

José Paulo Sousa
Cintia Carla Niva

A ecotoxicidade de uma substância baseia-se na relação dose-resposta gerada a partir de dados de um ensaio ecotoxicológico, ou seja, dos diferentes níveis de efeito obtidos em função das diferentes concentrações (ou doses) da substância a que os organismos-teste foram expostos durante o ensaio. O mesmo conceito pode ser aplicado no caso de uma matriz contaminada (e.g., lodo) ou de um solo contaminado. A relação entre a concentração (ou dose) e a resposta mensurável (proporção da população afetada no caso de ensaios de letalidade ou fuga ou a inibição da germinação, ou o decréscimo do número de juvenis produzidos ou da biomassa no caso de ensaios de reprodução ou crescimento) pode ser representada por uma curva dose-resposta (Figura 10.1). Nessa curva, geralmente sigmóide, não se observa efeito tóxico na porção inicial (concentrações menores), mas em seguida, observa-se um rápido aumento do efeito à medida que a concentração aumenta, ou seja, quanto mais alta a concentração, maior será o número de indivíduos respondendo à ação da mesma (seja por aumento da mortalidade ou por diminuição da reprodução ou crescimento). Não raramente, algumas substâncias apresentam configurações diferentes da curva dose-resposta (ver capítulo 14).

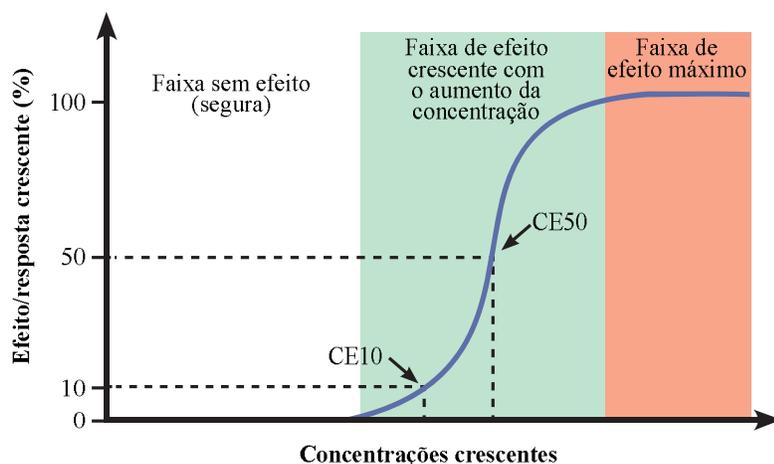


Figura 10.1. Curva dose resposta sigmóide hipotética indicando faixas de concentração de acordo com a intensidade de um efeito/resposta (ex. diminuição do número de juvenis, perda de biomassa, aumento da letalidade). A posição da concentração efetiva para 50% (CE50) e para 10% da população (CE10) estão indicadas na curva.

Através de análises estatísticas desses dados (ver capítulo 14) pode determinar-se um valor representativo da concentração da substância testada que causa um determinado efeito (letalidade, redução na reprodução, redução da biomassa, rejeição ao solo contaminado) sobre um determinado estágio de vida específico de uma população de organismos durante um determinado período

de tempo. Os valores mais comumente utilizados e considerados em avaliações de risco são:

1. CENO (concentração de efeito não observado) - a maior concentração da substância testada que não causa efeito (por exemplo, letalidade, reprodução) estatisticamente significativo sobre os organismos-teste em comparação ao controle (probabilidade $p > 0,05$).
2. CEO (concentração de efeito observado) - a menor concentração da substância testada que causa efeito (por exemplo, letalidade, reprodução) estatisticamente significativo sobre os organismos-teste em comparação ao controle (probabilidade $p \leq 0,05$).
3. CL_x (concentração letal para x% da população) - a concentração que causa letalidade em x% da população em relação ao controle. Por exemplo, CL₅₀ é a concentração que causa letalidade em 50% dos organismos testados.
4. CEx (concentração efetiva para x% da população) - a concentração que causa efeito específico (por exemplo, inibição da reprodução) em x% da população em relação ao controle. Por exemplo, CE₅₀ é a concentração que causa 50% de redução na reprodução (número de juvenis produzidos ao final do ensaio) em relação ao controle.

Apesar da CENO e CEO ainda serem utilizadas em avaliações de risco e para fins regulatórios, a sua relevância tem sido bastante criticada, principalmente por se restringirem às concentrações testadas nos ensaios e pela análise estatística utilizada (Van Der Hoeven, 1997; Isnard et al., 2001; Magalhães; Ferrão Filho, 2008; Delignette-Muller et al., 2011). Neste momento, no caso do registro de agrotóxicos na Europa, os valores do CENO estão sendo substituídos pelo cálculo do CE₁₀.

10.1 Ensaios de letalidade e reprodução

A norma ISO 16387 (ISO, 2014) recomenda três desenhos amostrais para o ensaio definitivo de mortalidade e de reprodução, onde o fator de espaçamento das concentrações do contaminante a serem testadas não deve ser maior que 2 para garantir maior robustez dos resultados. Esses desenhos se aplicam a ensaios com enquitreídeos. O mesmo princípio, com ligeiras adaptações, pode ser aplicado com minhocas (normas ISO 11268-1 e ISO 11268-2) e colêmbolos (norma ISO 11267) (ISO, 1993, 1998, 1999).

