

**Uso de Macrófitas Lemnáceas como Organismos-Teste em  
Avaliações Toxicológicas**

Cristina Moreira Lalau

Orientador: Msc. Rodrigo de Almeida Mohedano

2010/2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E  
AMBIENTAL**

**USO DE MACRÓFITAS LEMNÁCEAS COMO ORGANISMOS-  
TESTE EM AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa  
Catarina para a Conclusão do Curso de Graduação em  
Engenharia Sanitária e Ambiental.**

**CRISTINA MOREIRA LALAU**

**Orientador  
Msc. Rodrigo de Almeida Mohedano**

**FLORIANÓPOLIS, (SC)  
DEZEMBRO/2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

USO DE MACRÓFITAS LEMNÁCEAS COMO ORGANISMOS-TESTE EM  
AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS

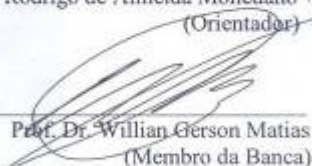
CRISTINA MORERA LALAU

Trabalho submetido à Banca Examinadora como partes dos  
requisitos para a Conclusão do Curso de Graduação em  
Engenharia Sanitária e Ambiental – TCC II

BANCA EXAMINADORA:



Msc. Rodrigo de Almeida Mohedano  
(Orientador)



Prof. Dr. Willian Gerson Matias  
(Membro da Banca)



Msc. Heloisa Fernandes  
(Membro da Banca)

FLORIANÓPOLIS, (SC)  
DEZEMBRO/2010

Moreira Lalau, Cristina

Uso de Macrófitas Lemnáceas como Organismos-Teste em Avaliações  
Toxicológicas

Cristina Moreira Lalau - Florianópolis, 2010.

xi, 72p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-Universidade  
Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Sanitária e  
Ambiental. Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Título em Inglês: Use of Duckweeds Macrophytes as an  
Organisms-Testing Toxicological Reviews.

*Dedico essa pesquisa aos meus pais, Kátia e Wilson, fontes de sabedoria, e, exemplo de fé e perseverança. Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e aos meus avôs que me ensinaram o verdadeiro significado da esperança e humildade.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me iluminado ao longo desta etapa de minha vida.

Ao meu orientador Msc. Rodrigo de Almeida Mohedano, por toda orientação prestada, paciência, dedicação e amizade. A sua ajuda fez com que eu acreditasse mais no meu potencial tanto para a realização desse trabalho, quanto para a vida inteira.

Aos meus pais Wilson e Kátia, que me repassaram toda a educação e virtudes que foram importantes no meu desenvolvimento pessoal e na conquista de meus objetivos.

Aos meus irmãos e amigos Marcelo, Camila e Maurício, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus avôs Lídia e Antônio que sempre me apoiaram em minhas decisões e sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.

Às minhas melhores amigas Renata e Amanda Stiz, acompanharam os momentos mais importantes de minha vida e me proporcionaram momentos de descontração e lazer, que também foram importantes no período de elaboração do trabalho.

À Marta, Juliana, Nathália, Vanessa Sant'ana, Ana Laura, Amanda Butendorf e Amanda Ferreira, amigas valiosas que conquistei ao longo da faculdade e levarei para a vida, pois sempre me ajudaram e participaram dos bons e maus momentos durante a realização da academia.

Aos membros da banca Prof. Dr. Willian Gerson Matias e Msc. Heloísa Fernandes por terem se disposto a conhecer e avaliar o meu trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Belli Filho por sempre ter acreditado no meu potencial e a toda a equipe do LABEFLU (Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos - ENS - UFSC) pelo auxílio prestado no decorrer do processo de elaboração do trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina por todo o conhecimento adquirido durante a graduação.

## Resumo

LALAU, C. M. **Uso de Macrófitas Lemnáceas como Organismo-Teste em Avaliações Toxicológicas.** Florianópolis, 2010, 72p. Trabalho de Conclusão de Curso-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

A Ecotoxicologia é uma área de estudo que visa a avaliação de impactos ambientais, onde se determina o nível de toxicidade de uma substância química no meio ambiente utilizando-se organismos vivos. Deste modo, os ensaios ecotoxicológicos podem detectar substâncias tóxicas não observáveis em avaliações físico-químicas tradicionais. No entanto, nessas metodologias geralmente os tipos de organismos-teste utilizados nem sempre representam os diferentes níveis das cadeias tróficas dos ecossistemas, principalmente quando se trata de plantas superiores. Tendo em vista esse fator o presente trabalho vem mostrar uma nova alternativa de organismos-teste. As macrófitas aquáticas conhecidas como lemnas, são utilizadas em testes toxicológicos com sucesso em diversos países, no entanto no Brasil o uso desse organismo é pouco expressivo. Dessa forma foram apresentados testes toxicológicos utilizando macrófitas lemnáceas, embasados em revisão bibliográfica de artigos e normatizações. Esses testes apresentam como indicadores de toxicidade os efeitos produzidos por uma determinada substância de ensaio sobre alguns parâmetros indicadores do desenvolvimento do organismo teste. Assim sendo, a elaboração do trabalho consistiu, principalmente, na tradução, revisão e elucidação das normatizações ISO/DIS 20079 e 221 OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). Também foram descritas as principais vantagens desses organismos quando comparados a outros organismos-teste submetidos a avaliações toxicológicas. A partir disso conclui-se que o uso de macrófitas lemnáceas em ensaios toxicológicos no Brasil poderá vir a contribuir no que diz respeito à sensibilidade e a confiabilidade dos testes, principalmente se tratando de substâncias que possam afetar o metabolismo de plantas superiores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Testes de Toxicidade, Organismo-teste, Lemnas.

## Abstract

LALAU, C. M. **Use of Duckweeds Macrophytes as an Organisms-Testing Toxicological Reviews.** Florianópolis, 2010, 72p. Trabalho de Conclusão de Curso-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

The Ecotoxicology is an area of study to assess environmental impacts, which determines the level of toxicity of a chemical in the environment using living organisms. Thus, ecotoxicological tests can detect toxic substances may not be observed in traditional physical-chemical evaluations. However, these methodologies usually the types of organisms used for testing do not always represent the different levels of food chains of ecosystems, especially when it comes to higher plants. Given this factor, the present study comes to show a new alternative of test organisms. The macrophytes known as Lemna are successfully used in toxicological tests in various countries, but in Brazil the use of this organism is little expressive. Thus, it is presented, based on bibliographical revision of articles and existing standardizations, toxicological tests using duckweeds. These tests have as indicators of toxicity effects produced by a given test substance on some indicative parameters of development of test organism. The elaboration of this study consisted especially in the translation, revision and explanation of ISO/DIS 20079 and the 221 OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) standardizations. Being that it has been intercalated the explanation of the test methodology with a comparative between the standardizations pointing out their major differences. It was also characterized the main advantages of these organisms when compared to other test organisms submitted to toxicological assessment. From this, it was concluded that the use of duckweeds in toxicological tests in Brazil will enable the contribution concerning sensitivity and reliability of tests, especially regarding substances which can affect the metabolism of higher plants.

**Key words:** Toxicological Reviews, Test Organisms, Duckweeds.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. <i>Objetivos Específicos</i> .....	4
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1. Importância dos testes toxicológicos</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2. Critérios para seleção de organismos-teste</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3. Principais organismos-teste utilizados</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4. As Lemnas</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5. Características que favorecem o uso das Lemnas como organismo-teste</b> .....	<b>22</b>
<b>3.6. Normatizações existentes</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7. Exemplos de testes toxicológicos utilizando lemnas</b> .....	<b>23</b>
3.7.1. <i>Avaliação de Toxicidade dos Sulfatos de Perfluorocitanos (PFOS) (BOUDREAU et. al., 2002)</i> .....	23
3.7.2. <i>Atribuição de Lemna gibba L. (lentilha) para bioensaios na avaliação da ecotoxicidade in situ (MKANDAWIRE e DUDEL, 2004) ..</i> .....	24
3.7.3. <i>Avaliação da Toxicidade de Nanopartículas de Óxido de Cobre a Partir de Imagem da Fluorescência da Clorofila da Lemna gibba (PERREAULT et al., 2010)</i> .....	25
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1. Exposição das duas normatizações revisadas</b> .....	<b>27</b>
5.1.1. <i>ISO DIS 20079</i> .....	27
5.1.2. <i>Normatização OECD (Organização para a Co-operação Econômica e de Desenvolvimento)</i> .....	42
<b>5.2. Vantagens do uso de lemnas em avaliações toxicológicas quando comparada a outros organismos-teste.</b> .....	<b>61</b>
<b>6. RECOMENDAÇÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>70</b>
<b>APÊNDICE I</b> .....	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Definição de alguns termos utilizados em teste de toxicidade – Fonte: (COSTA et al., 2008). .....	9
Figura 2: Distribuição de uma população de macrófitas lemnaças.....	19
Figura 3: Áreas em que existe a ocorrência das lemnas – Fonte: Cross, (2010). .....	20
Figura 4: Representação do Sistema Reprodutor e Alguns Aspectos Morfológicos das Macrófitas Lemnáceas – Fonte: Cross (2010).....	21

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.3-1: Métodos de Testes de Toxicidade Normalizados por Entidades no Brasil.....	14
Tabela 3.3-2: Principais tipos de bioensaios para avaliação de ecossistemas aquáticos e de efluentes como um todo. ....	16
Tabela 3: Meio de STEINBERG com o pH estabilizado (Modificado de acordo com Altenburger) .....	30
Tabela 4: Projeto da OECD, Outubro de 2000 – Meios de Cultura para Ensaio com a <i>Lemna minor</i> (Meio de crescimento Modificado da Norma Sueca (SIS)) .....	31
Tabela 5: Legenda e Considerações Referentes ao Meio de Cultura para Ensaio com a <i>Lemna minor</i> - Projeto da OECD.....	32
Tabela 6: Meio de APHA Modificado .....	33
Tabela 7: Considerações e Legenda Referentes à Tabela do Meio de APHA Modificado .....	33

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e as exigências da política econômica existente resultam na crescente exploração dos recursos naturais. O atual modelo de desenvolvimento econômico conduzido pela humanidade tem apresentado impactos sociais e ambientais de grandes proporções (MOHEDANO, 2004).

A poluição de rios, lagos, aquíferos e demais corpos hídricos, na maior parte das vezes provenientes de ações antrópicas, consiste em um dos problemas ambientais atualmente existentes. Esses vêm ganhando, mundialmente, grandes proporções com o decorrer dos anos sendo o seu controle um dos grandes desafios da gestão dos recursos hídricos.

Dessa forma diversos estudos estão sendo direcionados para a busca de soluções para a questão da poluição hídrica, principalmente no que diz respeito aos parâmetros que avaliam a qualidade das águas. Análises químicas envolvendo a determinação dos parâmetros físicos – químicos, por exemplo, são importantes na identificação e determinação da concentração de poluentes, porém podem ser insuficientes para verificar o impacto dessa poluição na comunidade biótica (FUZINATTO, 2009).

De acordo com Knie e Lopes, (2004), os resultados das análises químicas geralmente não proporcionam a resposta dos efeitos das substâncias sobre os seres vivos. Essa lacuna é preenchida pelos métodos biológicos de avaliação, que, por meio de ensaios com organismos vivos, oferecem outra dimensão no controle da qualidade da água. Inserido nesse método de avaliação encontra-se a ecotoxicologia que examina, através dos efeitos de toxicidade em seres vivos, a concentração de uma substância específica, que possa ser tóxica para a biota aquática. De acordo com Matias, 1996 citado por Brentano, 2006, a ecotoxicologia é uma subárea da toxicologia ambiental, que estuda os impactos de poluentes sobre organismos vivos ou ecossistemas, considerando efeitos sinérgicos, antagônicos, aditivos e somatórios.

Ainda segundo Knie e Lopes, (2004), a ecotoxicologia consiste no uso de reativos biológicos para detectar as substâncias tóxicas existentes no ambiente, a partir dos efeitos dessas substâncias nos mesmos.

No século XIX as análises de comportamentos e reações de contaminações do ambiente sobre os organismos despontaram o emprego de seres vivos como indicadores de impactos ambientais. Sendo que as primeiras avaliações foram as de contaminações por atividades industriais por meio dos efeitos tóxicos provocados em peixes e no microcrustáceo do gênero *Daphnia*. Knie e Lopes, (2004), descreve

que em meados dos anos 50 os organismos-teste começam a ser selecionados de acordo com a sua importância na biota aquática, considerando-se também diferentes níveis tróficos. Dentre os organismos que foram utilizados nos anos 50 e 60, os que se cristalizaram ainda são encontrados na maioria dos laboratórios ecotoxicológicos do mundo. Além disso:

Os critérios decisivos da escolha das mesmas espécies foram, sobretudo, as boas experiências com seu manuseio e a sua importância na cadeia alimentar, bem como sua ampla disseminação e fácil disponibilidade (KNIE e LOPES, 2004, p.18).

Assim com o passar dos anos a ecotoxicologia vem ganhando grande importância dentre os métodos de avaliação e monitoramento dos recursos hídricos. Por se tratar de uma ciência que tem como vantagem detectar os elementos tóxicos presentes, principalmente no ambiente aquático, que são prejudiciais à biota analisada. Isso porque nestes tipos de testes os seres vivos respondem aos efeitos perturbadores provocados por substâncias tóxicas existentes nos corpos d'água avaliados.

Para Brentano, (2006), devido a essas características estes tipos de testes resultam em uma avaliação mais segura do potencial tóxico de substâncias em meios contaminados permitindo, assim, a apreciação do seu risco para o ambiente.

No decorrer dos últimos anos vem se ampliando, estudos em que são avaliadas as substâncias tóxicas presentes no meio aquático a partir das macrófitas lemnáceas.

As macrófitas lemnáceas das espécies *Lemna gibba* e *Lemna minor* vêm sendo amplamente estudadas e são objetos de normatizações de testes de toxicidade (OECD, 2003).

Na Alemanha, por exemplo, as macrófitas lemnáceas vêm sendo aplicadas em testes de toxicidade, isso por apresentar alta sensibilidade e resposta rápida às reações provocadas por elementos tóxicos presentes nos corpos d'água analisados.

Boudreau e colaboradores, (2002), por exemplo, verificou em seus experimentos de avaliação de toxicidade, em que foram utilizados cinco tipos de organismos-teste (as algas verdes da espécie *Selenastrum capricornutum* e *Chorella vulgaris*, a macrófita lemnácea *Lemna gibba* e os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Daphnia pulicaria*), que a

*Lemna gibba* foi o organismo mais sensível baseado na inibição de crescimento de 50% quando submetida ao elemento tóxico PFOS (Sulfonato de perfluoretano).

Atualmente existem diversas normatizações e dentre essas a mais utilizada em artigos científicos é a ISO/DIS 20079, que estabelece o uso da macrófita lemnácea da espécie *Lemna minor* como organismo teste na determinação de elementos tóxicos existentes tanto nas águas naturais quanto nas águas residuárias.

Assim sendo o presente trabalho vem apresentar as macrófitas lemnáceas como uma alternativa de organismo-teste em experimentos de ecotoxicologia desenvolvidos no Brasil. Sendo esses, direcionados para a análise dos efeitos provocados por elementos tóxicos existentes nos recursos hídricos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Apresentar a utilização de macrófitas lemnáceas como uma alternativa de organismo- teste em estudos toxicológicos.

#### *2.1.1. Objetivos Específicos*

- Identificar e apresentar documentos internacionais que normatizam a utilização de lemnas em testes toxicológicos;
- Resumir as etapas das metodologias apresentadas nos documentos citados;
- Avaliar as vantagens e limitações das lemnas quando comparadas a outros organismos utilizados em testes toxicológicos;

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1. Importância dos testes toxicológicos**

Os parâmetros de qualidade da água e efluentes no Brasil devem estar de acordo com os requisitos instituídos pela Resolução do CONAMA 357 de 2005. As exigências dessa Resolução consistem no estabelecimento de padrões quem vem a definir os limites máximos permitidos das variáveis de: coliformes, oxigênio dissolvido (OD), DBO, sólidos, fósforo, nitrogênio entre outros. Embora os parâmetros físico-químicos sejam avaliados por meio de procedimento laboratorial, nem sempre os resultados provenientes dessas metodologias são suficientes para determinação química dos componentes que podem ser prejudiciais aos ecossistemas. Esses efeitos são levados em consideração e citados na Resolução CONAMA 357 de 2005.

Art. 34. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis:

§ 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente (RESOLUÇÃO CONAMA nº357, 2005, p.279).

Assim sendo, para avaliar os efeitos de certas substâncias sobre a vida aquática ensaios complementares em que são utilizados seres vivos como bioindicadores são necessários (RUNBINGER, 2009).

A decisão por um programa de testes de toxicidade aquática visa corrigir as limitações encontradas nas análises químicas ambientais cujas concentrações menores que os limites de detecção dos métodos analíticos, ou difíceis de serem analisadas, podem apresentar-se como um



perigo potencial para organismos aquáticos.  
(MESSIAS, 2008, p.15).

Também, convém citar que o princípio da toxicologia ambiental é a análise dos principais mecanismos que levam a degradação do meio ambiente e da cadeia alimentar. Sendo que as problemáticas acima citadas são provenientes do destino dos agentes tóxicos, seus metabólitos e produtos sobre os organismos e populações. Dessa forma essa ciência considera a sobrevivência humana dependente do bem estar de outras espécies e, também, da existência de ar, água, solo e alimentos limpos. (FUZINATTO, 2009).

