384L0449

19. 9. 84 Jornal Oficial das Comunidades Europeias Nº L 251/1

DIRECTIVA DA COMISSÃO

de 25 de Abril de 1984

que, pela sexta vez, adapta ao progresso técnico a Directiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas

(84/449/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 67/548/CEE do Conselho, de 27 de Junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (1), alterada pela sexta vez pela Directiva 79/831/CEE do Conselho (2), e em especial os seus artigos 19º, 20º e 21º,

Considerando que o nº 1 do artigo 3º da Directiva 79/831/CEE prevê a determinação das propriedades físico-químicas da toxicidade e da ecotoxicidade das substâncias e preparações de acordo com os métodos previstos no Anexo V;

Considerando que o artigo 19º da Directiva 79/831/CEE, de 18 de Setembro de 1979, prevê que o Anexo V seja objecto do procedimento do Comité para adaptação ao progresso técnico e que é, em especial, conveniente tomar em consideração métodos reconhecidos e recomendados pelos organismos internacionais competentes, quando existirem tais recomendações;

Considerando que as disposições da presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité para adaptação ao progresso técnico das directivas que visam eliminar os entraves técnicos ao comércio no sector das substâncias e das preparações perigosas,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

O texto do Anexo V da Directiva 67/548/CEE é substituído pelo texto do anexo da presente directiva.

Artigo 2º

Os Estados-membros adoptarão e publicarão, antes de 1 de Julho de 1985, as disposições necessárias para darem cumprimento à presente directiva e desse facto informarão imediatamente a Comissão. Aplicarão estas disposiçoes a partir de 1 de Julho de 1986.

Artigo 3º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 25 de Abril de 1984.

Pela Comissão

Karl-Heinz NARJES

Membro da Comissão

(1) DO nº L 196 de 16. 8. 1967, p. 1.
(2) DO nº L 259 de 15. 10. 1979, p. 10.

ANEXO

Presente anexo enuncia os métodos de ensaio para determinação das propriedades físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas enumeradas nos Anexos VII e VIII da Directiva 79/831/CEE.

Esses métodos são baseados em trabalhos e recomendações dos organismos internacionais competentes [em especial a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económicos (OCDE)].

Sempre que tais métodos não existam, são aplicados os padrões nacionais ou os métodos geralmente reconhecidos nos meios científicos. Os ensaios devem, geralmente, ser efectuados sobre a substância tal como ela é comercializada. A incidência que possam eventualmente ter as impurezas sobre os resultados do ensaio não devem ser negligenciadas.

Sempre que os métodos do presente anexo não se adaptem ao exame de determinada propriedade, o declarante deve justificar o emprego de outros métodos.

As experiências e os estudos em animais devem respeitar as regulamentações nacionais e ter em conta os princípios humanitários assim como os recentes desenvolvimentos internacionais no domínio da protecção dos animais.

Entre diversos métodos equivalentes de ensaio, deve escolher-se o que necessite de um menor número de animais.

