.8.1 Os cistos de Artemia devem ser colocados para eclodir, seguindo-se o procedimento indicado em 6.5, aproximadamente 48 h antes do início do teste.

6.8.2 Após a eclosão dos cistos, transferir os náuplios para uma cuba de vidro com água de diluição. Deixar por 20 a 22 h nesse recipiente.

6.8.3 Após esse período, transferir, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, 20 organismos para béqueres de 30 mL, que contenham 20 mL de água de diluição.

6.8.4 Preparar as soluções-estoque e soluções-teste, segundo o procedimento indicado em 6.7.1 e 6.7.2.

6.8.5 No caso do teste com dispersante, é necessário agitar a solução-estoque cada vez que se adicionar uma quantidade da mesma às placas. Encher a seringa com o motor em funcionamento e desligá-lo imediatamente após a retirada de amostra para limitar a perda de voláteis.

6.8.6 Para cada teste preparar um controle somente com água de diluição e 20 organismos-teste por placa.

6.8.7 Após a adição da quantidade adequada de solução-estoque a cada uma das placas, completar o volume das mesmas para 80 mL com a água de diluição.

6.8.8 Transferir 20 organismos em 20 mL de água de diluição dos béqueres para as placas, completando-se assim o volume final para 100 mL. Isto deve ser feito 24 h após a eclosão dos náuplios.

6.8.9 Recomenda-se que os recipientes-teste sejam numerados aleatoriamente, sendo que esses números devem ser registrados em uma ficha a parte (Figura 1), com suas concentrações-teste correspondentes. Isso feito para que a leitura ao final do teste, seja realizada sem que o operador tenha conhecimento prévio da concentração da solução teste que está sendo analisada.

6.8.10 Incubar as placas a $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 h. Recomenda-se incubar as placas em uma câmara com iluminação difusa contínua de 2000 lux. A luz deve ser emitida por lâmpadas fluorescentes, colocadas na câmara incubadora, de maneira que a luz atinja a parte inferior das placas.

6.8.11 Após esse período, contar o número de organismos vivos e mor

tos, observando-os através de um microscópio estereoscópico. Para facilitar a leitura colocar as placas sobre uma superfície preta. Neste teste, os organismos que apresentem qualquer movimento quando tocados com a ponta de uma pipeta de Pasteur devem ser considerados vivos.

6.9 Teste preliminar

6.9.1 O teste preliminar deve ser realizado de acordo com o procedimento descrito em 6.8. Recomenda-se utilizar o intervalo de concentrações, como indicado na Tabela 2, sendo que são preparadas duas réplicas por concentração e controle.

TABELA 2 - Exemplo de preparo das soluções para a realização do teste preliminar

Solução-teste μL/L	Volumes a serem adicionados às placas para obtenção das soluções-estoque (mL)	
	Solução-estoque	Água de diluição
0,800	80	0
0,350	35	45
0,100	10	70
0,035	3,5	76,5
0,010	1,0	79,0
Controle		

6.9.2 O volume de cada placa é completado para 100 mL, através da adição de 20 mL de água de diluição com 20 organismos.

6.9.3 Após 48 horas do início do teste, contar o número de organismos vivos e mortos em cada uma das placas de teste e anotar esses dados na ficha, cujo modelo é apresentado na Figura 2. A seguir transferir esses dados para a ficha de registro definitivo dos dados conforme o modelo da Figura 3.

6.9.4 Estabelecer para o teste definitivo o intervalo de concentrações limitado pela menor concentração que causa letalidade a 100% dos organismos e pela concentração mais elevada em que não se observa letalidade dos organismos.

6.10 Teste definitivo

6.10.1 Utilizando o intervalo de concentrações estabelecido no teste preliminar (ver 6.9), preparar uma série de concentrações intermediárias obedecendo a uma progressão geométrica, por exemplo de razão 1,8 (ver Tabela 3), sendo que são preparadas cinco réplicas por concentração, além do controle.