As finalidades das análises toxicológicas são de se examinar em qual dimensão as substâncias químicas (isoladas ou misturadas) manifestam seus efeitos e o quanto são nocivas para o ser vivo (KNIE e LOPES, 2004).

Nesse sentido os testes anteriormente mencionados buscam avaliar os efeitos sobre as funções biológicas do organismo que possam atingir diretamente as características das comunidades existentes no ambiente aquático tais como: reprodução, crescimento e morte.

Dentre os testes toxicológicos existentes, há dois geralmente aplicados classificados de acordo com a reação do organismo-teste quando exposto ao agente tóxico:

1. Testes agudos: Que identificam os efeitos imediatos e de caráter irreparável que o agente tóxico provoca no organismo (KNIE E LOPES, 2004), ainda:

Grande parte dos testes de toxicidade aguda baseia-se na exposição de grupos de organismos a diferentes concentrações da substância a ser testada através de diferentes diluições de uma mesma amostra. A morte é a resposta mais comum nos testes de toxicidade aguda (FUZINATTO, 2009, p.45);

Pelo fato de serem de baixo custo e fácil manuseio e fornecerem resposta rápida dos organismos, quando esses são expostos a uma determinada substância tóxica em curto período de tempo, os testes de toxicidade são amplamente utilizados (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

2. Testes crônicos (subletais): Neste teste os danos do agente tóxico são identificados após um longo período,

podendo às vezes ser percebido após várias gerações (KNIE E LOPES, 2004).

Segundo Fuzinato, (2009), os testes de toxicidade crônica também provocam efeitos mais sensíveis no organismo-teste quando exposto ao agente tóxico (xenobiótico), podendo esse durar todo e/ou parte do seu ciclo de vida.

Os efeitos adversos que ocorrem nos ecossistemas aquáticos podem ser resultado de uma exposição direta ao tóxico, o que ocasiona a morte do organismo (efeito agudo) ou podem ser decorrentes de efeitos subletais nos organismos, que podem afetar no seu desenvolvimento e reprodução (efeito crônico) (FUZINATTO, 2009, p.44).

Os testes geralmente utilizados, agudo e crônico, possibilitam determinar a toxicidade de um agente químico, a partir dos resultados encontrados, permitindo conhecer uma concentração confiável, da substância química ou efluente, que possam ser lançados no meio ambiente (FINKLER, 2002).

Em uma avaliação toxicológica é extremamente importante a coerência, qualidade, originalidade dos dados de teste, dessa forma faz-se necessário uma análise aprofundada dos resultados obtidos. De forma a atender a essa necessidade existem critérios para estimar os resultados provenientes desses tipos de ensaio.

Primeiramente os resultados devem ser representados graficamente e também através de tabelas com os respectivos desvios padrão e valores médios, utilizando grandezas estatísticas adequadas. Esse procedimento permite uma melhor visualização dos resultados e oferece um melhor entendimento do comportamento da amostra sobre o organismo-teste durante a duração do ensaio (KNIE e LOPES, 2004).

O recomendável é que sejam testadas pelo menos cinco concentrações de amostra de modo que ao menos duas apresentem mais de 50% de efeito, sendo que esses valores devem estar entre 20% e 80% do efeito. Essa medida é necessária para a determinação das relações de concentrações/efeito válidas, pelo fato de que ao testar um número suficientemente grande de concentrações da amostra, poderá se verificar uma reprodução mais real do teste por meio dos dados resultantes.

A concentração efetiva (CE) se refere ao resultado do procedimento estatístico das relações de concentração/efeito, representando a concentração de amostra na qual foi observado o efeito da substância teste (CE<sub>x</sub>; x = % de efeito). Um exemplo é a CE50 que representa a concentração em que um efeito de 50% da substância de ensaio sobre o organismo – teste pode ser matematicamente esperada (KNIE e LOPES, 2004).

As variáveis quantais, que indicam os efeitos agudos como imobilidade, são geralmente determinadas da seguinte forma:

- ✓ CE0: concentração máxima na qual não se observa efeito;
- ✓ CE50: concentração, calculada estatisticamente, que provoca efeito a 50% dos organismos;
- ✓ CE100: concentração mínima que provoca efeito a 100% dos organismos.

A CE50 é determinada estatisticamente dos valores de efeitos obtidos no ensaio, sendo que a CE0 e a CE100 não entram no cálculo, pois são valores aproximados, cuja grandeza depende exclusivamente da graduação escolhida para as concentrações da amostra e que não refletem exatamente o efeito – zero ou o efeito de 100% (KNIE e LOPES, 2004, p.74).

Olivi et. al., (2008), ainda definem alguns termos como mostra a Figura 1:

Parâmetro	Definição	Tempo de exposição
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 ou 48 h
CENO	Concentração de Efeito não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias

Figura 1: Definição de alguns termos utilizados em teste de toxicidade – Fonte: (OLIVI et. al., 2008).

Os métodos de cálculo da CE<sub>50</sub>, segundo Knie e Lopes, (2004), que podem ser seguidos são: Próbitas (FINNEY, 1971), Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) ou determinada por interpolação gráfica. Ainda:

Nos testes de toxicidade com substâncias também podem ser determinadas concentrações limite, indicando a partir de qual concentração da substância foi observado um efeito estatisticamente significativo. As concentrações limiares são descritas como LOEC (menor

concentração de efeito observado) e NOEC (maior concentração sem efeito observado) (KNIE e LOPES, 2004, p.75).

A principal ferramenta utilizada para estimar valores de LOEC e NOEC é a variação de parâmetro medido e, esse em função do grau de exatidão desejado, sendo essa quantificação proveniente de um número alto de paralelos de concentrações testadas e de um intervalo estreito entre as concentrações (KNIE e LOPES, 2004).

Dessa forma ensaios toxicológicos utilizados como ferramenta de avaliação ambiental são de grande importância por identificar alguns fatores que não são avaliados pelas variáveis abióticas, tais quais: biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes (MAGALHÃES; FERRAO FILHO, 2008). Vale ressaltar que:

Muitas vezes os sistemas biológicos já reagem a concentrações de substâncias bem abaixo dos limites de detecção por métodos de análises químicas. Além disto, em função da resposta integrada da matéria viva a todos os fatores perturbadores, a reação dos organismos inclui também os efeitos produzidos por substâncias novas na água, formadas através de interações, as quais, via de regra, se subtraem da análise química. Assim, os bioensaios permitem, geralmente, uma avaliação bastante segura do potencial tóxico de substâncias ou de meios contaminados, permitindo também deduções indiretas do seu risco para o meio ambiente e, com muita cautela, para o homem (KNIE e LOPES, 2004, p.16).

Zagatto et. al., (1998), por exemplo, sustenta que do ponto de vista analítico e econômico torna-se inviável a caracterização completa de um efluente líquido devido ao alto grau de complexidade das substâncias presentes em sua composição.

As análises químicas devem ser executadas em laboratório, isso exige um elevado custo e não é capaz de garantir a identificação de todos os componentes tóxicos existentes na substância de ensaio. Já as avaliações toxicológicas, quando empregadas na análise de efluentes, objetivam indicar o efeito tóxico provocado por todas as substâncias contidas nos efluentes e corpos d'água de maneira somatória (DANNENBERG, 1993; SÄAR, 2005 *apud* RUBINGER, 2009).

Ainda para Runbinger, (2009), os métodos analíticos físico-químicos isolados não são suficientes para quantificar os efeitos provocados pelos compostos sintéticos sobre a biota, dessa forma faz-se necessário a utilização de avaliações da qualidade da água por meio de testes de toxicidade.

No entanto, o monitoramento de caráter ecotoxicológico aliado ao monitoramento usual executado através de parâmetros físicos e químicos permite avaliar de forma mais ampla os corpos d'água complexos, já que os resultados dos testes ecotoxicológicos correspondem à resposta da biota ao conjunto de substâncias que compõe o corpo d'água analisado (BRENTANO e LOBO, 2003).

A toxicologia é uma metodologia bastante eficiente segundo Magalhães e Ferreira Filho, (2008), pelo fato de possibilitar que os organismos detectem concentrações subletais dos agentes tóxicos, assim funcionando como 'biosensores', da qualidade da água.

Para Brentano, (2006), os estudos toxicológicos são importantes não somente no que diz respeito à avaliação de efluentes complexos, mas também na busca de medidas mitigadoras que possibilitem minimizar o impacto ambiental por efluentes tóxicos e garantir a manutenção da vida aquática.

### **3.2. Critérios para seleção de organismos-teste**

Embora os testes toxicológicos sejam utilizados como principal ferramenta de avaliação de toxicidade dos corpos d'água, nesses testes observa-se que nem todos os efeitos analisados nos organismos vivos poderão ser utilizados como objeto prático. Os organismos utilizados no ensaio devem ter um significado ecologicamente bem definido.

Assim sendo, para a aplicação da ecotoxicologia é necessária a seleção de um organismo-teste. Existem critérios definidos para efetuar a seleção tais quais: disponibilidade e abundância do organismo no ambiente, fácil cultivo em laboratório, conhecimento da biologia da espécie. E, além disso, de preferência, que as espécies sejam sensíveis e nativas do local de desenvolvimento do teste (BOHRER, 1995).

A sensibilidade, por exemplo, é o principal fator levado em consideração na seleção do organismo-teste. É preciso que a espécie seja sensível a uma diversidade de agentes químicos, sendo que essa sensibilidade deve ser relativamente constante de forma que possibilite resultados precisos para garantir consistência nos resultados obtidos e proporcionar exatidão na reprodução dos mesmos. Assim sendo, é necessário o prévio conhecimento de características biológicas da espécie, tanto para o cultivo quanto para a reprodução do teste, sendo

essas: comportamento, reprodução, hábitos alimentares, fisiologia. A utilização de espécies de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo se mostra ideal aos estudos ecotoxicológicos em laboratório (DOMINGUES e BERTOLETTI, 2006). Ainda:

Bioensaios com indicadores de ciclo de vida curtos são de interesse em todas as perspectivas ecológicas, particularmente quando testam amostras instáveis como efluentes. Existem diversos seres que podem ser utilizados como bioindicadores, sendo que a fácil manipulação e a rapidez na realização de um ensaio são pontos chave para sua aplicação principalmente no âmbito de mercado (RUBINGER, 2009, p.24).

Segundo Knie e Lopes, (2004), a partir de estudos realizados na maior parte dos laboratórios ecotoxicológicos do mundo, os critérios decisivos para a escolha das espécies utilizadas como organismos-teste foram, principalmente, boas práticas com o seu manuseio, o seu grau de importância na cadeia alimentar, bem como sua ampla disseminação e fácil disponibilidade.

O organismo-teste deve ter alto grau de reação às substâncias tóxicas, de forma que o teste possa representar a realidade da melhor forma possível e de baixo custo. E, também de modo que os resultados do ensaio possam ser mais facilmente quantificados por meio de interpolação gráfica e análise estatística, e, também, possam ser úteis para o estudo dos riscos e prevendo, com maior exatidão, os efeitos ambientais da substância tóxica analisada (RAND e PETROCELI, 1985).

Ainda para os mesmos autores, os parâmetros comumente levados em consideração na escolha do organismo-teste são: cosmopolitismo da espécie; noção de seus hábitos alimentares, fisiologia e biologia; uniformidade de suas populações e sua estabilidade genética, índice de sazonalidade baixo; constante e apurada sensibilidade; importância comercial; fácil cultivo em laboratório e, se possível, para a melhor representatividade dos ecossistemas, a espécie deve ser nativa.

Na ecotoxicologia, os estudos do efeito agudo de produtos potencialmente tóxicos ao meio ambiente são utilizados organismos-teste como os peixes, microcrustáceos e algas, por serem

sensíveis e representarem diferentes níveis tróficos (MATIAS, 2003 *apud* FLOHR, 2007).

A escolha do organismo-teste na toxicologia não depende somente de as suas características serem semelhantes às características do homem, o fator mais relevante na escolha é a melhor sensibilidade aos efeitos toxicológicos do agente tóxico pesquisado.

Os critérios também levados em consideração para Knie e Lopes, (2004), são:

✓ Disponibilidade: O organismo-teste deve estar sempre disponível. Neste caso deve haver a possibilidade de cultivar este organismo ou mantê-lo em laboratório sob condições controladas;

✓ Sensibilidade: Os sistemas biológicos utilizados devem ter sensibilidade equilibrada, dependendo da finalidade de utilização, a outras substâncias de forma que reaja somente aos efeitos tóxicos, pois os organismos hiper-sensíveis podem transmitir resultados não relevantes à toxicidade, tais quais temperatura entre outros;

✓ Reprodutibilidade: O organismo-teste deve ser submetido a avaliação em que as condições sejam padronizadas, de forma que a reação do sistema biológico à substância tóxica possa ser reproduzível sob as mesmas condições. Esse procedimento garante a consolidação estática do teste.

Rand, (1985), além de ratificar o critério de o organismo ser de fácil manipulação laboratorial também afirma que é fundamental a sua representatividade em relação a um determinado grupo de importância ecológica. Além disso, o organismo deve gerar populações uniformes e ser pertencente a uma família que faça parte da cadeia alimentar do ser humano.

### **3.3. Principais organismos-teste utilizados**

A normatização da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) NBR 12.713, oficializa o uso da espécie de microcrustáceo *Daphnia similis* como organismo teste em ensaio de toxicidade. Já a normatização NBR 12.648 estabelece o uso da espécie de alga *Chlorella vulgaris* como organismo-teste. E as normatizações NBR 12.714, NBR 12.715 e NBR 12.716, normatizam a utilização de várias espécies de peixes em avaliações toxicológicas (OLIVI et. al., 2008).

Ainda, de acordo com Olivi e colaboradores, (2008), a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) define as seguintes normatizações:



- a) L5.018 – Essa estabelece o uso do microcrustáceo *daphnia similis* como organismo-teste nas avaliações de toxicidade;
- b) L5.019 – Estabelece o uso de diversas espécies de peixes como organismo-teste;
- c) L5.020 – Estabelece o uso da alga *Chlorela vulgaris* como organismo-teste;
- d) L5.022 – Estabeleça o uso do microcrustáceo *ceriodaphnia dubia* como organismo-teste;
- e) L5.227 – Estabelece o uso da bactéria *Photobacterium phosphoreum* como organismo-teste;
- f) L5.228 - Estabelece o uso da bactéria *Spirillum volutans* como organismo-teste;
- g) L5.250 - Estabelece o uso do invertebrado (mais conhecido como ouriço do mar) *Lytechinus variegatus* como organismo-teste e
- h) L5.251 - Estabelece o uso do missidáceo *Mysidopsis juniae* como organismo-teste.

A Tabela 3.3-1 apresenta os principais testes toxicológicos normatizados no Brasil juntamente com seus respectivos organismos-teste:

Tabela 3.3-1: Métodos de Testes de Toxicidade Normatizados por Entidades no Brasil

<b>Entidade Normatizadora</b>	<b>Tipo de Teste</b>
<b>ABNT</b>	NBR 15088.Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com Peixes
	NBR 12713.Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com <i>Daphnia</i> spp. ( <i>Crustácea, Cladocera</i> )
	NBR 13373.Toxicidade Crônica - Método de Ensaio com <i>Ceriodaphnia</i> spp. ( <i>Crustácea, Cladocera</i> )
	NBR 12648.Toxicidade Crônica - Método de Ensaio com algas ( <i>Chlorophyceae</i> )
	NBR 15308.Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com misidáceos ( <i>Crustácea</i> )
	NBR 15350.Toxicidade Crônica de Curta Duração - Método de Ensaio com ouriço - do - mar ( <i>Echinodermata: Echinoidea</i> )

<b>Entidade Normatizadora</b>	<b>Tipo de Teste</b>
	NBR 12716. Ensaio de Toxicidade Aguda c/ Peixes - Parte III - Sistema Fluxo Contínuo
	L5.018 Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 ( <i>Cladocera, Crustácea</i> )
	L5.019 Teste de Toxicidade Aguda c/ Peixes - Parte I - Sistema Estático
	L5.019 Teste de Toxicidade Aguda c/ Peixes - Parte II - Sistema Semi - Estático
	L5.019 Teste de Toxicidade Aguda c/ Peixes - Parte III - Sistema Fluxo Contínuo
	L5.020 Teste de Toxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i>
	L5.022 Avaliação de Toxicidade Crônica, utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1984 ( <i>Cladocera, Crustácea</i> )
<b>CETESB</b>	L5.025 Água: Teste para Avaliação de Toxicidade Aguda de Cianofíceas (Algas Azuis)
	L5.227 Teste de Toxicidade com Bactéria Luminescente <i>Vibrio fischeri</i> : Método de Ensaio
	L5.228 Teste de Toxicidade Aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i> : Método de Ensaio
	L5.250 Água do Mar: Teste de Toxicidade Crônica de Curta Duração com <i>Lytechnus variegatus</i> LAMARK, 1816 ( <i>echinodermata: echinoidea</i> )
	L5.251 Água do Mar: Teste de Toxicidade Aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> Silva, 1979 ( <i>crustácea: mysidacea</i> )

Fonte: Modificado de Rubinger, C. F., 2009.

Para Knie e Lopes, (2004), os organismos-testes que atendem aos critérios de ensaios toxicológicos e são geralmente utilizados pertencem às espécies de bactérias *Pseudomonas putida* e *Vibrio fischeri*, as algas *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia* e peixes como *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Leuciscus idus* ou *Poecilia reticulata*.