INDICE

		Pág.
PARTE A: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		6
A. 1.	Ponto de fusão/intervalo de fusão	6
A. 2.	Ponto de ebulição/intervalo de ebulição	15
A. 3.	Densidade relativa	22
A. 4.	Pressão de vapor	27
A. 5.	Tensão superficial	39
A. 6.	Hidrossolubilidade	46
A. 7.	Lipossolubilidade	55
A. 8.	Coeficiente de partição	59
A. 9.	Ponto de inflamação	63
A. 10.	Inflamabilidade (sólidos)	65
A. 11.	Inflamabilidade (gases)	68
A. 12.	Inflamabilidade (substâncias e preparações que, em contacto com a água ou o ar húmido, libertam gases facilmente inflamáveis em quantidades perigosas)	70
A. 13.	Inflamabilidade (sólidos e líquidos)	74
A. 14.	Propriedades explosivas	76
A. 15.	Auto-inflamabilidade (determinação da temperatura relativa de auto-ignição dos líquidos voláteis e dos gases)	86
A. 16.	Auto-inflamabilidade (sólidos-determinação da temperatura relativa de auto-ignição)	88
A. 17.	Propriedades comburentes	91
PARTE B: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE		96
Introdução geral		96
B. 1.	Toxicidade aguda — administração oral	98
B. 2.	Toxicidade aguda — administração por inalação	101
B. 3.	Toxicidade aguda — administração cutânea	105
B. 4.	Toxicidade aguda — irritação da pele	108
B. 5.	Toxicidade aguda — irritação dos olhos	111
B. 6.	Toxicidade aguda — sensibilização da pele	115
B. 7.	Toxicidade subaguda — administração oral	121
B. 8.	Toxicidade subaguda — administração por inalação	124
B. 9.	Toxicidade subaguda — administração cutânea	129
B. 10.	Outros efeitos: mutagénese — prova citogenética *in vitro* em mamífero	133
B. 11.	Outros efeitos: mutagénese — prova citogenética *in vivo* em medula óssea de mamífero, análise cromossómica	136
B. 12.	Outros efeitos: mutagénese — prova do micronúcleo	139
B. 13.	Outros efeitos: mutagénese — ensaios de mutação reversa em *Escherichia coli*	142
B. 14.	Outros efeitos: mutagénese — ensaios de mutação reversa em *Salmonella thyphimurium*	145
PARTE C: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ECOTOXICIDADE		148
C. 1.	Toxicidade aguda para os peixes	148
C. 2.	Toxicidade aguda para as dáfnias	157
C. 3.	Degradação biótica: ensaio de screening OCDE alterado	162
C. 4.	Degradação biótica: ensaio AFNOR NF T 90/302 alterado	172
C. 5.	Degradação biótica: ensaio Sturm alterado	181
C. 6.	Degradação biótica: ensaio em tubo fechado	190
C. 7.	Degradação biótica: ensaio MITI alterado	201
C. 8.	Degradação: carência bioquímica de oxigénio	214
C. 9.	Degradação: carência química de oxigénio	216
C. 10.	Degradação abiótica: hidrólise em função do pH	218

PARTE A: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A.1. PONTO DE FUSÃO/INTERVALO DE FUSÃO

1. MÉTODOS

Os métodos descritos baseiam-se nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

Os métodos e os aparelhos a seguir descritos permitem determinar o ponto de fusão de produtos químicos qualquer que seja o seu grau de pureza.

A selecção do método depende da natureza do produto a ensaiar.

Por consequência, o factor limitativo está ligado ao facto de a substância ser facilmente, dificilmente ou não pulverizável.

Para certas substâncias, é preferível a determinação do ponto de congelação ou de solidificação. É por esta razão que as normas destas determinações figuram igualmente nas directivas.

1.2. Definição e unidades

O ponto de fusão é definido como sendo a temperatura a que tem lugar a transição da fase sólida para a fase líquida, à pressão atmosférica normal.

Idealmente, esta temperatura corresponde à do ponto de solidificação ou de congelação.

Dado que a fase de transição de numerosas substâncias se estende sobre uma larga gama de temperaturas, aquela é muitas vezes descrita como sendo o intervalo de fusão.

Conversão das unidades (K em °C):

$t = T - 273{,}15$

em que t é expresso em graus Celsius e T em graus Kelvin.

1.3. Substâncias de referência

Não é necessária a utilização de substâncias de referência nos casos em que se estuda uma substância nova. Estas devem servir essencialmente para calibração periódica do método e para comparação dos resultados, sempre que é aplicado outro método.

São enumeradas algumas substâncias de calibração nas referências (2).

1.4. Princípio do método de ensaio

É determinada a temperatura (ou o intervalo de temperaturas) de transição da fase sólida à fase líquida. Na prática, as temperaturas do início e do fim da fusão das substâncias a ensaiar, são determinadas, à pressão atmosférica, durante o aquecimento. São descritos três tipos de métodos: o método do tubo capilar, o método da barra quente e a determinação do ponto de congelação.