TABELA 3 - Exemplo de preparo das soluções-teste para o teste definitivo

Solução-teste $\mu\text{L/L}$	Volumes a serem adicionados às placas para obtenção das soluções-teste (mL)	
	Solução-estoque	Água de diluição
0,560	56	24
0,320	32	48
0,180	18	62
0,100	10	70
Controle		

6.10.2 O volume de cada placa é completado para 100 mL através da adição de 20 mL de água de diluição com 20 organismos.

6.10.3 Após 48 horas do início do teste, contar o número de organismos vivos e mortos em cada uma das placas de cada concentração testada e anotar esses dados na ficha de teste, cujos modelos são apresentados nas Figuras 2 e 3.

6.10.4 Determinar a concentração de oxigênio dissolvido na concentração de teste mais elevada e no controle.

6.10.5 Com os dados obtidos no teste, calcular a $CL(I)50; 48 \text{ h}$.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo da $CL(I)50; 48 \text{ h}$

Com os dados obtidos no teste definitivo, determina-se a $CL(I)50; 48 \text{ h}$ e seu intervalo de confiança, através do método estatístico de Litchfield-Wilcoxon (1949) ou outro método utilizado para o mesmo fim (ver Norma CETESB L5.017).

7.2 Expressão dos resultados

A $CL(I)50$ e seu intervalo de confiança devem ser expressos em $\mu\text{L/L}$ ou mg/L .

7.3 Validade dos resultados

Consideram-se válidos os resultados que, ao término do período de teste, atenderem aos seguintes requisitos:

- a) porcentagem de mortalidade de organismos-teste no controle inferior a 10%;
- b) temperatura durante o decorrer do teste de $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.

7.4 Relatório

Devem constar do relatório final ou laudo as seguintes informações:

- a) identificação do produto;
 - nº da partida;
 - data da fabricação;
 - nome do fabricante;
- b) método utilizado para a avaliação da toxicidade do produto;
- c) procedência dos cistos de Artemia;
- d) resultado da CL(I)50;48 h com intervalo de confiança;
- e) dados físico- químicos (pH, OD.), que possam auxiliar na interpretação dos resultados;
- f) qualquer alteração introduzida ou eventuais ocorrências durante a realização dos testes que possam influenciar os resultados.

/ANEXO A - FIGURAS

ANEXO A - FIGURAS

FICHA DE CONTROLE - RANDOMIZAÇÃO DE PLACAS - TESTE Nº _____

Espécie: _____

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	AMOSTRA Nº

FIGURA 1 - Ficha para controle da randomização das placas de teste

REGISTRO DE DADOS DE TESTE

Teste nº: _____ Amostra: _____

Data e hora de início: _____ Data e hora do término: _____

Placa nº	Nº de organismos mortos/total
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	

FIGURA 2 - Modelo de ficha para registro de dados ao término do teste

REGISTRO DE DADOS DEFINITIVOS DO TESTE

Amostra: _____
 Organismo-teste: _____
 Método utilizado: _____
 Água de diluição-salinidade: _____
 pH: _____
 Início do teste: ____ / ____ / ____ às ____ horas
 Término do teste: ____ / ____ / ____ às ____ horas
 Operador: _____

Concentração ($\mu\text{L/L}$)	Nº de organismos mortos/nº total de organismos	Medida final de oxigênio dissolvido	S ^o /oo	pH	% mortalidade obtida

Observações: _____

FIGURA 3 - Modelo de ficha para o registro de dados definitivos do teste

REVOGADA

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 CETESB. São Paulo. Análise estatística dos resultados de ensaios biológicos com organismos aquáticos. L5.017 - Norma Técnica, São Paulo, 1977.
- B-2 LITCHFIELD, J.T. Jr. & WILCOXON, F.A. Simplified method of evaluating dose-effect experiments. J.Pharmac. Exp. Therap., 96: 99-113, 1949.