As avaliações toxicológicas existentes atualmente que apresentam os melhores resultados são mostradas resumidamente na Tabela 3.3-2: com as respectivas denominações e organismos-teste.

Tabela 3.3-2: Principais tipos de bioensaios para avaliação de ecossistemas aquáticos e de efluentes como um todo.

<b>Nível Trófico</b>	<b>Tipo de Teste</b>	<b>Critério de Teste</b>	<b>Duração</b>	<b>Organismo-teste</b>
<b>Consumidores</b>	Agudo	Mortalidade	24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>
	Agudo	Mortalidade	24/48h	<i>Brachionus plicatilis</i>
	Agudo	Mortalidade	24h	<i>Artemia salina</i>
	Agudo	Mortalidade	24h	<i>Daphnia pulex</i>
	Agudo	Mortalidade	24h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
	Agudo	Mortalidade	24h	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
	Agudo	Imobilidade/ Mortalidade	24/48h	<i>Daphnia magna</i>
	Agudo	Inibição Parcial	15-60min	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
	Agudo	Motilidade		
<b>Decompositores</b>	Agudo	Inibição da Luminescência	15-30min	<i>Vibrio fischeri</i>
<b>Produtores</b>	Crônico Curto	Inibição de Crescimento	72h	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>
	Crônico Curto	Inibição de Crescimento	72h	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
<b>Consumidores</b>	Crônico Curto	Reprodutibilidade	48h	<i>Brachionus calyciflorus</i>

Nível Trófico	Tipo de Teste	Critério de Teste	Duração	Organismo-teste
	Crônico Curto	Mort/In. de Crescimento	6dias	<i>Heterocypris incongruens</i>
<b>Decompositores</b>	Crônico Curto	Inibição de Crescimento	24h	<i>Tetrahymena thermophila</i>

Fonte: Modificado de Rubinger, C. F., 2009.

Além dos organismos-teste, que foram anteriormente citados, utilizados em ensaios toxicológicos existe uma metodologia proposta por Dutka, (1989) citada por Messias (2009), em que são utilizadas sementes de alface como organismo de ensaio. Nesse tipo de teste a estimativa de toxicidade é efetuada por meio da avaliação da inibição de crescimento comparando as raízes submetidas ao elemento tóxico com as raízes inseridas na substância controle, determinada pelo  $Cl_{50}$ .

### 3.4. As Lemnas

O termo “*Lemna*” designa um gênero de planas aquáticas da subfamília *Lemnoideae* (Antiga família *Lemnaceae*). Com origem no latim, o termo *limnus* significa lago, com relação ao habitat natural destas (SKILLCORN et. al., 1993). Embora a *lemna* tenha cientificamente esse conceito, há um esforço por partes de alguns pesquisadores brasileiros em estender este termo para uma nomenclatura popular, designando “*lemna*” como um nome popular, mais usual, inclusive para outros gêneros deste grupo botânico. Assim, nesse estudo será empregado diversas vezes o termo “*lemna*”, desconsiderando as regras de nomenclatura científica, sob a qual o nome de um gênero deve estar sublinhado, ou em itálico, seguido de “sp”.

Com o aprimoramento e popularização das técnicas de biologia molecular o grupo botânico de macrófitas aquáticas, anteriormente conhecidas como família *Lemnaceae*, tem sofrido grandes mudanças em sua classificação taxonômica. Pois a similaridade do DNA, utilizada como parâmetro filogenético, tem influenciado a classificação de diversos grupos biológicos. Deste modo, muitos especialistas têm desconsiderado a família *Lemnaceae* como táxon passando este grupo a ser uma sub-família (*Lemnoideae*) dentro de *Araceae*.

De acordo com APGII - *Angiosperm Phylogeny Group* (2003), considera-se a antiga família *Lemnaceae* como a subfamília *Lemnoideae*. Contudo, no presente estudo foram utilizados os termos “*lemnáceas*”, ou apenas “*lemnas*”, como vocábulos escritos na língua

portuguesa para designar este grupo botânico. Pois, na literatura estrangeira encontra-se o termo *duckweed* como uma forma genérica e popular de designar estas macrófitas, o qual não ocorre no idioma português.

A subfamília Lemnoideae é representada pelas menores Angiospermas<sup>1</sup> conhecidas em todo o mundo, sendo frequentemente confundidas com algas (SKILLICORN et. al., 1993). Porém são macrófitas (vegetais superiores), de hábito aquático, possuidoras de sistema vascular, produzindo flores e frutos. Todavia, a reprodução assexuada é a forma mais freqüente de propagação (CROSS, 2010). Possui um componente simplificado chamado de fronde que se trata da fusão de folha e caule, em uma única estrutura. Esta família está representada em todo o globo, sob os diversos climas, com exceção em regiões desérticas ou permanentemente congeladas. Apesar de tolerarem temperaturas muito baixas (inclusive sobrevivendo ao congelamento), estas se desenvolvem melhor em regiões quentes (LANDOLT E KANDLER, 1987.).

Dentro da cadeia trófica as lemnas são produtores primários, servindo de alimento para pequenos animais, peixes e aves aquáticas. A seguir encontra-se descrita a sua atual classificação taxonômica:

Reino: *Plantae*

Divisão: *Angiospermae*

Classe: *Monocotyledoneae*

Ordem: *Arales*

Família: *Araceae (Lemnaceae)*

Sub-família: *Lemnoideae*

Atualmente existem 5 gêneros: *Lemna*, *Wolffia*, *Landoltia*, *Spirodela* e *Wolffiella* (POTT et. al., 2002) e aproximadamente 40 espécies (SKILLICORN et. al., 1993).

Essas macrófitas são plantas de rápido crescimento, e por esse motivo, se distribuem desde o Trópico até a Zona Ártica, além de se desenvolverem em água doce ou com pouca salinidade. São geralmente encontradas nos corpos d'água com salinidade até 4 g/L, desprovidos de correnteza e interferências de ventos fortes. Esses locais são, na maioria

---

<sup>1</sup> Angiospermae: Divisão do Reino Plantae que agrupa plantas superiores possuidoras de sistema vascular e que produzem flores e frutos.

das vezes lagoas ricas em nutrientes em que as lemnas flutuam e se proliferam formando densas populações (LANDOLT e KANDELER, 1987 apud, MOHEDANO, 2004). (Figura 2). As características anteriormente citadas proporcionam o seu uso em diversos tipos de experimentos relacionados à fisiologia vegetal, morfogenética e toxicologia (POTT, 2000). Contudo seu uso é variado podendo ser utilizada em tratamento de efluentes e também como alimento para alguns animais (ISLAM, 2002).



Figura 2: Distribuição de uma população de macrófitas lemnáceas.

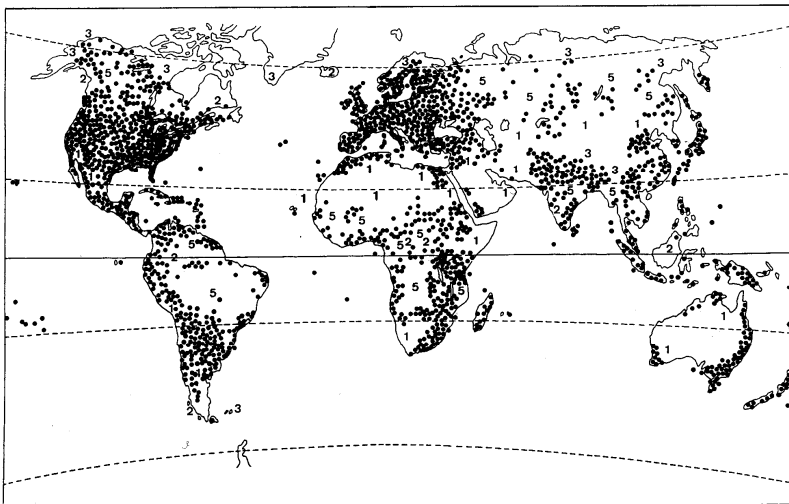


Figura 3: Áreas em que existe a ocorrência das lemnas – Fonte: Cross, (2010).

Esses vegetais se propagam vegetativamente através da formação de várias frondes filhas a partir do amadurecimento de uma fronde mãe. Sendo que cada fronde filha nasce como um botão na zona meristemática (ao longo do eixo central) da fronde mãe. Cada uma das frondes se liga a fronde mãe por meio de uma tira de tecido denominada estipe. No momento em que a fronde filha amadurece a estipe rompe e essa é liberada e imediatamente dará origem a novas frondes filhas a partir do mesmo processo. A Figura 3 a seguir mostra a localização de cada elemento acima citado:

Legenda:	
Ap:	ápice;
B:	base da macrófita;
F <sub>0</sub> :	fronde mãe;
F <sub>1</sub> :	frondes filhas da primeira geração;
F <sub>2</sub> :	frondes filhas da segunda geração;
Fl:	flor;
Ne:	nervo;
No:	nó;
Ov:	ovário;
Pa:	Pápula;
Po:	bolsa;
R:	raiz;
RC:	coifa e
STA:	estame.

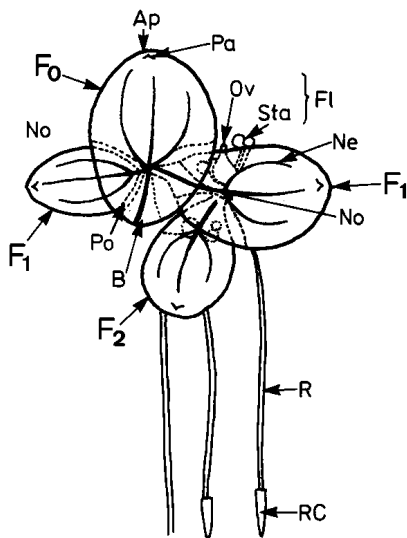


Figura 4: Representação do Sistema Reprodutor e Alguns Aspectos Morfológicos das Macrófitas Lemnáceas – Fonte: Cross (2010).

As lemnas são de fundamental importância na cadeia trófica dos ambientes em que se reproduzem por fixar o carbono atmosférico dissolvido e produzir biomassa de excelente qualidade nutricional. Deste modo, muitos peixes, aves, anfíbios, crustáceos, insetos e moluscos se beneficiam ao dispor deste alimento. Maia e colaboradores, (2008), afirma que “As lagoas de lemnas atuam na remoção de algas e geram biomassa rica em proteína, que podem ser utilizadas como ração animal.”

Conforme descrito anteriormente são plantas de rápido crescimento. No entanto esse crescimento ocorre somente quando a planta está submetida a condições ideais de: pH, temperatura, luminosidade e nutrientes. De acordo com Culley e Myers et. al., (1978) *apud* França, et. al., (2002), as lemnáceas são vegetais de rápido crescimento, geralmente se proliferando em taxas exponenciais e podendo dobrar a biomassa em 48h quando se encontram em condições ideais de luz, temperatura e nutrientes. O crescimento das lemnas pode ser reduzido pela influência de fatores como: alta densidade de plantas, falta de nutrientes, valores extremos de pH e competição com outras plantas pela falta de nutrientes.



### 3.5. Características que favorecem o uso das Lemnas como organismo-teste

De acordo com as características apresentadas no item 3.2, que qualificam um organismo-teste, as macrófitas lemnáceas preenchem diversos requisitos exigidos, tais como:

- ✓ Possuem a maior taxa de crescimento entre os vegetais superiores;
- ✓ Possuem alta sensibilidade, por apresentarem respostas rápidas de toxicidade aos testes, e, ainda
- ✓ Possuem facilidade de manejo e reprodução em laboratório.

Tendo em vista essas características atualmente na Alemanha, efluentes (domésticos e industriais) devem ser submetidos a testes de toxicidade. Os organismos geralmente utilizados nestes testes são microalgas de água doce. Entretanto, esses organismos nem sempre demonstram alto grau de sensibilidade como as plantas superiores apresentando, assim, maior desvantagem em ensaios de toxicidade ambiental (SALLENAVE e FORNIN, 2006).

A lemna é a principal planta utilizada em diversos experimentos de morfogenética, toxicologia e ensaios relacionados à fisiologia por possuir características de se propagar rapidamente em pouco espaço físico (POTT, 2000).

Newman, (1998) citado por Boudreau et. al., (2002), afirmam em seus estudos que a *Lemna gibba* é a mais sensíveis no que se diz respeito aos efeitos adversos de toxicidade. Isso por este organismo representar o menor nível trófico em ecossistemas aquáticos, desempenhar funções importantes na biota aquática de água doce, como a ciclagem de nutrientes e transferência de energia para os maiores níveis da cadeia trófica.

No teste de avaliação de toxicidade do PFOS (Perfluorooctanos Sulfatos), por exemplo, a *Lemna gibba* apresentou maior sensibilidade com relação à inibição de crescimento de 50% (IC<sub>50</sub>) quando comparada com as algas *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris*, e, com os microcrustáceos marinhos *Daphnia magna* e *pulicaria*. A macrófita apresentou um valor de IC<sub>50</sub> quando submetida a uma solução de 31,1 mg/L de PFOS. Esse valor foi determinado a partir do peso úmido. O resultado é 4,3 vezes menor do que para o microcrustáceo *Daphnia pulicaria*, por exemplo, que apresentou essa inibição quando submetida a uma concentração de 134 mg/L de PFOS (Boudreau et. al., 2002).

Apesar das vantagens comprovadas, ainda não existe uma normatização Brasileira para o uso destes organismos em testes de toxicidade.

### **3.6. Normatizações existentes**

Após terem sido consolidados, os ensaios utilizando organismos vivos, foram normatizados em seus respectivos países de origem. Depois, foram também padronizados internacionalmente pela OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) e pela ISSO (International Organization for Standardization), por exemplo (KNIE e LOPES, 2004).

Os testes com lemnas são os principais ensaios normatizados no qual são utilizadas plantas superiores. Esse, atualmente, é preferencialmente aplicado para testes com produtos químicos (Revisão do documento 221 da OECD) e águas residuárias (ISSO/DIS 20079) na análise dos possíveis efeitos adversos desses elementos sobre as plantas. Em geral o ensaio em que é utilizada a normatização ISSO/DIS 20079 é realizado, basicamente, por ensaios comparativos entre padrões diferentes de soluções (contaminadas e não-contaminadas) nos quais são analisados seus efeitos finais sobre o crescimento vegetativo das lemnas. De forma a reforçar o desempenho do teste, também são utilizados sistemas de processamento automático de imagens.

São utilizadas, para a realização do ensaio utilizando a normatização ISSO/DIS 20079, as seguintes padronizações:

- ✓ ISSO 5667 – 16: Qualidade da água (amostragem);
- ✓ ISSO 10260: Qualidade da água (medição de parâmetros bioquímicos); e,
- ✓ ISSO 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

### **3.7. Exemplos de testes toxicológicos utilizando lemnas**

#### *3.7.1. Avaliação de Toxicidade dos Sulfatos de Perfluorooctanos (PFOS) (BOUDREAU et. al., 2002)*

Os sulfatos de perfluorooctanos são compostos gerados por produção antrópica e amplamente utilizados em estabelecimentos comerciais e indústrias. Esses componentes são aplicados em: inseticidas, revestimentos invólucros de alimentos, anti-corrosivos, e, principalmente, em espumas aquosas de combate a incêndio. Além disso são encontrados em várias partes do meio ambiente mesmo em locais distantes das áreas de sua produção. O último fator unido a sua alta

resistência gera preocupações referentes aos seus possíveis efeitos em ambientes aquáticos.

Assim sendo o objetivo dessa avaliação foi determinar a toxicidade do elemento PFOS em organismos de água doce. Dessa forma metodologias de ensaios normatizadas foram utilizadas com os seguintes organismos teste: algas verdes *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris*, macrófita aquática *Lemna gibba* e os invertebrados *Daphnia magna* e *Daphnia pulicaria*. Sendo que as metodologias seguiram os seguintes protocolos: teste de inibição aguda de crescimento das algas a norma ASTM, o teste de toxicidade aguda na *Lemna gibba* os métodos de Greenberg et. al., (1992) e Marwood et. al., (2001) e o teste de toxicidade aguda da *Daphnia* seguiu orientações da norma ASTM (Cargo: E 729-96; ASTM, 1999b). Os valores da concentração sem efeito observável (NOEC) foram gerados a partir dos parâmetros mais sensíveis para todos os organismos.

Após a realização das metodologias foi feito um comparativo entre todos os resultados e reações provocadas entre todos os organismos-teste. Os valores da inibição de crescimento para os autótrofos (NOEC) foram: 5,3, 8,2 e 6,6 mg / L para *S. capricornutum*, *C. vulgaris* e *L. gibba*, respectivamente. Baseado nos resultados de valores de imobilidade o organismo mais sensível foi a *D. magna*. O organismo mais sensível baseado na inibição do crescimento de 50% (IC<sub>50</sub>) foi *Lemna gibba*, com um valor de IC<sub>50</sub> de 31,1 mg/L, determinado a partir do peso úmido. Isso é 4,3 vezes menor do que o LC<sub>50</sub> para *Daphnia pulicaria* que foi de 134 mg/L. Os efeitos adversos significativos foram observadas para todos os organismos em concentrações de 134 mg/L comprovando a maior sensibilidade do organismo *L. gibba*.

Os resultados indicaram que sob condições de laboratório o PFOS é altamente tóxico para organismos de água doce, em concentrações próximas de 100 mg/L. Baseado nas concentrações ambientais conhecidas de PFOS, que ocorrem de ng/L para g/L, não há risco aparente para sistemas de água doce.