1.4.1. *Método do tubo capilar*

1.4.1.1. Dispositivo com banho líquido

Uma pequena quantidade de substância finamente pulverizada é introduzida num tubo capilar e cuidadosamente compactada. Este tubo é aquecido ao mesmo tempo que um termómetro e a elevação de temperatura é ajustada de modo a ser inferior a 1 K por minuto durante a operação. São mencionadas as temperaturas inicial e final da fusão.

1.4.1.2. Dispositivo com bloco metálico

Tal como descrito no ponto 1.4.1.1, à excepção do tubo capilar e do termómetro que são colocados num bloco metálico aquecido e observados através de aberturas existentes neste.

1.4.1.3. Detecção fotoeléctrica

A amostra contida no tubo capilar é aquecida automaticamente num cilindro metálico. Através de uma abertura neste, é enviado um feixe luminoso através da substância a testar por uma célula fotoeléctrica cuidadosamente aferida. No momento da fusão as propriedades ópticas da maioria das substâncias são alteradas, dando a opacidade lugar à transparência. Daí que a intensidade da luz que atinge a célula fotoeléctrica aumente e envie um sinal de paragem a um indicador digital que regista a temperatura do termómetro de resistência de platina colocado na câmara aquecida. Este método não é aplicável a certas substâncias fortemente coradas.

1.4.2. *Métodos envolvendo superficies aquecidas*

1.4.2.1. Método da barra quente de Kofler

A barra quente de Kofler é constituída por duas peças metálicas de condutividade térmica diferente, que são aquecidas electricamente. É construída de modo a que o gradiente de temperatura seja quase linear em todo o seu comprimento. A temperatura da barra quente pode variar entre 283 e 543 K, com um dispositivo de leitura da temperatura que compreende um cursor com um índice e uma escala graduada, especialmente concebidos para a barra em questão. Para determinação do ponto de fusão, deposita-se uma fina camada de substância directamente sobre a superfície da barra. Em alguns segundos, formar-se-á uma fina linha de divisão entre a fase fluida e a fase sólida. A temperatura à altura desta linha é lida colocando o índice do cursor frente a esta última.

1.4.2.2. Microscópio de fusão

São utilizados diferentes tipos de microscópios de platina aquecida para determinar os pontos de fusão com muito pequenas quantidades de substância. A temperatura é geralmente medida com o auxílio dum termopar sensível, mas por vezes também com a ajuda de um termómetro de mercúrio. O dispositivo-tipo tem uma câmara aquecida que contém uma platina de metal sobre a qual é colocada a lâmina de vidro destinada a receber a amostra. O centro da platina metálica é atravessado por um orifício que permite a passagem da luz proveniente do espelho, iluminando o microscópio. Aquando da utilização, a câmara é fechada com a ajuda de uma placa de vidro para impedir a circulação de ar na zona de trabalho. O aquecimento da amostra é regulado por meio de um reóstato.

Para determinações mais precisas é possível a utilização de luz polarizada para a análise de substâncias opticamente anisótropas.

1.4.2.3. Método do menisco

Este método aplica-se especificamente às poliamidas.

Determinação da temperatura à qual se observa a olho nu o deslocamento de um menisco de óleo de silicone, preso entre uma superfície quente e uma tampa de vidro colocada sobre a amostra de poliamida a testar.

1.4.3. *Método de determinação do ponto de congelação*

A amostra é introduzida num tubo de ensaio especial e colocado num aparelho que permite a determinação do ponto de cristalização.

A amostra é agitada suavemente durante todo o arrefecimento enquanto que a temperatura é lida e registada de 30 em 30 segundos. Logo que algumas determinações indiquem uma temperatura constante, o valor desta é considerado como o ponto de cristalização (após correcção termométrica).

1.5. **Critérios de qualidade**

As condições de aplicação e a precisão dos diferentes métodos de determinação do ponto de fusão/intervalo de fusão são indicados no quadro a seguir.