Estratégia CENO - Se o objetivo é a determinação do CENO e do CEO, o ensaio de letalidade e/ou reprodução deve ser conduzido com pelo menos cinco concentrações em uma série geométrica, em que cada concentração deve ser testada com quatro replicatas (cinco, no caso dos colêmbolos), e o controle, com oito.

Estratégia CEx - Se o objetivo é a determinação de CEx, o ensaio de letalidade e/ou reprodução deve ser conduzido com 12 concentrações com pelo menos duas replicatas cada, mais seis replicatas no controle. O fator de espaçamento pode variar, sendo menor na faixa de concentrações mais baixas, e maior nas concentrações mais altas. No entanto a situação ideal será testar mais concentrações próximas ao valor da concentração de efeito que se queira determinar (por exemplo, o CE50), pois nesse caso o intervalo de confiança associado ao valor determinado será menor e mais confiável. Para isso é necessário ter informação com base em ensaios preliminares para uma melhor definição da gama de concentrações a serem testadas.

Estratégia mista para determinação de CENO e CEx simultaneamente - recomenda-se conduzir o experimento com seis a oito concentrações, em uma série geométrica, com quatro replicatas cada uma e mais oito replicatas no controle. Este desenho amostral foi proposto originalmente pela força-tarefa do ensaio interlaboratorial com enquitreídeos (Römbke; Moser, 2002), mas também se aplica aos ensaios com minhocas e colêmbolos.

10.2 Ensaio de fuga

Para o ensaio de fuga recomenda-se conduzir o experimento com cinco replicatas para quando se deseja testar apenas uma concentração (um uma dose e.g., lodo ou de solo contaminado). No caso de se testar várias concentrações/doses, recomenda-se testar pelo menos quatro concentrações diferentes mais o controle, também com cinco replicatas para cada combinação.

O capítulo 14 discute as implicações estatísticas para a determinação de CLx, CENO, CEO e CEx.

Referências

DELIGNETTE-MULLER, M. L.; FORFAIT, C.; BILLOIR, E.; CHARLES, S. A new perspective on the Dunnett procedure: filling the gap between NOEC/LOEC and ECx concepts. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2888-91, 2011. DOI: 10.1002/etc.686.

ISNARD, P.; FLAMMARION, P.; ROMAN, G.; BABUT, M.; BASTIEN, P.; BINTEIN, S.; ESSERMÉANT, L.; FÉRARD J.F.; GALLOTTI-SCHMITT, S.; SAOUTER, E.; SAROLI, M.; THIÉBAUD, H.; TOMASSONE, R.; VINDIMIAN, E. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. **Chemosphere**, v. 45, p. 659-669, 2001.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11267**: soil quality: inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneva, 1999.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 1: M: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneve, 1993.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-2**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 2: determination of effects on reproduction. Geneve, 1998.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organization and results of an international ring-test. **Chemosphere**, 46, p. 1117-1140, 2002.

VAN DER HOEVEN, N. How to measure no effect. Part 1: towards a new measure of chronic toxicity? **Environmetrics**, v. 8, p. 241-248, 1997.

Maria Edna Tenório Nunes
Paulo Roger Lopes Alves
Julia Corá Segat
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Silvia Gonçalves Egler
Ricardo Gonçalves Cesar
Juan Colonese
Amarildo Pasini
George Gardner Brown
Cintia Carla Niva
José Paulo Sousa
Jörg Römbke
Julia Carina Niemeyer
Katy Boniza Cantelli
Andressa Cristhy Buch

Para avaliar a ecotoxicidade aguda de substâncias isoladas ou solos de áreas contaminadas a oligoquetas existem ensaios padronizados em normas, como a 207 da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1984), a 11268-1 da International Organization for Standardization (ISO) (1993), a E1676-04 da American Society for Testing and Materials (ASTM) (2004), a NBR 15537 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para minhocas (ABNT, 2014), e a NBR/ISO 16387 para enquitreídeos (ABNT, 2012). Além disso a Environment Canada também publica metodologias para ensaios para avaliação de toxicidade com minhocas (Canada, 2004). Estas normas descrevem a metodologia para se determinar o efeito letal de contaminantes a oligoquetas, por meio da exposição de espécimes adultos a solos tratados com várias concentrações de substâncias químicas, ou solos contaminados com poluentes. Dentre outros métodos utilizados para se realizar ensaios de toxicidade de substâncias químicas destacam-se a aplicação localizada, alimentação forçada e testes de imersão (Kula; Larink, 1997), mas estes têm sido pouco utilizados e são considerados menos realísticos.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda com oligoquetas podem ser conduzidos com diferentes substâncias químicas potencialmente poluentes ou com solos de áreas contaminadas, ou com resíduos sólidos e líquidos, tanto em estudos de caráter prospectivo como retrospectivo (ver seção 1.1 e capítulo 2 para definições e exemplos).

Descreve-se neste capítulo o procedimento para condução do ensaio de ecotoxicidade aguda (letalidade) tendo por base as normas NBR 15537 (ABNT, 2014), ISO 11268-1 (ISO, 2012) e E1676-04 (ASTM, 2004), para minhocas, e as normas NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004a) para enquitreídeos. Ao longo do texto, foram incluídas observações sobre adapta-