3.7.2. *Atribuição de Lemna gibba L. (lentilha) para bioensaios na avaliação da ecotoxicidade in situ* (MKANDAWIRE e DUDEL, 2004)

De forma a reduzir as diferenças encontradas entre os resultados de testes a partir de radionucleotídeos e metais pesados, foram selecionados alguns ensaios de toxicidade utilizando a *lemna* da espécie

*Lemna gibba*, como organismo-teste. Esses testes foram efetuados através de procedimentos padronizados com embasamento em literatura.

Os ensaios foram realizados diretamente nas minas de urânio abandonadas e em laboratório. O cultivo das lemnas, feito em laboratório, foi a partir de carga e meios semi - contínuos. Os resultados encontrados indicaram que os ensaios padronizados dessas plantas precisam ser adaptados para prever as condições reais de campo. Esses mesmos resultados demonstraram que o desempenho das culturas de lemnas em campo foi melhor que as de laboratório, apesar de as culturas de laboratório serem submetidas a concentrações muito maiores de nutrientes que as de campo.

A concentração de fósforo na mina, por exemplo, foi de  $0,13 \pm 0,09$  mg/L, enquanto a literatura mostra que o fósforo no meio de cultura laboratorial foi de 13,6-40 mg/L. O crescimento laboratorial do grupo de lemnas sofreu influência através das alterações provocadas por: consumo de nutrientes, troca de fases de  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$  e as excreções de substâncias orgânicas pelos organismos-teste. O desempenho dos meios de cultura semi-contínuos foram relativamente melhores que os cultivos em carga, mesmo após a solução nutritiva ter sido diluída 10 vezes. O desempenho do crescimento da *Lemna gibba* foi influenciado por ânions equilibrados com cátions essenciais, apesar de as concentrações de cátion ter sido iguais nos meios de cultura. No teste o melhor crescimento observado foi nos meios de cultura com mais sulfatos do que cloretos. Esse estudo citado foi realizado com embasamento em vários tipos de testes de toxicidade existentes na literatura não seguindo um padrão.

### 3.7.3. Avaliação da Toxicidade de Nanopartículas de Óxido de Cobre a Partir de Imagem da Fluorescência da Clorofila da *Lemna gibba* (PERREAULT et al., 2010)

Esse procedimento se trata de uma avaliação da toxicidade das nanopartículas de óxido de cobre (Nps CuO) que são liberadas por tintas anti-incrustantes de barcos. Sendo que a metodologia utilizada para análise do nível de toxicidade desse elemento se deu a partir dos efeitos dos Nps CuO sobre a atividade fotossintética através da fluorescência da clorofila da *Lemna gibba*, por meio de análise de imagens. O método consistiu na exposição da lemna a concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 g/L de Nps CuO por um período de 48 horas em um ambiente de teste com temperatura e iluminação controladas. Ao final do ensaio determinaram-se os teores de cobre dissolvido que foram:  $3.29 \pm 0.13$ ,  $6.60 \pm 0.33$ , e  $13.16 \pm 0.63$ mg/L, para as concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 g/L de Nps

CuO respectivamente. Esses resultados foram obtidos simultaneamente em todas as amostras no período de 0, 24 e 48 horas de ensaio utilizando o sistema de fluorimetria MAXI-Imaging PAM.

O resultado demonstrou que a substância tóxica provocou uma forte inibição no processo fotossintético da planta provocando a redução de seu crescimento. A partir da imagem de fluorescência foram avaliados os diversos níveis de fotossíntese, pois, por meio desse procedimento foi possível identificar a redução da superfície fotossinteticamente ativa das folhas expostas a todas as concentrações de Nps CuO. Essa metodologia mostrou que o Nps CuO inibe o transporte de elétrons associados aos rendimentos quânticos e operacionais em etapas do processo de fotossíntese. Foi constatado que a supressão nanofotoquímica da fluorescência como indicador de dissipação de energia que não é utilizada na fotossíntese foi identificada pelo aumento dos efeitos do Nps CuO. As condições de ensaio nas microplacas utilizadas nessa metodologia permitem quantificar elevados números de repetições para diversas plantas. Assim sendo essa metodologia proporciona confiança na avaliação da toxicidade do Nps CuO em ecossistemas aquáticos.

#### **4. METODOLOGIA**

Como forma de adquirir o embasamento teórico para este estudo primeiramente foi realizado um levantamento de normatizações internacionais existentes, que regulamentam a utilização de macrófitas lemnáceas em testes de ecotoxicidade. Posteriormente essas normatizações foram traduzidas e estudadas de forma a serem elucidadas no trabalho. Além disso foram identificados os seus principais pontos com o intuito de proporcionar um melhor entendimento das características dessas macrófitas que as tornam úteis como organismo-teste. Esse procedimento foi cumprido para justificar o uso das lemnas nesses tipos de avaliações. Dentre os documentos revisados, os mais relevantes e utilizados na elaboração do presente estudo foram as normatizações ISO/DIS 20079 e a normatização da OECD, que padronizam testes toxicológicos com macrófitas lemnáceas.

#### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Até os últimos anos as plantas superiores não vinham sendo comumente utilizadas na avaliação dos riscos ecotoxicológicos porque ainda não havia um sistema de testes padronizados disponível. Assim

sendo a Organização Internacional de Normatização (ISO) e a Organização para a Cooperação Econômica e de Desenvolvimento (OECD) desenvolveram normas para a realização do teste toxicológico baseado na inibição de crescimento das lemnáceas com duração de sete dias (ISO/DIS 20079 e normatização da OECD). Como forma de atender aos objetivos exigidos nesse trabalho serão descritas a seguir as metodologias regulamentadas por essas duas normatizações.

## **5.1. Exposição das duas normatizações revisadas**

### *5.1.1. ISO DIS 20079*

#### Introdução da Normatização

##### *Características e Morfologia das Lemnas*

Pelo fato de as macrófitas lemnáceas atenderem aos principais requisitos envolvidos na seleção do organismo-teste tais como: elevada taxa de crescimento, facilidade de cultivo em laboratório, alta sensibilidade (conforme descrito no item 3.2) esse organismo foi convenientemente utilizado nessa normatização.

Essas macrófitas podem ser danificadas por constituintes dos efluentes e da água. A subsequente inibição de crescimento, devido a esse fim, é calculada pela observação dos parâmetros (número de frondes, área das frondes, clorofila e peso seco) definidos por uma série de métodos de cálculo.

Valores de EC (Concentração Efetiva) são determinados de forma a permitir uma avaliação dos efeitos tóxicos de constituintes da água. A avaliação de pelo menos dois dos parâmetros de observação se baseia nas médias de taxa de crescimento específicas.

O teste é designado para medir as reações sobre as macrófitas a partir dos efeitos provocados por substâncias dissolvidas existentes na água. Isso inclui a definição de uma etapa de diluição fixa, ou uma concentração de amostra na qual o parâmetro de observação (*endpoint*) é inibido em relação a um percentual de um parâmetro controle definido.

“*End point*” é o estágio final após uma reação química ou biológica estar completa. Neste caso é o primeiro efeito adverso observado, ou seja, o mais sensível (RUBINGER, 2009).

#### 5.1.1.1. Competência

Essa norma especifica um método no qual as reações provocadas por substâncias e misturas contidas na água sobre as macrófitas

lemnáceas são identificadas através do parâmetro de inibição de crescimento. Sendo que também estão inseridas nessa análise águas residuárias de tratamentos municipais e efluentes industriais.

#### 5.1.1.2. Princípios

As plantas da espécie *Lemna minor* foram normatizadas para crescer em monoculturas com diferentes concentrações de substâncias de ensaio por um período de sete dias. O objetivo do teste é de quantificar os efeitos relacionados da substância de ensaio sobre o crescimento vegetativo das macrófitas durante este período. Essa avaliação é feita com base na quantificação do número de frondes e da biomassa (área total das frondes, peso seco e clorofila).

Para determinar os efeitos provocados pela substância, a taxa de crescimento contida nas soluções de ensaio é comparada com as soluções controle. A inibição específica provocada pela concentração estudada de x% é definida e expressa como ErCx.

#### 5.1.1.3. Referências Normativas

Os documentos a seguir referenciados são indispensáveis para aplicar essa norma. Sendo que para referências datadas aplicam-se somente as edições citadas. Para referências não datadas aplica-se a última edição do referido documento (incluindo algumas emendas).

ISO 5667-16: Qualidade da Água-Amostragem-Parte 16-Orientação para amostras de bioteste;

ISO 10260: Qualidade da Água-A medição dos parâmetros bioquímicos-Determinação Espectrométrica para a determinação da concentração de Clorofila;

ISO/IEC 17025-Requisitos Gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

#### 5.1.1.4. Interferências

As seguintes substâncias podem vir a alterar os resultados do teste:

- não solúveis,
- pouco solúveis ou voláteis e
- substâncias que reagem com a água de diluição ou meio nutritivo ou alteram seu estado durante o ensaio, podem alterar os resultados. (de acordo com a ISO 5667-16).

Dessa forma é necessário atenção, em especial, no acúmulo de substâncias na superfície, pois essas podem aumentar os efeitos sobre as lemnas.

#### 5.1.1.5. Aparelhos Utilizados

A Normatização determina o uso de equipamentos e materiais específicos para a realização deste teste.

- ✓ Vasos Cilíndricos (Copos de Vidro, Placas de Petri, Pratos de Cristal);
- ✓ Tampas de Vidro;
- ✓ Instalações com Temperatura Constante e Iluminação;
- ✓ Espectrofotometro para acompanhar a clorofila (650 nm e 750 nm);
- ✓ Medidor (Lumino): Utilizado para medir a intensidade de luz;
- ✓ pHmetro;
- ✓ Vidraria (balões volumétricos; cilindros graduados, pipetas e placas de Petri);
- ✓ Sistema de Análise de Imagem (Para medição da área e do número de frondes);
- ✓ Autoclave;
- ✓ Dispositivo de filtração;
- ✓ Pinça.

#### 5.1.1.6. Reagentes Utilizados no Teste

- ✓ Água de Diluição: É utilizada água destilada (ou deionizada) ou água de pureza equivalente, condutividade de  $10\mu\text{S}/\text{cm}$ ;
- ✓ Ácido Clorídrico: Concentração (HCl) = 0,1 por exemplo;
- ✓ Solução de Hidróxido de Sódio: Concentração (NaOH) = 0,1 mol/L, por exemplo;
- ✓ Solução Aquosa de Glicose: 1% (V/V);
- ✓ Agar;
- ✓ Meio Nutritivo: Para a avaliação de águas residuárias utiliza-se o meio nutritivo de Steinberg modificado apresentado na Tabela 3, sendo esse meio nutritivo preparado a partir de substâncias simples. A concentração necessária da pré-cultura e meio de ensaio são obtidas da concentração média preparada diluída dez vezes.



Tabela 3: Meio de STEINBERG com o pH estabilizado  
(Modificado de acordo com Altenburger)

Substance		Nutrient medium	
<b>Macroelements</b>	mol weight	mg/l	mmol/l
KNO <sub>3</sub>	101,12	350,00	3,46
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	236,15	295,00	1,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	90,00	0,66
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,18	12,60	0,072
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,37	100,00	0,41
<b>Microelements</b>	mol weight	µg/l	µmol/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	120,00	1,94
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	287,43	180,00	0,63
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	241,92	44,00	0,18
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	197,84	180,00	0,91
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	270,21	760,00	2,81
EDTA <sup>a</sup>	372,24	1 500,00	4,03

<sup>a</sup> Disodium ethylenedinitrilotetraacetic acid dihydrate.

Fonte: ISO/DIS 20079, 2003.

Para a avaliação das substâncias tóxicas existentes na água (produtos químicos) o meio nutritivo da OECD (SIS modificado) pode também ser utilizado (Tabela 4). Para todos os testes, a concentração dos respectivos meios nutritivos deve ser mantida constante em todos os recipientes de ensaio e controle.

Tabela 4: Projeto da OECD, Outubro de 2000 – Meios de Cultura para Ensaio com a *Lemna minor* (Meio de crescimento Modificado da Norma Sueca (SIS))

Substance	Concentration		Element	Stock solution
	Stock solution g/l	Medium <sup>a</sup> mg/l		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15	75	NI <sup>b</sup>	II
NaNO <sub>3</sub>	8,5	85	NI	I
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,2	36	NI	III
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,0	20	NI	IV
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,34	13,4	NI	I
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	1,0	NI	V
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	NI	V
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	NI	V
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,050	0,050	NI	V
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,005	0,005	NI	V
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	NI	V
Na <sub>2</sub> EDTA	0,28	1,4	NI	VI <sup>c</sup>
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,168	0,84	NI	VI <sup>c</sup>
MOPS (buffer) <sup>d</sup>	490	490	NI	VII <sup>c</sup>

Fonte: ISO/DIS 20079, 2003.

Tabela 5: Legenda e Considerações Referentes ao Meio de Cultura para Ensaio com a *Lemna minor* - Projeto da OECD

pH adjustment	Adjust to $6,5 \pm 0,2$ by addition of NaOH solution (6.4) or HCl (6.5).
Sterilization	Sterilize stock solutions I to V by autoclaving (121 °C, 15 min) or by membrane filtration (pore diameter 0,2 µm) ; stock solutions VI (and optional VII) are sterilised by membrane filtration only (i.e. these should not be autoclaved).
<p><sup>a</sup> Concentration of substance in medium.</p> <p><sup>b</sup> NI = Not indicated.</p> <p><sup>c</sup> Added after autoclaving.</p> <p><sup>d</sup> MOPS buffer is only required when pH control of the test medium is particularly important (e.g., when testing metals or substances which are hydrolytically unstable).</p>	

Fonte: ISO/DIS 20079, 2003.

Em alguns casos pode ser necessário um meio de ensaio adicional, principalmente quando são analisados efluentes provenientes de mineração ou outras amostras contendo metais. Dessa forma utiliza-se o meio de APHA modificado (sem EDTA) (Tabela 6), fazendo-se necessária a alteração entre a pré-cultura e o meio de ensaio. Apesar de esse procedimento infringir diretamente uma das diretrizes dessa normatização (nenhuma mudança pode ser feita no meio de ensaio e nas condições do teste), porém, nesse caso é permitido o seu uso.

Tabela 6: Meio de APHA Modificado

Substance	Concentration		Stock solution
	Stock solution <sup>a</sup> g/l	Medium <sup>b c</sup> mg/l	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,7	147	C
NaNO <sub>3</sub>	25,5	255	A
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,41	44,1	B <sup>d</sup>
KCl	1,01	10,1	A
NaHCO <sub>3</sub>	15,0	150	A
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,04	10,4	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,186	1,86	C
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,4149	4,149	B
MnCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12,17	121,7	B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,00726	0,0726	C
ZnCl <sub>2</sub>	0,00327	0,0327	C
CuCl <sub>2</sub>	9,0 × 10 <sup>-5</sup>	9,0 × 10 <sup>-5</sup>	C
CoCl <sub>2</sub>	0,00078	0,0078	C
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,16	1,6	B

Fonte: ISO/DIS 20079, 2003.

Tabela 7: Considerações e Legenda Referentes à Tabela do Meio de APHA Modificado

pH adjustment	Adjust to pH 8,30 immediately before testing
Sterilization	None
<p><sup>a</sup> To prepare medium, add 10 ml of each stock solution to 970 ml Milli-Q water and aerate vigorously at least 1 to 2 hours.</p> <p><sup>b</sup> <i>Lemna</i> to be used for testing must be acclimated for 18-24 hours in modified APHA medium under test conditions.</p> <p><sup>c</sup> Concentrations of substance in medium.</p> <p><sup>d</sup> Acidify solution B to pH 2,0 to prevent precipitation. Protect the solution from light by storing in a dark amber bottle.</p>	

Fonte: ISO/DIS 20079, 2003.

#### 5.1.1.7. Substâncias Referência

✓ Cloreto de Potássio

✓ 3,5 Diclorofenol

#### 5.1.1.8. Organismos-Teste

Para utilizar essa norma a espécie recomendada de organismo-teste é a *Lemna minor*. Caso haja necessidade de se utilizar plantas provenientes de população selvagem, essas precisarão da confirmação da sua taxonomia para poderem ser utilizadas.

#### 5.1.1.9. Estoque e Pré-Culturas

✓ Culturas Estoque

Cerca de 1% de Agar pode ser adicionado para o meio sólido. Em condições de baixa luminosidade, temperatura ambiente e pouca evaporação as culturas podem ser mantidas por vários meses sem re-inoculação. Sendo que as mesmas deverão estar protegidas cobrindo-se o tubo de Erlenmeyer com folha de alumínio.

✓ Pré-Culturas

As culturas utilizadas no teste de toxicidade devem ser elaboradas de 7 a 10 dias antes do ensaio com o meio e condições de ensaio.

Observação: Pode ser necessário mais tempo de adaptação em caso de alteração do meio nutritivo entre estoque e pré-cultura. Para ser utilizada em testes de toxicidade, a pré-cultura de *lemna* deve satisfazer os seguintes critérios de saúde:

- a) Crescimento próximo do exponencial;
- b) O número de frondes na pré-cultura deverá ter um aumento de sete vezes até o final de sete dias (i.e.  $\mu^3$  0,275 por dia ou duplicação no tempo de 2,5 dia);
- c) A cultura deve ser composta de colônias jovens, de rápido crescimento, coloração verde vivo, sem lesões visíveis, clorose ou necrose;
- d) Pequenas colônias ou grande número de frondes isoladas é uma indicação de stress ambiental;
- e) A profundidade do meio deve ser de pelo menos 3 cm.