QUADRO: APLICABILIDADE DOS MÉTODOS

A. Métodos do tubo capilar

Método de medição	Substâncias facilmente pulverizáveis	Substâncias dificilmente pulverizáveis	Grama de temperatura	Precisão máxima aproximada (1)	Observações
Dispositivo com banho líquido	Sim	Algumas	273 a 573 K	± 0,3 K	Norma existente: JIS K 0064
Dispositivo com bloco metálico	Sim	Algumas	293 a 573 K	± 0,5 K	Norma existente: ISO 1218(E)
Detecção fotoeléctrica	Sim	Algumas com dispositivo de aplicação	253 a 573 K	± 0,1 K	

(1) Valor dependente do tipo de instrumento e do grau de pureza das substâncias.

B. Métodos das superfície aquecida e do ponto de congelação

Método de medição	Substâncias facilmente pulverizáveis	Substâncias dificilmente pulverizáveis	Grama de temperatura	Precisão máxima aproximada (1)	Observações
Banca quente de Kofler	Sim	Não	283 a 543 K	± 1,0 K	Norma existente ANSI/ASTM D 3451-76
Microscópio de fusão	Sim	Algumas	273 a 573 K (até 1 773 K)	± 0,2 K	Norma existence DIN 53736
Método do menisco	Não	Específico para poliamidas	293 a 573 K	± 0,5 K	Norama existente ISO 1218 (E)
Método do ponto de congelação	Para substâncias líquidas	Para substâncias líquidas	223 a 573 K	± 0,5 K	Norma existente BS 4699

(1) Valor dependente do tipo de instrumento e do grau de pureza das substâncias.

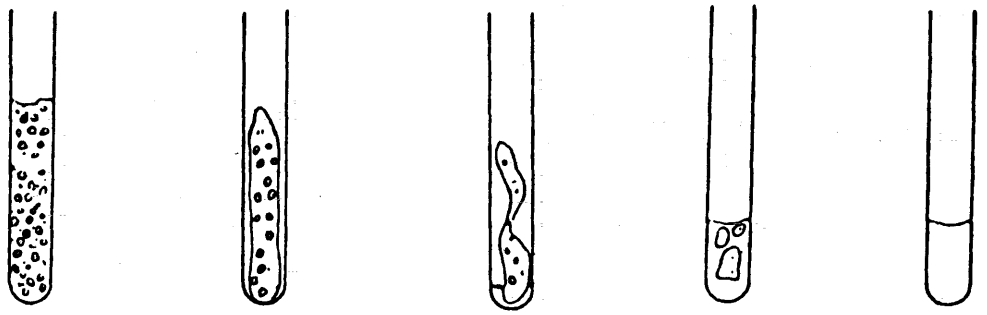
1.6. **Descrição dos métodos**

Os procedimentos de quase todos os métodos de ensaio estão descritos nas normas internacionais e nacionais (ver apêndice).

1.6.1. *Método do tubo capilar*

Quando a elevação de temperatura é lenta, as substâncias finamente pulverizadas passam habitualmente pelas fases de fusão representadas na figura 1.

Figura 1



Fase A: (início da fusão; ponto húmido): finas gotículas aderem uniformemente à parede interior do tubo capilar;

Fase B: (ponto de contracção): aparece um espaço livre entre a amostra e a parede interior, devido à contraçcão do produto em fusão;

Fase C: (ponto de colapso): a amostra contraída começa a curvar-se e a liquefazer-se;

Fase D: (ponto de liquefacção): formação de um menisco completo à superfície, restando no entanto ainda uma certa quantitade de partículas da amostra sólidas;

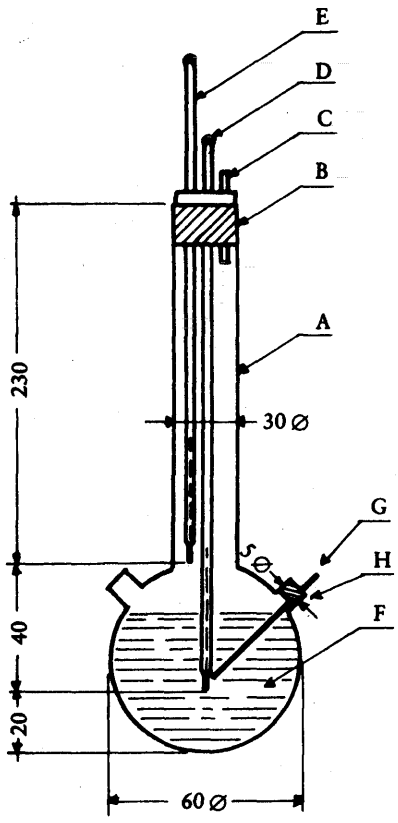
Fase E: (fim da fusão): não existem já partículas sólidas.