É importante citar que, de forma a minimizar o lapso de fases causadas por interações entre as colônias, deve ser assegurado que a cobertura seja inferior a 50% da superfície total disponível (sem

aglomeração). Todas as colônias utilizadas no ensaio devem ser originárias de uma mesma pré-cultura.

#### 5.1.1.10. Procedimento

##### ✓ Geral

Primeiramente deverão ser levadas em consideração todas as recomendações que constam na ISO 5667-16. Posteriormente deve-se ajustar o pH da amostra em  $\pm 0,2$  do valor do pH do meio nutritivo. Sendo que para ajustar o pH podem ser adicionados solução de ácido clorídrico ou solução de hidróxido de sódio (constam no item 5.1.1.7). Deve ser mantido o mínimo de diluição. Nenhum ajuste pode ser feito posteriormente.

Observação: Geralmente as lemnas não têm problemas de crescimento quando submetidas a valores de pH entre 5 e 9. Assim sendo, o ajuste de pH na maioria das vezes é desnecessário, mas isso somente se o valor estiver entre 5 e 8 e dependendo da capacidade tampão.

A neutralização não é permitida se o efeito do pH influenciar o resultado do teste ou, se for observada a modificação física (ou reação química) devido ao ajuste do pH.

##### ✓ Preparação da série de concentração para a avaliação do valor ErCx

Para a estimativa dos resultados utilizando ErCx, é necessário um número de concentrações que possam definir um índice apropriado de confiabilidade.

Um modelo de teste apropriado consiste em uma série geométrica de pelo menos cinco concentrações. Ao menos um valor de inibição deve ser medido para o cálculo do parâmetro ErCx esse deve ser acima ou abaixo do ErCx a ser estimado e três ou mais valores devem ser diferentes de 0% ou 100% de inibição. Caso contrário os intervalos de confiabilidade serão muito grandes.

#### 5.1.1.11. Teste

##### ✓ Teste para ErCx

Para a avaliação de ErCx (deve-se verificar paralelamente a ISO 5666-16), utilizam-se pelo menos três repetições para cada valor de concentração de substâncias de ensaio e seis repetições para as substâncias controle.

##### ✓ Teste para ErC<sub><20</sub>

O número de repetições depende fortemente do tamanho esperado, coeficiente de variação e dos desvios tolerados. O coeficiente de variação pode ser calculado a partir de testes com grande número de controles (verificar ISO 5667-16).

✓ Limite do Teste

Deve-se utilizar pelo menos seis repetições para a concentração limite e controles.

✓ Uso de Solventes e Dispersantes

Se o uso de solventes ou dispersantes não puder ser evitado (concentrações máximas de 0,1 mg/L e 100 mg/L respectivamente), utiliza-se um controle adicional com seis repetições incluindo o solvente ou composto químico na mesma concentração em todos os recipientes replicados. Sendo que a concentração não deverá apresentar nenhum efeito tóxico.

✓ Teste com as Substâncias Referência

Deve-se realizar um teste utilizando 3,5-diclorofenol e/ou solução de Cloreto de Potássio (item 5.1.1.7).

\*E<sub>r</sub>C<sub>50</sub> (concentração para a taxa de crescimento de 50% referente ao número de frondes) deve ser de um intervalo entre 1,8 mg/L e 3,6 mg/L para 3,5-diclorofenol e entre 5,5 g/L e 10,0 g/L para o Cloreto de Potássio;

\*As substâncias referência podem ser testadas para a verificação do procedimento de teste. É aconselhável testar as substâncias referência regularmente utilizando gráficos de controle.

#### 5.1.1.12. Número de Fronde e Início do Teste

Pelo menos dez frondes deverão ser utilizados (de 2 ou 3 por colônia), e menos de 16. Todas as frondes deverão ter tamanhos semelhantes satisfazendo tanto as condições da pré-cultura quanto inóculo para cada recipiente de ensaio. Caso se queira avaliar uma inoculação aleatória recomenda-se inserir uma das colônias pré-selecionadas em cada recipiente continuando esse processo até que cada recipiente utilizado no teste contenha o mesmo número de folhas necessário e todas de mesmo tamanho. É recomendado um recipiente com um volume mínimo de 100 mL. O diâmetro do recipiente deve ser escolhido de tal forma que a sobreposição das frondes (mais de cerca de 50% de cobertura) ao final do ensaio possa ser evitada.

#### 5.1.1.13. Temperatura

A temperatura nos recipientes de teste deve ser de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ . Esse valor de temperatura deve ser mantido durante a realização do procedimento de forma a evitar que o desvio de temperatura ultrapasse  $\pm 1\%$  em todos os recipientes. A medição de temperatura deverá ser feita pelo menos quatro vezes, além de ser recomendado o seu controle contínuo. Se os registros de temperatura são baseados em outras medidas, diferentes dos recipientes de ensaio, uma relação deverá ser estabelecida.

#### 5.1.1.14. Luz

Deverá ser utilizada iluminação de cor branca. Recomenda-se o uso de radiação fotossintética ativa (PAR) com um sensor de quantum esférico. A intensidade de luz deverá ser entre  $85 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $125 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (400 nm e 700 nm) sobre os níveis de água dos recipientes de ensaio.

A intensidade da luz deverá ser medida, em pelo menos 5 pontos do local de teste. Sendo que dever-se evitar a variação de  $\pm 15\%$  da intensidade de luz selecionada. A luz lateral e inferior do recipiente de ensaio deverá ser excluída, ou seja, o lado e o fundo do recipiente deverão ter cor preta. A medida de luz com fonte esférica que chega às plantas inseridas na solução ensaio terá que ter cor clara.

Observação: O uso de um modelo aleatório com mudança nas frequências de observação é recomendado, porém não compensa altos desvios de intensidade de luz e temperatura em diferentes lugares na área de ensaio.

Antes do teste de toxicidade é desejável a realização de um ensaio não tóxico, no qual todos os recipientes de ensaio contenham o meio controle. O coeficiente de variação de taxa de crescimento deve ser menor que 10%.

#### 5.1.1.15. Duração

O teste tem duração de sete dias.

#### 5.1.1.16. Medições e Observações

Deve-se medir o parâmetro básico (número de frondes). Um segundo parâmetro de observação também deve ser obrigatoriamente quantificado (área das frondes, peso seco e clorofila). O registro de observação qualitativa de qualquer sinal visual de fitotoxicidade em cada recipiente de teste ao final do ensaio são as demonstradas a seguir:



- a) Folhas de tamanho anormal;
- b) Variação do comprimento da raiz e sua destruição;
- c) Local ou tamanho específico da clorose ou necrose;
- d) Perda de flutuabilidade, quebra das colônias e
- e) Mudanças no meio de ensaio, contaminação bacteriana e qualquer outra alteração pertinente.

Observação: A clorofila pode ser quantificada de acordo com a ISO 10260. A área e número de frondes podem ser quantificados utilizando um sistema de análise de imagens. O peso seco é quantificado após a secagem das colônias a uma temperatura de até 60°C até as mesmas atingirem peso constante.

#### 5.1.1.17. Sequência da medição

Quantificam-se todos os parâmetros de observação escolhidos para a medição no início e no final do ensaio. Para a medição inicial de clorofila ou peso seco inoculam-se os seis controles adicionais. Realizam-se medições aleatórias de clorofila e peso seco nos controles. O número de frondes nos controles é medido pelo menos de cada 48 à 72hs.

#### 5.1.1.18. Critérios de validade

Admitindo-se que todos os procedimentos recomendados tenham sido cumpridos de forma correta e as condições respeitadas, o número médio de frondes no controle deverá ter uma taxa média de crescimento específico de pelo menos 0,275 por dia. Isso corresponde a um tempo de duplicação de cerca de 2,5 dia, que representa um aumento de sete vezes o número inicial de frondes até o final do teste. As substâncias 3,5-diclorofenol e/ou Cloreto de Potássio devem ser utilizados como substâncias referência. A inibição de crescimento de 50% ( $E_rC_{50}$ ) deve ser observada em uma concentração na faixa de 1,8 e 3,6mg/L para o 3,5 diclorofenol e 5,5 e 10mg/L para o Cloreto de Potássio. É recomendada a construção de gráficos de controle de forma a se obter maior qualidade na apresentação dos resultados. Sendo que nesse procedimento as recomendações constantes na norma ISO/IEC 17025 devem ser atendidas.

#### 5.1.1.19. Resultados Exibidos

Valores dos constituintes químicos resultantes do teste de Inibição

#### Geral

Deverão ser elaboradas tabelas que apresentem as taxas e os valores de inibição de crescimento referentes a cada repetição. Também deverá se encontrar os valores médios e desvios padrão de todos os parâmetros observados. Os valores de inibição são calculados a partir das equações constantes na própria norma que serão apresentadas a seguir. Os valores médios, coeficientes de variação das repetições e curvas da concentração de resposta também deverão ser apresentadas.

#### Estimativa da Taxa de Crescimento

A taxa de crescimento ( $r$ ) é calculada através da seguinte equação:

$$r = \frac{\ln x_{t_2} - \ln x_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

Onde:

- $r$  - é a taxa de crescimento por dia;
- $x_{t_1}$  - é o valor de observação para o parâmetro de  $t_1$  dias, (d);
- $x_{t_2}$  - o valor de observação para o parâmetro de  $t_2$  dias, (d);
- $t_2 - t_1$  - é o período de tempo entre  $x_{t_1}$  e  $x_{t_2}$  em dias, (d).

Em geral são utilizados como dados básicos os valores individuais das repetições.

É importante calcular a taxa de crescimento para todo o período de teste, ou, utilizar uma razão física para selecionar apenas uma porção da curva de crescimento prevista.

Para cada concentração controle e teste, calcula-se a taxa média de crescimento específico com a estimativa das variâncias.

Após calcula-se o percentual de inibição de crescimento para cada concentração teste através da fórmula:

$$ir = \frac{rc - rt}{rc} \times 100$$

Onde:

- $ir$  - é a inibição da taxa média de crescimento específico, em (%);
- $rc$  - é a taxa média de crescimento específico da solução controle;

$rt$  é a taxa média de crescimento específico da solução dos grupos de tratamento, em %.

#### Avaliação da Validade do Teste

Para todos os recipientes de controle, tabelas de valores individuais, valores médios e coeficientes de variação para os parâmetros quantificados deve-se calcular:

- ✓ A taxa média de crescimento específico;
- ✓ Tempo de duplicação;
- ✓ Fator de multiplicação no prazo de sete dias.

Para o controle do crescimento exponencial, a tabela de valores médios e coeficientes de variação de todos os parâmetros de observação, medidos diversas vezes, deverão ser apresentados com os valores médios de:

- ✓ Curvas de crescimento (em parâmetros de observação versus tempo) ou;
- ✓ Segmentação das taxas de crescimento ( $r$  versus tempo).

Para controles de qualidade adicionais:

- ✓ Confirmação de que os critérios de validade para o ensaio toxicológico foram todos cumpridos (usando gráfico controle).

#### 5.1.1.20. Estimativa dos Valores de $E_rC_x$ para o Número de Frondes e para o Segundo Parâmetro de Observação

O modelo mais adequado recomendado é a regressão não linear da curva de concentração resposta.

Observação: A aplicação da regressão não linear pode auxiliar na interpretação do teste, no qual, quando submetidos a altas concentrações da substância teste, após um crescimento inicial tem o maior crescimento interrompido. Como consequência (quase independente da concentração) a inibição de crescimento atinge valores entre 70 e 90 %.

#### 5.1.1.21. Documentação dos Resultados

Os valores que foram calculados para  $E_rC_x$  ( $E_rC_5$ ,  $E_rC_{10}$ ,  $E_rC_{25}$ ,  $E_rC_{50}$  e  $E_rC_{90}$  a medida que for mais apropriada) e o intervalo de confiança que corresponde ao (95%) número de frondes e o segundo parâmetro de observação são apresentados com a quantidade de algarismos significativos necessária. A resposta da concentração em massa dos componentes de águas ou efluentes testados devem ser apresentados graficamente e matematicamente, ou serem tabelados.

#### 5.1.1.22. Relatório do Ensaio

Essa normatização recomenda que o relatório de ensaio deva conter as seguintes informações:

- a) Nome do laboratório no qual o teste foi realizado;
- b) Data e período do Ensaio;
- c) Referenciar o método de ensaio que foi utilizado;
- d) Organismo-teste (nome científico, origem, estirpe) terapêutico ou de aclimação de pré-tratamento (caso haja);
- e) Descrição do material utilizado no teste (número do lote, data, origem e período de amostragem);
- f) Amostra de pré-tratamento (pré-concentração, homogeneização, ajuste de pH, tipo de agente neutralizante, pré-aeração e preservação, por exemplo);
- g) Dados, condensados ou transformados, derivadas, incluindo, caso seja apropriado, os resultados dos controles positivos e gráficos de controle são exigidos;
- h) Dados físicos e químicos determinados no período do teste (dados como temperatura, CO<sub>2</sub>, pH, turbidez, precipitação, as possíveis alterações na concentração da substância, entre outros.);
- i) Qualquer desvio na minuta do teste (solução nutritiva, aeração, natureza da água de diluição, temperatura, entre outros, número de organismos ou a densidade de inóculo, número de repetições e controles);
- j) Métodos para estimar o valor de os valores de EC;
- k) Resultados do teste detalhados e
- l) Caso necessário os comentários do teste.

Ao se efetuar uma breve análise da metodologia citada pode-se concluir que esse tipo de ensaio, pelo fato de não exigir materiais e procedimentos mais complexos, ter baixo custo e curta duração (período de sete dias apenas) pode ser facilmente realizado. Isso porque as plantas utilizadas como organismo-teste são bastante acessíveis, pois se proliferam rapidamente e são encontradas em diversos países. Além de serem facilmente adaptáveis as condições de cultivo. Ainda o procedimento de cultivo das plantas, o manuseio dos materiais e, as metodologias para obtenção dos resultados são consideravelmente

simples. O Brasil, por ser um país que possui maior parte de suas áreas com clima tropical, tem a vantagem de possuir como temperatura ambiente a temperatura necessária para a realização do teste, não necessitando de grandes alterações de temperatura durante o ensaio.

NAUMANN et. al., (2006), obteve sucesso com o uso dessa normatização para avaliar a toxicidade de dez metais pesados. Nesse experimento foi estudada a taxa de crescimento das lemnaças nos valores de 10, 20 e 50% e a fitotoxicidade provocada por cada metal pesado. E, com base nos valores ErC<sub>50</sub> (classificação média dos seguintes parâmetros de crescimento: número de frondes, peso fresco, peso seco, clorofila e carotenóide), a seguinte série de fitotoxicidade foi detectado usando concentração molar: Ag<sup>+</sup>> Cd<sup>2+</sup>> Hg<sup>2+</sup>> Tl<sup>2+</sup>> Cu<sup>2+</sup>> Ni<sup>2+</sup>> Zn<sup>2+</sup>> Co<sup>2+</sup>> Cr(VI)> As(III)> As(V).

### 5.1.2. Normatização OECD (Organização para a Co-operação Econômica e de Desenvolvimento)

#### 5.1.2.1. Introdução

Esse documento normatiza os procedimentos necessários para efetuar testes de toxicidade com lemnas. Os procedimentos do método que serão mostrados a seguir foram validados e aprovados por entidades regulamentadoras de teste.

Ensaio com *Lemna gibba* e *Lemna minor* que são descritos nessa normatização. Essas duas espécies vêm sendo amplamente estudadas e são objetos de ensaio das entidades regulamentadoras de teste. Sendo que a *L. minor* se caracteriza por ser uma espécie de lemna com frondes simétricas ou levemente assimétricas, arredondadas, elípticas, achatadas com até 5mm de comprimento. Possui apenas uma fronde por raiz, androceu com dois estames, ovário unilocular e frutos com uma ou mais sementes com costeletas longitudinais e estrias transversais (POTT, 1999). Já a lemna da espécie *L. gibba* tem a característica de possuir duas frondes por raiz e flores. Também são constituídas por dois estames sendo que cada um possui em sua parte superior uma antera onde o pólen se desenvolve (CROSS, 2010). O gênero lemna é de difícil taxonomia devido à vasta gama de fenótipos existentes. Devido à variabilidade genética nas respostas as substâncias tóxicas puderem ocorrer com as lemnas, atualmente os dados referentes a essa variabilidade para que possa ser recomendado um clone específico para esse tipo de teste ainda são escassos. Assim sendo a normatização ainda apresenta uma breve descrição das espécies de lemnas que têm sido utilizadas em ensaios de toxicidade. As espécies descritas na normatização são: *Lemna aquinoctialis*, *Lemna major*, *Lemna minor*,

*Lemna gibba*, *Lemna paucicostata*, *Lemna perpusilla*, *Lemna trisulca* e *Lemna valdiviana*. No procedimento do teste são tomadas medidas que possam evitar o mínimo de contaminação por outros organismos.

A normatização recomenda que devam ser descritos os detalhes da solução testada nos ensaios com renovação (semi-estático e de fluxo) e sem renovação (estático). Dependendo dos objetivos do teste e requisitos exigidos recomendam-se o uso dos métodos semi-estático e de fluxo, como, por exemplo, para as substâncias da solução que são rapidamente perdidas, resultados de volatilização, fotodegradação de precipitação ou de biodegradação.

Como forma de verificar o procedimento do teste pode ser utilizada a substância de referência. Sendo a substância recomendada, por apresentar melhores resultados, a 3,5 diclorofenol. No local em que o teste é realizado com menor frequência a normatização sugere testar a substância referência pelo menos duas vezes por ano, isso, em paralelo com a determinação de toxicidade da substância de ensaio.

#### 5.1.2.2. Princípios do Teste

Assim como a normatização ISO/DIS 20079 é recomendado o crescimento das lemnas em monoculturas com diferentes concentrações de ensaio por um período de sete dias. O teste visa quantificar os efeitos sobre o crescimento vegetativo das lemnas pela ação da substância teste durante esse período. Sendo que esses efeitos são quantificados por meio de avaliações do número de frondes e também da biomassa (área total de frondes, peso seco e peso fresco). Para quantificar os efeitos relacionados à substância, o crescimento que ocorre na solução teste é comparado ao crescimento das lemnas em uma solução controle em que é especificada uma percentagem X de inibição de crescimento (50% por exemplo). Essa inibição é determinada e expressa como EC<sub>x</sub> (EC<sub>50</sub> por exemplo). Além disso, e menor concentração em que o efeito foi observado (LOEC) e a concentração em que não foi observado efeito algum (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente.

#### 5.1.2.3. Informações sobre a Substância Teste.

Deverão ser utilizados os métodos analíticos, com sensibilidade adequada para a quantificação média da substância teste. As informações referentes à substância tais como: pureza, solubilidade em água, estabilidade em água e luz, pressão de vapor, biodegradabilidade, P<sub>ka</sub> e K<sub>ow</sub>, poderão ser úteis para estabelecer as condições do teste. Pressão de vapor e a solubilidade em água poderão ser utilizadas para o cálculo da Lei de Henry, que irá indicar as prováveis perdas

significativas durante o período de teste. Esse procedimento irá auxiliar na decisão das medidas que deverão ser tomadas a fim de se controlar essas perdas. Quando as informações de solubilidade da substância de teste não são concretas, recomenda-se avaliá-las sob as condições de teste, ou seja, crescimento médio, temperatura, sistema de iluminação a serem utilizados no ensaio. Quando o controle do valor do pH for importante no teste, como por exemplo em ensaios com metais ou substâncias hidroliticamente instáveis, é recomendada a adição de uma solução tampão ao meio de cultura. A normatização ainda mostra os procedimentos a serem tomados no caso de teste com substâncias com propriedades físico-químicas que as tornam difíceis de serem utilizadas.

#### 5.1.2.4. Validade do Teste

Para que o ensaio seja válido deverá se verificar aumento de sete vezes no período de sete dias, isso corresponde a uma duplicação do número de frondes em um tempo inferior a 2,5 dias (60 horas).

#### 5.1.2.5. Descrição do Método

Todos os equipamentos em contato com o meio de ensaio deverão ser de vidro ou outros materiais quimicamente inertes. As vidrarias utilizadas no teste, para o cultivo e realização do procedimento, deverão ser esterilizados de forma a evitar o contato com contaminantes químicos que possam lixiviar o meio de ensaio. Os recipientes de ensaio também deverão ser amplos o suficiente para que as folhas das diferentes colônias existentes possam crescer sem se sobrepor ao final do teste. Não importa se as raízes tocarem o fundo do recipiente de ensaio, porém, a norma recomenda, que os recipientes de teste deverão possuir uma profundidade de no mínimo 20mm e volume de 100 mL. Vidrarias como frascos de Erlenmeyer, pratos de cristal ou placas de Petri de dimensões adequadas tem se mostrado úteis nesse tipo de procedimento. Com o intuito de evitar contaminação e evaporação accidental os recipientes de ensaios deverão ser cobertos. Deve-se evitar sombreamento ou alterações espectrais da luz nos recipientes de teste durante o período do ensaio.

As culturas devem ser mantidas separadas dos recipientes de ensaio. Obtém-se essa separação utilizando câmaras de crescimento separadas. A temperatura e iluminação devem ser controladas de forma a se manterem constantes.

#### 5.1.2.6. Organismo Teste

O organismo teste recomendado por essa normatização é a *Lemna minor* ou a *Lemna gibba*. Esse material vegetal pode ser proveniente de campo, de outro laboratório ou de uma colônia cultivada. Caso sejam coletadas em campo, as macrófitas deverão ser mantidas no meio de cultura utilizado no teste por um período de no mínimo oito semanas antes de serem utilizadas. Sendo que as macrófitas coletadas em campo devem ser provenientes de um ambiente distante de contaminação. Já as Lemnas obtidas de laboratório deverão permanecer por no mínimo três semanas no meio de cultura do ensaio antes de serem utilizadas. Também é indicado o uso de espécies clone (se conhecidas).

As monoculturas que forem utilizadas deverão estar livres de contaminação por outros organismos como algas e protozoários, por exemplo. O uso de plantas saudáveis de *Lemna minor* consistirá em colônias que compreenderão de duas a cinco frondes por colônia, já a *Lemna gibba* poderá conter até sete frondes por colônia. O número de frondes é utilizado pela normatização como forma de quantificar o material vegetal utilizado. Sendo que tem que haver cuidado na escolha das macrófitas necessárias ao teste com relação à quantidade e uniformidade das plantas, pois esses fatores influenciarão no resultado da avaliação. Recomenda-se o uso de plantas jovens, de crescimento rápido, sem lesões visíveis ou descoloração (clorose). É necessário utilizar culturas de boa qualidade a fim de garantir um bom desenvolvimento das colônias. Um grande número de frondes separadas (sem colônia) indica stress ambiental.

#### 5.1.2.7. Cultura

Como forma de reduzir a manutenção da cultura (quando a teste de lemnas tiver um período aleatório, por exemplo) essa poderá ser mantida a luz e temperatura reduzidas (4 a 10 °C). Sinais visíveis de contaminação por algas ou outros organismo exigirá a esterilização de uma sub amostra de frondes de lemnas seguido de transferência para um meio fresco. Neste caso o restante da cultura contaminada poderá ser descartado.

Pelo menos sete dias antes do teste as colônias são transferidas assepticamente a um novo meio estéril e cultivadas por um período de sete dias nas condições de ensaio.

#### 5.1.2.8. Água

Diferentes meios são recomendados para a *Lemna gibba* e *Lemna minor*, como será descrito a seguir. Deve-se ter considerável cuidado a



inclusão de um tampão de pH no meio de cultura [MPOS(4-ácido sulfônico morfolinepropano, CAS No: 1132-61-2) no meio da *Lemna minor* e NaHCO<sub>3</sub> no meio da *Lemna gibba*] quando houver suspeitas de que pode haver reação com a substância de teste e influenciar na expressão da sua toxicidade. Também é recomendado, considerando que os critérios de validade ensaio sejam atendidos, o uso do meio de Steinberg anteriormente apresentado na Tabela 3(ver item 5.1.2.3).

#### 5.1.2.9. Meio de Cultura da *Lemna minor*

O meio de crescimento e cultivo recomendado para a *Lemna minor* é uma modificação do padrão sueco (SIS). A composição dos nutrientes para a solução estoque utilizada no ensaio é apresentada na Tabela 4.

Para preparar um litro do meio de SIS, os seguintes compostos são adicionados a 900 ml de água deionizada:

- 10 mL de solução estoque I;
- 5 mL de solução estoque II;
- 5 mL de solução estoque III;
- 5 mL de solução estoque IV;
- 1 mL de solução estoque V;
- 5 mL de solução estoque VI e
- 1 mL de solução estoque VII (opcional).

Observação: Outra solução estoque VII (tampão MPOS) pode ser necessária para algumas substâncias teste (ver item 5.1.2.3). O pH deve ser ajustado para  $6,5 \pm 2$  com a solução de 0,1 ou 1 M HCl ou NaOH, e o volume ajustado para um litro de água deionizada.

#### 5.1.2.10. Meio de Cultura da *Lemna gibba*

O crescimento médio, 20X-APP, é o recomendado para ensaio a cultivo da *Lemna gibba*. Cinco nutrientes de solução estoque (A1, A2, A3, B e C) são preparados para o meio 20X-APP, conforme o indicado no anexo I da página 79. Para produzir o meio de cultura a solução estoque é adicionada a aproximadamente 850 mL de água deionizada. O pH deverá ser ajustado para  $7,5 \pm 0,1$  com 0,1 ou 1 M HCl ou NaOH, e o volume ajustado para um litro de água deionizada. O meio deverá ser filtrado em uma membrana de 0,2 µm e destinado a um recipiente estéril.

De forma a permitir que o pH se estabilize o crescimento médio destinado ao teste deverá ser preparado com antecedência de 1 a 2 dias. Antes do uso do meio de cultura o valor de pH deverá ser analisado e

ajustado (com a adição de 0,1 ou 1 M HCl ou NaOH conforme foi descrito anteriormente) caso seja necessário.

#### 5.1.2.11. Solução de Teste

Geralmente as soluções de teste são preparadas a partir da dissolução das soluções estoque. As soluções estoque das substâncias teste são preparadas pela dissolução da mesma no meio de cultura.

Normalmente, sob as condições de ensaio, a maior concentração da substância de teste não deverá exceder a sua solubilidade em água. A fluutuabilidade da lemna deverá ser notada, pois com isso a macrófita poderá ficar exposta a substâncias da interface ar água (substâncias pouco solúveis, hidrofóbicas ou substâncias de superfície, por exemplo). Sob tais condições de exposição vai resultar em outro material que na solução e concentração de teste poderão, dependendo das características da substância, exceder a sua solubilidade em água. Para substâncias de baixa solubilidade poderá ser necessário preparar uma solução estoque concentrada ou a dispersão da substância, utilizando solvente orgânico ou dispersante, a fim de facilitar a adição de quantidades precisas da substância teste para o meio de ensaio, e, ainda, ajudar na sua dispersão e dissolução. É importante evitar o uso desses materiais. Não deverá haver sinais de fitotoxicidade resultantes da utilização de solventes auxiliares e dispersantes. Geralmente são utilizados solventes que não causam fitotoxicidade em concentrações até 100 mg/L incluindo acetona e dimetilformamida. Caso um solvente ou dispersante seja usado, a concentração final deverá ser descrita e mantida a um mínimo ( $\leq 0,01\%$ , i.e.  $\leq 100\text{mg/L}$ ), e todos os tratamentos deverão ter a mesma concentração de solvente ou dispersante.

#### 5.1.2.12. Procedimento

##### Teste e Grupos Controle

O conhecimento prévio da toxicidade da substância teste para a lemna poderá auxiliar na seleção mais adequada da das concentrações de ensaio. Normalmente deverão ser utilizadas pelo menos cinco concentrações dispostas em série geométricas, com um fator de separação, de preferência, inferior a 3,2. O uso de quantidades de concentrações inferiores a cinco deverão ser justificadas. Recomendam-se ao menos três repetições para cada concentração de teste e controle.

Para a definição da gama de concentrações de ensaio (por telemetria e/ou para a toxicidade teste definitiva) deverão ser considerados os procedimentos a seguir:

- ✓ Se a determinação for por EC<sub>x</sub>, as concentrações de ensaio deverão dar suporte ao valor de EC<sub>x</sub> de forma a manter um nível de segurança apropriado. Caso se estime o EC<sub>50</sub>, por exemplo, a maior concentração de ensaio deverá ser maior que o valor de EC<sub>50</sub>. Se o valor de EC<sub>50</sub> estiver fora do intervalo das concentrações teste, a associação dos intervalos de confiança serão grandes e não será possível prever de forma adequada do ajuste do modelo;
- ✓ Caso o objetivo seja estimar a LOEC/NOEC, a menor concentração de ensaio deverá ser suficientemente baixa a fim de que o crescimento não seja significativamente menor do que o crescimento da solução controle. Além de que a maior concentração teste deverá ser alta o suficiente para que o crescimento seja significativamente inferior a solução controle. Se não for esse caso o teste deverá ser repetido utilizando-se uma concentração diferente a cada intervalo (a menos que a maior concentração esteja no limite de solubilidade ou o máximo limite de concentração exigido, 100mg/L).

Cada teste deverá ser constituído do mesmo meio nutritivo, número de frondes, condições ambientais e procedimentos de ensaio antes da inclusão da substância teste. Em caso de uso de solvente ou dispersante auxiliar, deverá ser incluído um tratamento adicional com solvente/dispersante presentes na mesma concentração dos recipientes com a substância. O número de replicações dos recipientes de controle deverá ser a mesma que as utilizadas nos recipientes de teste.

#### 5.1.2.13. Exposição

Será necessária a transferência de colônias contendo de 2 a 4 frondes visíveis, a partir de cultura de inoculo, por meio da distribuição aleatória em cada recipiente sob condições assépticas. Sendo que cada recipiente deverá conter um total de 9 a 12 frondes. O número de colônias e folhas deverá ser o mesmo em cada recipiente. Recomenda-se três repetições para o ensaio, cada replicação deverá conter inicialmente de 9 a 12 frondes, esse procedimento é suficiente para detectar diferenças de crescimento na faixa de 10 a 15% entre os tratamentos (4 a 7% da inibição calculada pela taxa de crescimento).

É necessária a locação adequada dos recipientes de teste nas câmaras de ensaio para minimizar a influência das variações de luminosidade e temperatura. Um reposicionamento aleatório dos recipientes no instante em que as observações forem feitas também será necessário (reposicionamentos feitos com maior frequência).

Caso um teste de estabilidade mostre que a concentração de ensaio não poderá ser mantida (ou seja, as concentrações medidas fiquem 80% abaixo da concentração inicial) no término do período do teste (7 dias), é recomendado um regime semi-estático. Nesse caso as colônias deverão ser expostas a solução teste recém preparada e às soluções controle pelo menos duas vezes durante o ensaio (terceiro e quinto dia). No entanto a frequência de exposição ao meio fresco dependerá da estabilidade da substância. A maior frequência é necessária como forma de manter a concentração de substâncias altamente instáveis ou voláteis.

Para algumas substâncias tais como: pesticidas, de aplicação diretamente pelas folhas (pulverização) poderão ser aplicáveis em caso de esse fator ser considerado o cenário mais provável de exposição e/ou se exigido pela normatização.

#### 5.1.2.14. Condições de Encubação

Iluminação fluorescente contínua branca deverá ser utilizada no ensaio para o fornecimento de intensidade de luz no intervalo de 6500 a 10000 a luz e a radiação fotossintética ativa (400 a 700 nm) de 85 a 125  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}$ . Deverão ser medidos os pontos de mesma distância da fonte de luz para as frondes das lemnas. As variações da intensidade de luz ao longo da área de teste não poderão ser superiores a 15%. As formas de medição da iluminação e os tipos de sensores utilizados para essa finalidade poderão influenciar o resultado do valor medido.

A normatização recomenda uma temperatura de  $24 \pm 2$  no ambiente de ensaio. O pH do meio de ensaio não poderá ter um aumento maior que 1,5 unidades durante o ensaio. No entanto, esse aumento não invalida o teste quando todos os critérios de validade foram atendidos.

#### 5.1.2.15. Duração

Sete dias após a inoculação das Lemnas nos recipientes o teste é finalizado.

#### 5.1.2.16. Observações

Os números de frondes e colônias devem ser contabilizados no início do teste, tendo cuidado de contabilizar todas as frondes visíveis. Sendo que essa quantificação, juntamente com a aparência, só deverá analisada no início e no fim do teste. Esses efeitos deverão ser avaliados por meio do valor da taxa média de crescimento específico levando em conta a duração total do ensaio. A contagem do número de frondes e

colônias após períodos intermediários de exposição serão necessários caso seja imprescindível a medição da taxa de crescimento em intervalos durante o período de ensaio. Neste caso o número de frondes terá que ser determinado pelo menos uma vez a cada três dias, ou seja, pelo menos em duas ocasiões durante o período do teste. Alterações no desenvolvimento da planta (como tamanho das frondes, aparência, clorose, necrose, quebra de colônias ou perda de flutuabilidade, comprimento da raiz, morfologia e avaria) também deverão ser observadas tanto como as características significativas no meio de ensaio (como presença de material dissolvido, proliferação de algas no recipiente de ensaio).

No ensaio, além da determinação de número de frondes os efeitos da substância sobre a biomassa final também deverão ser levados em consideração os seguintes parâmetros:

1. Área total das frondes;
2. Peso seco, ou
3. Peso fresco.

Sendo que desses três o principal parâmetro de análise é a área total das frondes seguida do peso seco e fresco. Os pesos fresco e seco deverão ser quantificados no início do teste, sendo esses provenientes de uma amostra de cultura em inoculo, e no final do teste com o material vegetal de cada recipiente de ensaio e controles. A área poderá ser mensurada para cada recipiente de ensaio e controle no início e ao final do teste.

Os parâmetros anteriormente citados poderão ser determinados conforme a metodologia apresentada a seguir:

Área total da fronde: A área total das frondes é determinada por meio de análise de imagem. Recipientes de ensaio e as macrófitas poderão ser analisadas pela captação de imagens através de câmera de vídeo e, posteriormente, por imagem digitalizada. A partir de ajustes com fórmulas geométricas conhecidas as áreas totais das frondes poderão ser determinadas. Possíveis interferências existentes na superfície do recipiente de ensaio deverão ser totalmente eliminadas. Existe também a possibilidade, porém mais trabalhosa, de análise desse parâmetro por fotos. Quantifica-se a área dessa forma utilizando-se um analisador de área foliar ou papel quadriculado. Outras técnicas também poderão ser apropriadas tais como: relação do peso do papel entre a silhueta da área das colônias e a unidade de área.

Peso Seco: As colônias devem ser recolhidas de cada recipiente de ensaio e lavadas com água destilada ou deionizada. Após esse procedimento remove-se o excesso de água e a planta é seca a uma temperatura constante de 60°C. Qualquer fragmento de raiz deverá ser incluído. O peso seco deverá ser apresentado com uma precisão de pelo menos 0,1g.

Peso Fresco: As colônias devem ser transferidas para tubos de poliestireno (ou outro material inerte) com pequenos furos (1mm) e fundo arredondado. Os tubos deverão ser centrifugados a uma frequência de 3000 rpm por um período de 10 minutos a temperatura ambiente. Os tubos, contendo as colônias, agora secas, devem ser novamente pesados e o peso fresco deverá ser calculado subtraindo o peso do tubo vazio.

#### 5.1.2.17. Frequência das Medições e Determinações Analíticas

No caso de utilização do procedimento de teste estático deverá se medir o pH no começo e no final do teste. Já em caso de uso de procedimento de teste semi-estático o pH deverá ser medido em cada lote fresco de solução teste antes de cada renovação e também nos correspondentes gastos de solução.

A intensidade de luz da câmara de crescimento, incubadora deverá ser medida em pontos que tem a mesma distância da fonte de até as lemnas. A medição terá que ser feita pelo menos uma vez ao decorrer do teste. A temperatura do meio em um recipiente substituído deverá estar calibrada com o mesmo valor das câmaras de crescimento. Ainda recomenda-se a medição diária dessa temperatura.

As concentrações das substâncias teste deverão ser quantificadas em intervalos regulares durante o ensaio.

Nos ensaios semi-estáticos, no qual não é esperado que a concentração da substância teste se mantenha a  $\pm 20\%$  da concentração nominal, será necessária a observação de todas as soluções de ensaios preparadas no momento do teste e as mesmas soluções a cada renovação. Contudo, em ensaios em que a concentração inicial da substância teste não estiver dentro do parâmetro de  $\pm 20\%$  da concentração nominal, mas se houver evidências suficientes que demonstrem que as concentrações iniciais são estáveis e reprodutíveis (ou seja, dentro do intervalo de 80-120% da concentração inicial), as observações químicas poderão ser realizadas para testar apenas a maior

e a menor concentração de ensaio. De qualquer forma a determinação da concentração das substâncias teste antes da renovação só precisará ser executada em um recipiente replicado em cada concentração de ensaio (ou conteúdo dos recipientes agrupados para a replicação).

Em caso de o teste de fluxo ser utilizado a norma recomenda o uso de um regime semelhante ao de amostragem para testes em regime semi-estático, incluindo análise no início, na metade e no fim do teste. No entanto não será necessário mensurar o gasto de soluções neste caso. Nesse teste também haverá a necessidade de avaliar diariamente a vazão do diluente e substância teste ou da solução estoque.

Caso se observe que a substância testada no início do teste está dentro do limite de concentração de  $\pm 20\%$  da concentração nominal, as análises dos valores poderão ser baseadas nos valores nominais. Em caso de o desvio da concentração nominal ou inicial quantificada ser superior a  $20\%$  as análises deverão ser feitas a partir da média ponderada do tempo.

#### 5.1.2.18. Limite do Teste

Em alguns casos quando uma avaliação preliminar indica que a substância de ensaio não é tóxica em concentrações até 100mg/L ou até o seu limite de solubilidade no meio de ensaio (caso seja menor), um limite do teste envolvendo uma comparação das respostas de um grupo controle e um grupo de ensaio (100mg/L ou uma concentração equivalente a concentração limite de solubilidade), poderão ser realizadas. A normatização recomenda que essa seja acompanhada da análise da concentração de exposição.

Todas as recomendações descritas anteriormente e os critérios de validades são aplicáveis dentro do limite do teste, com exceção do número de replicação do teste que deverá ser duplicado. O crescimento do grupo controle e de tratamento poderá ser analisado por meio de teste estatístico para comparar as medidas.

#### 5.1.2.19. Relatório e Dados

##### Tratamento dos Resultados

Na determinação do tempo de duplicação ( $T_d$ ) do número de frondes aliado ao critério de validade para o estudo os seguintes métodos devem ser utilizados com os dados dos recipientes controles:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Onde:

$\mu$  - é a média de crescimento específico.

Este teste tem como objetivo principal identificar os efeitos da substância teste sobre o crescimento vegetativo da Lemna. Assim sendo, essa normatização descreve os seguintes passos para efetuar essa avaliação:

- I. Taxa de Crescimento Específico Médio: Esse é um valor que deverá ser calculado com base nas mudanças do número e área das frondes dos grupos de tratamento e controle ao término do período de teste (período de sete dias);
- II. Biomassa Final: Esse parâmetro deve ser calculado a partir dos dados de alterações no valor logarítmico da área total da fronde, peso seco ou fresco nos grupos controle e de tratamento ao término do teste;
- III. Área sob a Curva de Crescimento: Esse parâmetro também deverá ser calculado com base na informação de número de frondes determinados em cada recipiente controle e de ensaio ao decorrer do teste, entretanto deverá ser integrado um valor logarítmico para o parâmetro de número de frondes durante o período de exposição.

Poderão ser utilizados os dados de taxa média de crescimento específico do número de frondes para estimar a toxicidade, porém é preferível utilizar os dados de medição da biomassa. (peso seco, peso úmido e área total das frondes) isso porque algumas substâncias podem afetar o tamanho das frondes sem afetar a quantidade. Por ser um parâmetro mais sensível dentre os três dados de medição da biomassa a área das frondes é o dado de avaliação mais recomendado.

Caso o critério de tempo de duplicação seja atendido, porém existirem evidências de que os crescimentos nos recipientes controle não forem exponenciais, os períodos significativos de atraso forem observados, ou se o curso da curva de crescimento não for constante, então deverá se dar preferência, para a estimativa da toxicidade, a área sob o crescimento da curva ao invés taxa média de crescimento específico.

Os parâmetros de crescimento registrados tais como: número de frondes, área das frondes, peso seco e fresco, deverão ser descritos junto com as concentrações de ensaio em cada quantificação. As medições



posteriores tais como: LOEC, NOEC ou ECx terão que se basear nos valores das replicações individuais e não no grupo de tratamento.

#### 5.1.2.20. Taxa Média de Crescimento específico

Esse parâmetro deverá ser calculado para cada concentração controle e de ensaio, levando em consideração o número de frondes para cada recipiente duplicado, considerando controles e recipientes de tratamento, e cada tempo de observação deverá ser plotado em um gráfico versus o tempo de duração do ensaio em valores de semi logaritmo para a elaboração das curvas de crescimento. O valor de taxa de crescimento média para um determinado período é calculada através da curva logarítmica de crescimento que provém da equação:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i}$$

Onde:

- $\mu_{i-j}$  - é a taxa de crescimento médio específico do momento i ao j;
- $N_i$  - é o número de frondes observadas no recipiente de teste ou controle no tempo i;
- $N_j$  - é o número de frondes observadas no recipiente de teste ou controle no tempo j;
- $t_i$  - é o tempo inicial (início do teste) e
- $t_j$  - é o tempo final (fim do teste).

Caso ocorra um crescimento exponencial nos controles (ou um crescimento próximo ao exponencial) e não havendo períodos significativos de estagnação o curso da curva será sempre constante, a taxa média de crescimento poderá ser encontrada por meio da regressão linear do gráfico de Ln N versus tempo.

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento poderá ser encontrada a partir da seguinte equação:

$$\%I_r = \frac{(\mu c - \mu t)}{\mu c} \times 100$$

Onde:

- $\%I_r$  - é o percentual da taxa de crescimento médio específico;  
 $\mu_c$  - é o valor médio de  $\mu$  para a solução controle e  
 $\mu_t$  - é o valor médio de  $\mu$  para o grupo de tratamento.

#### 5.1.2.21. Biomassa Final

Esse parâmetro poderá ser calculado a partir dos valores de área das frondes, peso seco e peso fresco em cada recipiente no início e no final do teste. Essa porcentagem média poderá ser calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\%I_b = \frac{b_c - b_t}{b_c} \times 100$$

Onde:

- $\%I_b$  - percentual de redução da biomassa;  
 $b_c$  -  $\ln$  (biomassa final) menos  $\ln$  (biomassa inicial) para a grupo controle;  
 $b_t$  -  $\ln$  (biomassa final) menos  $\ln$  (biomassa inicial) para a grupo de tratamento;

#### 5.1.2.22. Área sob a Curva

A área sob a curva poderá ser calculada para cada repetição de controle e tratamento por meio da fórmula:

$$A = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{2} t_1 + \frac{\ln N_1 + \ln N_2 - \ln N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{\ln N_{n-1} + \ln N_n - 2 \ln N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Onde:

- $A$  - é a área sob a curva de crescimento;  
 $N_0$  - é o número de frondes observado nos recipientes de ensaio e controle no início do teste;  
 $N_1$  - é o número de frondes observado nos recipientes de ensaio e controle no tempo  $t_1$ ;  
 $N_n$  - é o número de frondes observado nos recipientes de ensaio e controle no tempo  $t_n$ ;  
 $t_1$  - tempo da primeira medição após o início do teste;

$t_n$  - tempo do  $n^{\text{th}}$  medido após o início do teste.

A área deverá ser calculada o período de teste total, ou uma para apenas uma parte da curva de crescimento prevista. A área média deverá ser calculada para cada concentração teste e controle com a estimativa de variância.

O percentual de inibição por meio da área sob a curva poderá ser calculado através da fórmula:

$$\%I_a = \frac{(A_c - A_t)}{A_c} \times 100$$

Onde:

$A_c$  - é o valor médio para a área sob a curva para o grupo controle;

$A_t$  - é o valor médio para a área sob a curva para o grupo de tratamento;

#### 5.1.2.23. Concentração da Curva de Crescimento

A concentração da curva de crescimento relativas a porcentagem de inibição dos parâmetros de crescimento e o log da concentração da substância de ensaio deve ser plotado.

#### 5.1.2.24. Determinação do LOEC/NOEC

Para estimar a LOEC e NOEC deverá ser utilizada a ANOVA para calcular a taxa de crescimento médio específico, área sob a curva ou biomassa final e deverão ser agrupados os desvios padrão residual entre as repetições para cada concentração de ensaio. Posteriormente a média resultante para cada concentração de ensaio deverá ser comparada a controle (todos os controles deverão ser agrupados, inclusive os negativos e solventes controle, em caso de uso) utilizando um método apropriado.

A norma recomenda um teste para a normalidade dos dados pelo cálculo pela estatística de Shapiro Wilk, por exemplo, e, se a replicação dos dados revelarem uma estrutura de erros normalmente distribuída é recomendada a realização de um teste de homogeneidade das variações entre os grupos de tratamento como o teste de Bartlett's ou Levene's. Caso as variâncias não sejam homogêneas, será necessária uma transformação de dados antes de realizar a ANOVA. A transformação

logarítmica é recomendada para a taxa de crescimento médio específico na área sob a curva e a transformação da raiz quadrada para a biomassa final. A análise não-paramétrica, como o teste de Wilcoxon Rank Sum, por exemplo, poderá ser utilizada quando as suposições de normalidade e homogeneidade das substâncias não são satisfeitas.

Se um teste unicaudal é utilizado para comparar as médias a rejeição de hipótese nula implica no resultado da média do grupo controle ser superior ao do grupo de tratamento. Caso seja utilizado um teste bicaudal a rejeição da hipótese nula implicará ser menor (inibição) ou maior (estímulo) que a média do grupo controle. Em caso de uso de teste unicaudal ou bicaudal deverá ser utilizado um tipo de meio teste de comparação. Além disso, o tamanho do efeito poderá ser identificado pela ANOVA (diferença mínima significativa) e esse procedimento deverá ser descrito.

#### 5.1.2.25. Estimativa de $EC_x$

A estimativa de  $EC_x$  ( $EC_{50}$  por exemplo) deverá levar em consideração pelo menos um dos parâmetros de crescimento, número de frondes, área dos frondes, peso seco e peso úmido. O valor de  $EC_x$  poderá ser obtido por regressão não linear pela curva de concentração-resposta com a utilização de uma função matemática apropriada. As funções apropriadas que são elaboradas para replicar os dados de percentagem do nível de inibição são:

- I. A curva logística;
- II. Modelo normal acumulado;
- III. Interpolação linear com “*bootstrapping*”.

As fórmulas para esses modelos poderão ser resolvidas para qualquer percentual  $x$  (50%, 20% e 10% por exemplo). O modelo de interpolação linear é o mais adequado quando as respostas das substâncias de teste são diversas. Os três modelos afirmam que 0% de inibição corresponde a um valor de replicação equivalente ao controle e que 100% de inibição correspondem à replicação de valor zero. Consequentemente inclui os níveis de tratamento que tem valores negativos para qualquer um dos “*endpoints*” que poderão distorcer os resultados provenientes dos modelos. Isso poderá resultar em uma subestimação dos valores de  $EC_x$ , particularmente no modelo cumulativo normal.

A variação entre os tratamentos não poderá ser constante nas concentrações levando-se em consideração que caso seja necessário,

uma análise ponderada em que o maior peso será dado aos tratamentos com menor variabilidade. Os valores extremos dos limites de confiança de 95% em torno do EC<sub>x</sub> estimado deverá ser estimado sempre que possível. Assim sendo a curva ajustada deverá ser parametrizada para que o EC<sub>x</sub> de interesse e seu erro possam ser diretamente estimados. “A qualidade do ajuste também deve ser avaliada, graficamente ou pela divisão da soma residual dos quadrados em “falta de ajuste” e componente de erro puro” e deve se realizar um teste de significância para a falta de ajuste.

#### 5.1.2.26. Relatório

O relatório de ensaio recomendado pela normatização deverá seguir as seguintes descrições:

##### Substância Teste

- ✓ Devem ser descritas as propriedades físico-químicas e natureza física, incluindo a o limite de solubilidade em água e percentual de pureza;
- ✓ Dados de identificação (número de CAS por exemplo).

##### Espécies de Teste

- ✓ Nome científico, clone (se conhecido) e origem

##### Condições de Teste

- ✓
- ✓ Procedimento de ensaio utilizado (estático, semi-estático ou fluxo contínuo);
- ✓ Duração do teste;
- ✓ Meio Teste;
- ✓ Descrição do experimento: recipientes de ensaio e tampas, volumes das soluções, número de frondes e colônias por recipientes de ensaio no início do teste;
- ✓ Concentrações de ensaio (nominais e medidas se for o caso)e número de repetições por concentração;
- ✓ Método para a preparação da solução estoque e soluções teste incluindo o uso de alguns solventes ou dispersantes;
- ✓ Temperatura durante o teste;

- ✓ Fonte e intensidade de luz;
- ✓ Valores de pH do teste e meio controle;
- ✓ Concentrações das substâncias de teste e os métodos de análise com dados de avaliação adequados e de qualidade (estudo de validação, desvios-padrão ou limite de confiabilidade das análises);
- ✓ Descrição dos métodos para a determinação do número de fronde e outros parâmetros de avaliação tais quais: área das frondes, peso seco e peso úmido;
- ✓ Todos os desvios da normatização.

### Resultados

- ✓ Dados brutos: Número de frondes e outros parâmetros em cada recipiente de teste e controle, observação e ocasional análise;
- ✓ Médias e desvios padrão para cada parâmetro de avaliação;
- ✓ Curvas de Crescimento para cada concentração;
- ✓ Tempo de duplicação no controle com base no número de frondes;
- ✓ Estimativa da toxicidade por meio de EC<sub>50</sub>, LOEC e NOEC, e os métodos estatísticos utilizados nas suas respectivas determinações;
- ✓ Qualquer estímulo de crescimento em qualquer um dos tratamentos;
- ✓ Qualquer sinal visual de fitotoxicidade bem como observações das soluções de teste;
- ✓ Discussão dos resultados, incluindo qualquer influência sobre o resultado provenientes dos desvios dessa normatização.

Ao analisar as duas normatizações citadas, pode-se verificar que as duas tratam do mesmo tipo de teste, entretanto existem alguns pontos que diferenciam uma da outra. Essas se distinguem com relação aos seguintes parâmetros:

Organismo-Teste: A normatização ISO/DIS 20079 apresenta como organismo teste a espécie de *Lemna minor* ou o clone da mesma, enquanto a normatização OECD normatiza as espécies *Lemna minor* e

*Lemma gibba*, além de outras espécies descritas em anexo na normatização, para a realização do teste;

Tipo de Teste: A OECD sugere a realização de dois tipos de teste: sem renovação de meio de cultura (estático) ou com renovação de meio de cultura (semi-estático);

Substância de Referência: A normatização ISO/DIS apresenta como substância referência o 3,5 Diclorofenol e o Cloreto de Potássio, enquanto a normatização da OECD normatiza apenas o uso do 3,5 Diclorofenol.

Ainda, entre as diferenças anteriormente citadas, a normatização da OECD apresenta alternativas que trazem algumas peculiaridades quando comparada a ISO/DIS. Um exemplo é análise da área das frondes sem a necessidade de espectrofotômetro, e sim com o uso de fotos quantificando-se a área por meio de um analisador de área foliar ou papel quadriculado. A normatização ainda expõe outras técnicas que também podem ser apropriadas tais como: relação do peso do papel entre a silhueta da área das colônias e a unidade de área. Além disso, essa norma também descreve formas de evitar perdas significativas durante o período de teste: *“Poderão ser utilizadas a pressão de vapor e a solubilidade em água para o cálculo da Lei de Henry, que irá indicar as prováveis perdas significativas durante o período de teste. Esse procedimento irá auxiliar na decisão das medidas que deverão ser tomadas a fim de se controlar essas perdas (OECD 221, 2003)”*.

Com relação ao cultivo das macrófitas a OECD também se distingue da ISO/DIS, pois essa recomenda que as lemnas coletadas em campo devam ter um período de cultivo de pelo menos oito semanas antes da realização da pré-cultura. Outro diferencial se encontra no momento de realização do procedimento de teste que na normatização da OECD sugere o uso de colônias de 2 a 4 frondes da espécie *Lemma minor* enquanto na norma ISO é utilizado somente colônias de 2 e 3 frondes. Para contabilizar os resultados a normatização da OECD considera, além da taxa de crescimento  $E_r C_x$  também a NOEC e a LOEC, enquanto a ISO utiliza somente a taxa de crescimento  $E_r C_x$ .

Com esse comparativo pode-se perceber que a normatização da OECD oferece alternativas que vêm a tornar o teste de mais fácil realização e também proporcionam maior precisão na coleta de resultados e procedimentos de ensaio.

## **5.2. Vantagens do uso de lemnas em avaliações toxicológicas quando comparada a outros organismos-teste.**

De forma a apresentar as vantagens desse tipo de ensaio foi feito um comparativo com a avaliação toxicológica utilizando outro tipo de organismo-teste. Porém essa relação foi feita tomando o cuidado de escolher um organismo de ensaio cujas características dentro da cadeia trófica fossem semelhantes as das lemnas. Assim sendo relacionou-se o teste apresentado nas diretrizes desse trabalho, nos quais as lemnas são utilizadas como organismo teste, com os ensaios toxicológicos com o uso de microalgas. Nesse confronto apontaram-se os principais diferenciais entre os ensaios levando em consideração os seguintes parâmetros: materiais utilizados no ensaio, procedimento de teste e metodologias utilizadas para coleta de resultados.

Inicialmente foi feita uma breve análise entre os equipamentos utilizados em cada tipo de ensaio, levando em consideração que geralmente esses são os elementos de maior custo na realização dos testes. Conforme foi apresentado no item 5.1.1.5 do presente trabalho, os equipamentos utilizados no teste da normatização ISO/DIS 20079, anteriormente citada, são basicamente: espectrofotômetro, pHmetro, medidor de luminosidade, autoclave, dispositivo de filtração e sistema de análise de imagem. Já Torres (2008), descreve em seu experimento, no qual são avaliados os efeitos tóxicos provocados na alga azul *Minutocellus polymorphus* quando expostas ao oxifluorfenol e ao benzo[a]pireno, o uso dos seguintes equipamentos: autoclave vertical, fluxo laminar vertical, incubadora refrigerada, radiômetro, espectrofluorímetro, centrífuga, microcentrífuga, butijão criogênico e freezer. Muitos autores prevêm o uso de maior parte desses tipos de equipamentos pelo fato dos resultados serem baseados na análise da fluorescência da clorofila, ou, contabilização de células conforme descrito a seguir. Avaliando os dois ensaios citados, pode-se observar que esse tipo de ensaio com algas demanda de maior quantidade e modelos mais específicos de equipamentos, podendo vir a tornar mais alto o custo do procedimento.

Ainda na metodologia do ensaio toxicológico de Torres (2008), as pré-culturas devem ser mantidas em água do mar com salinidade de 32 ‰ além de necessitar que essa água seja previamente esterilizada em autoclave por um período de 30 minutos a 130°C sob pressão de 1,5kgf.cm<sup>-2</sup>. O mesmo autor descreve que o ensaio tem uma duração de 48 horas de exposição das microalgas a substância de teste. Ainda se tratando das metodologias usadas em testes com microalgas, Ribas,



(2006) observa por um período de 72 horas em sua metodologia, o crescimento do número de células da *C. vulgaris* e *S. capricornutum* e, determinação da atividade enzimática por meio de métodos colorimétricos com embasamento em alguns autores. Essas foram mantidas em condições de teste a 25°C de temperatura, intensidade de luz de 5000 lx em Erlenmeyers de 250mL com rotação, por meio de equipamento agitador, de 100 rpm. Salomón et. al., 2003, semelhantemente, avalia em sua metodologia os efeitos provocados pelo pesticida cipermetrina sobre o crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus quadricauda* a partir da observação do número de células. Os testes toxicológicos com algas, quando comparados ao teste com lemnas apresentam a vantagem de terem um período menor de observação como, 72 horas (RIBAS, 2006), 96 horas (SÁENZ e ALBERDI, et. al., 1997). No entanto os procedimentos de realização do teste e quantificação das células são mais trabalhosos pelo fato de ser obrigatório o uso de microscópio e equipamentos mais específicos para essa finalidade. Além disso, até mesmo a elaboração do meio de cultura utilizado no ensaio mostra-se mais complexo quando comparado ao teste com as macrófitas lemnáceas em que o meio de cultura é realizado apenas com a mistura de sais diluídos. Ainda a metodologia de pré-cultura das lemnas consiste somente em deixar as macrófitas expostas no meio de cultura por um período de sete dias (anterior ao início da realização do teste) nas condições de teste, tais como luminosidade e temperatura exigidas, mostrando-se menos complexo quando comparado ao cultivo descrito no ensaio de Torres, (2008), por exemplo.

Com relação à quantificação de resultados os dois métodos de ensaio são semelhantes, pois tratam estatisticamente os dados, através das replicações de cada concentração de ensaio e controles. Contudo, vale acrescentar que no teste toxicológico com as lemnas os dados resposta coletados são contabilizados a partir do número de frondes visíveis. Diferentemente do teste com algas onde se avalia, microscopicamente, as células do organismo-teste contabilizando-as.

Efetuando-se uma análise geral desse comparativo conclui-se que o teste toxicológico realizado com as macrófitas lemnáceas é uma alternativa mais viável tanto economicamente, por necessitar de materiais mais simples e de custo inferior, quanto no que diz respeito a acessibilidade a sociedade por se tratar de um ensaio mais simples.

## **6. RECOMENDAÇÃO**

Recomenda-se que os laboratórios que desenvolvem testes toxicológicos no Brasil passem a incorporar as avaliações com macrófitas lemnaças. Isso pelo fato de esses organismos terem a característica de: serem encontrados facilmente, serem de fácil cultivo e manuseio, se adaptarem facilmente as condições de ensaio e, serem altamente sensível às substâncias tóxicas.

No estado de Santa Catarina, por exemplo, existem muitas propriedades voltadas à atividade de agricultura. Dentre a ampla gama de produtos cultivados que causam impactos ambientais pode-se citar a produção de arroz como um dos principais. Isso por esse processo gerar efluentes com grande quantidade de herbicidas prejudiciais a uma diversidade de vegetais e plantas. Muitas vezes a sensibilidade dos organismos-teste utilizados na avaliação de toxicidade desses herbicidas pode não ser suficiente para detectar a concentração prejudicial às plantas e vegetais. Nesse caso sugere-se o ensaio com as macrófitas lemnaças como uma metodologia que pode vir a detectar com segurança a concentração tóxica da substância teste para esse tipo de ecossistema.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo revela a potencialidade das macrófitas lemnáceas dentro do cenário das ciências ambientais, tanto na avaliação de impactos como no tratamento de efluentes. Os diversos estudos, apresentados aqui, demonstram a consolidação do uso dessas plantas em ensaios voltados à avaliação de riscos toxicológicos. Essa consolidação se dá devido às características positivas e vantagens sobre outros organismos-teste. E, também, por esse organismo possuir as características de: crescimento rápido, ser cosmopolita (por estar amplamente espalhada pelo mundo), fácil cultivo, ser bastante sensível e apresentar resposta rápida quando exposto aos agentes tóxicos.

Devido às características citadas anteriormente foram estabelecidas as normatizações para ensaios de toxicidade utilizando esses organismos (AFNOR, (1996); ASTM, (1991); SIS, (1995); EPA, (1996); APHA, (1992)) (CROSS, 2010). Essas normatizações permitem a aplicação desses testes disseminando-os de forma global priorizando a confiabilidade dos dados. Dentre essas as normatizações mais observadas são a ISO/DIS 20079 e da OECD por esse motivo foram mencionadas no presente trabalho. A partir dos documentos avaliados conclui-se que os testes que utilizam as lemnáceas são mais simples metodologicamente, necessitando de menos materiais e equipamentos, quando comparados aos testes com microalgas.

Baseado nesse fator se recomenda o uso das lemnas no auxílio de estudos e avaliações de monitoramento ambiental e a sua implementação nos laboratórios do Brasil.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, H., DONS, C., NILSEN, S., HAUGSTAD, M. K.(1985). Growth, photosynthesis and photorespiration of *Lemna gibba*: response to variations in CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations and photon flux density. **Photosynthesis Research**, 6 (1) 87-96.

APG (Angiosperm Phylogeny Group) II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot. J. Linnean Soc.**, 141: 399-436, 2003

ARAGÃO, M. A; ARAÚJO R.P.A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.) **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006.

BOHRER, M. B. **BIOMONITORAMENTO DAS LAGOAS DE TRATAMENTO TERCIÁRIO DO SISTEMA DE TRATAMENTO DOS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS (SITE) DO PÓLO PETROQUÍMICO DO SUL, TRIUNFO, RS, ATRAVÉS DA COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA**. 1995. 469p. Tese (Doutorado em Ciências) - UFSCar, São Paulo.1995.

BOUDREAU, T. M. et. al. Laboratory Evaluation of the Toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on. **ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY**, Toronto Canadá, v. 44, n., p.307-313, 29 jul. 2002.

BRENTANO, Débora Monteiro. **DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Daphnia magna*: AVALIAÇÃO DE EFLUENTES TRATADOS DE UM ATERRO SANITÁRIO**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BRENTANO, D. M.; LOBO, E. Biomonitoramento de caráter ecotoxicológico no Vale do Rio Pardo, RS, Brasil. **Revista Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, n. 2, v. 7, p. 85-95. 2003.

BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL.: **Paraquat Toxicity to Different Green Algae**. Buenos Aires: Springer-verlag, v. 58, n. 6, 07 fev. 1997.

CROSS, John W.. **The Charms of Duckweed**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed.htm>>. Acesso em: 10 set. 2010.

DOMINGUES, D.F. e BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos Aquáticos. Cap. 7, p: 153-184. 2006. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

FINKLER, Raquel. **AValiação DO EFEITO TÓXICO DE LíQUIDOS PERCOLADOS SOBRE O SISTEMA REPRODUTIVO DE *Daphnia magma***. 2002. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FLOHR, Letícia. **ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM *Daphnia magma* COMO ALTERNATIVA PARA CLASSIFICAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS INDUSTRIAIS**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FUZINATTO, Cristiane Funghetto. **AValiação DA QUALIDADE DA ÁGUA DE RIOS LOCALIZADOS NA ILHA DE SANTA CATARINA UTILIZANDO PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS E O ÍNDICE DE QUALIDADE DA ÁGUA**. 2009. 243 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ISO/DIS 20079, **Water quality – determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test**. ISO TC 147/SC 5/WG 5, 2004.

KNIE, Joachim L. W.; LOPES, Ester W. B.. **TESTES TOXICOLÓGICOS - Métodos, técnicas e aplicações**. 2ª

Florianópolis: Agência Alemã de Cooperação Técnica - Gtz, 2004. 288 p.

LANDOLT, E. e KANDELER. **The family of lemnaceae – a monographic study: Phytochemistry, physiology, application and bibliography.** In **Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (Lemnaceae).** *Veröffentlichungen des geobotanischen Institutes der ETH.* Zürich. Stiftung Ruebel, Vol 4, n.95: 638pp. 1987.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO FILHO, Aloysio da Silva. A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA NO BIOMONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS. **Oecol. Bras.**, Rio de Janeiro, n., p.355-381, 12 jan. 2008.

MAIA, Iracema de Souza. **AVALIAÇÃO DE LAGOAS DE MATURAÇÃO MODIFICADAS COM A PRESENÇA DE SUPORTES E MACRÓFITAS DA FAMÍLIA LEMNACEAE NO TRATAMENTO DE ESGOTOS DOMÉSTICOS.** 2008. 183 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MESSIAS, Tâmara Guindo. **INFLUÊNCIA DA TOXICIDADE DA ÁGUA E DO SEDIMENTO DOS RIOS SÃO JOAQUIM E RIBEIRÃO CLARO NA BACIA DO CORUMBATAÍ.** 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Centro de Energia Nuclear Na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOHEDANO, Rodrigo de Almeida. **TRATAMENTO DE EFLUENTE E PRODUÇÃO DE ALIMENTO, EM CULTIVOS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*), ATRAVÉS DA MACRÓFITA AQUÁTICA *Lemna valdiviana*.** 2004. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

NAUMANN, Bianca; EBERIUS, Matthias; APPENROTH, Klaus-j.. Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. **Journal Of Plant Physiology**, Würselen, Alemanha, p. 1656-1664. 12 out. 2006.

OECD 221, **Guideline for the testing of chemicals. Revised proposal for a new guideline 221.** Lemna sp. Growth Inhibition Test, 2004.

OLIVI, Paulo et al. A TOXICIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS - Discussão e Métodos de Avaliação. **Química Nova**, São Paulo, n. , p.1820-1830, 24 set. 2008.

POTT, V. J.; POTT, A. **Potencial de uso das plantas aquáticas na despoluição da água.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002.

RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. 1985. **Fundamentals of aquatic toxicology.** Washington. 665p.

RESOLUÇÃO DO CONAMA nº357 de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.**

RIBAS, Maria Pilar Alañón. **COMPARATIVE STUDY OF IN VITRO CELL BASED ASSAYS VERSUS IN VIVO TOXICITY TESTS TO MONITOR ENVIRONMENTAL HAZARD OF PESTICIDES.** 2006. 250 f. Dissertação (Doutorado) - Universitat Politècnica De Catalunya, Terrassa, 2006.

RUNBINGER, Carla Ferreira. **SELEÇÃO DE MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA A AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.** 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SKILICORN, P. W.; SPIRA, W; JOURNEY, W. **Duckweed aquaculture, a new aquatic farming system for developing countries.** The World Bank, Washington, D.C. 1993.

TORRES, Moacir Aluizio. **MARCADORES DE STRESS OXIDATIVO EM *Minutocellus polymorphus* (HETEROKONTOPHYTA) SOB EXPOSIÇÃO AO OXIFLUORFENO E AO BENZO[A]PIRENO.** 2008. 194 f. Tese (Doutorado)-Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TRIVEDI, A. K. et al. ENVIRONMENTAL CONTAMINATION OF CHRYSOTILE ASBESTOS AND ITS TOXIC EFFECTS ON GROWTH AND PHISIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *Lemna gibba*. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, Toronto, n. , p.281-289, 23 fev. 2004.

ZAGATTO, P. A. Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: resultados publicados. In: 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia – Perspectivas da ecotoxicologia no Brasil. 1998. Itajaí.



**ANEXO I**  
**MEIO DE CULTURA 20X-APP**

### 20X AAP growth medium

Stock solutions A1, A2, A3 and B are sterilised by autoclaving (120 °C, 15 minutes) or by membrane filtration (approximately 0.2 µm pore size).

Stock solution C is only to be sterilised by membrane filtration.

Sterile stock solutions should be stored under cool and dark conditions. Under these conditions the stock solutions will have a shelf life of 6 – 8 weeks.

Stock solution No.	Substance	Concentration in stock solution (g.l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Concentration in prepared medium (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Prepared medium	
				Element	Concentration (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
A1	NaNO <sub>3</sub>	26	510	Na <sub>2</sub> N	190;84
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	12	240	Mg	58.08
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4	90	Ca	24.04
A2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15	290	S	38.22
A3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	1.4	30	K <sub>2</sub> P	9.4;3.7
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.19	3.7	B	0.65
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.42	8.3	Mn	2.3
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.16	3.2	Fe	0.66
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0.30	6.0	-	-
	ZnCl <sub>2</sub>	3.3 mg.l <sup>-1</sup>	66 µg.l <sup>-1</sup>	Zn	31 µg.l <sup>-1</sup>
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.4 mg.l <sup>-1</sup>	29 µg.l <sup>-1</sup>	Co	7.1 µg.l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7.3 mg.l <sup>-1</sup>	145 µg.l <sup>-1</sup>	Mo	58 µg.l <sup>-1</sup>
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.012 mg.l <sup>-1</sup>	0.24 µg.l <sup>-1</sup>	Cu	0.080 µg.l <sup>-1</sup>
C	NaHCO <sub>3</sub>	15	300	Na <sub>2</sub> C	220; 43

<sup>a</sup>Unless noted

**APÊNDICE I**  
**ENDEREÇOS ELETRÔNICOS DAS NORMATIZAÇÕES**

As normatizações apresentadas neste trabalho podem ser encontradas nos endereços eletrônicos a seguir:

- ISO/DIS 20079:

</http://www.iso.org/iso/iso\_catalogue/catalogue\_tc/catalogue\_detail.htm?csnumber=34074>.

- OECD 221:

http://www.oecd-library.org/contet/book/978926401694en.

Observação: As normatizações não foram diretamente inseridas no presente trabalho por motivo de estarem sob direitos autorais.