Durante a determinação do ponto de fusão, devem ler-se as temperaturas do início e do fim da fusão.

1.6.1.1. Dispositivos com um banho líquido

A figura 2 descreve um tipo de aparelho normalizado (JIS K 0064). Todas as especificações são expressas em milímetros; o aparelho é de vidro.

Figura 2



A: Balão de medição
B: Rolha de cortiça
C: Tubo de ventilação
D: Termómetro
E: Termómetro auxiliar
F: Banho líquido
G: Tubo capilar de vidro (comprimento de 80 a 100 mm; diâmetro interior 1 mm ± 0,2 mm; espessura da parede 0,2 a 0,3 mm)
H: Tubo lateral

Banho líquido

O líquido a utilizar deve ser escolhido em função do ponto de fusão. A parafina líquida utiliza-se para pontos de fusão que não ultrapassem os 473 K; o ácido sulfúrico concentrado ou o óleo de silicone para os pontos de fusão que não ultrapassem os 573 K.

Pode ser utilizada uma mistura composta por três partes de ácido sulfúrico e duas partes de sulfato de potássio (em peso) para os pontos de fusão superiores a 523 K.

Termómetro

Só podem ser utilizados os termómetros que satisfaçam as exigências das seguintes normas ou suas equivalentes: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Procedimento:

A substância seca é finamente pulverizada num almofariz e introduzida num tubo capilar fechado numa das extremidades, sendo a altura de enchimento cerca de 3mm após compacção. Para se obter uma amostra uniformemente compactada, deve deixar-se cair o tubo capilar de uma altura de cerca de 700mm no interior de um tubo de vidro colocado verticalmente sobre um vidro de relógio.

Então, o tubo capilar é colocado no banho de modo a que a parte central do reservatório de mercúrio do termómetro fique em contacto com a parte do capilar que contém a amostra. Geralmente, o tubo capilar é introduzido no aparelho apenas no momento em que o banho está a cerca de 10 K abaixo do ponto de fusão.

O aquecimento do banho é regulado de modo a que o aumento de temperatura seja de 3 K/minuto. O líquido deve ser agitado. A cerca de 10 K abaixo da temperatura esperada, o aumento da temperatura é regulado para um máximo de 1 K/minuto.

Cálculo:

O cálculo do ponto de fusão efectua-se utilizando a fórmula seguinte:

$$T = T_D + 0{,}00016\,(T_D - T_E)\,n$$

sendo,

T = temperatura de fusão corrigida, expressa em K

T_d = temperatura lida no termómetro D, expressa em K

T_E = temperatura lida no termómetro E, expressa em K

n = número de graduações da coluna de mercúrio emergente do termómetro D.

1.6.1.2. Bloco metálico

Aparelho

O aparelho compreende:

— um bloco metálico cilíndrico cuja parte superior é cavada formando uma câmara de aquecimento (ver figura 3),

— uma rolha metálica perfurada, com 2 ou mais orifícios que permitam a introdução dos tubos no bloco,

— um sistema de aquecimento do bloco metálico, que pode ser uma resistência eléctrica incluída no bloco,

— um reóstato para regular a potência no caso de aquecimento eléctrico,

— as paredes laterais da câmara são perfuradas por quatro janelas em vidro resistente ao calor, diametralmente opostas. Face a uma destas janelas é instalada uma ocular para observação do tubo capilar. As três outras janelas permitem iluminar o interior por meio de lâmpadas,

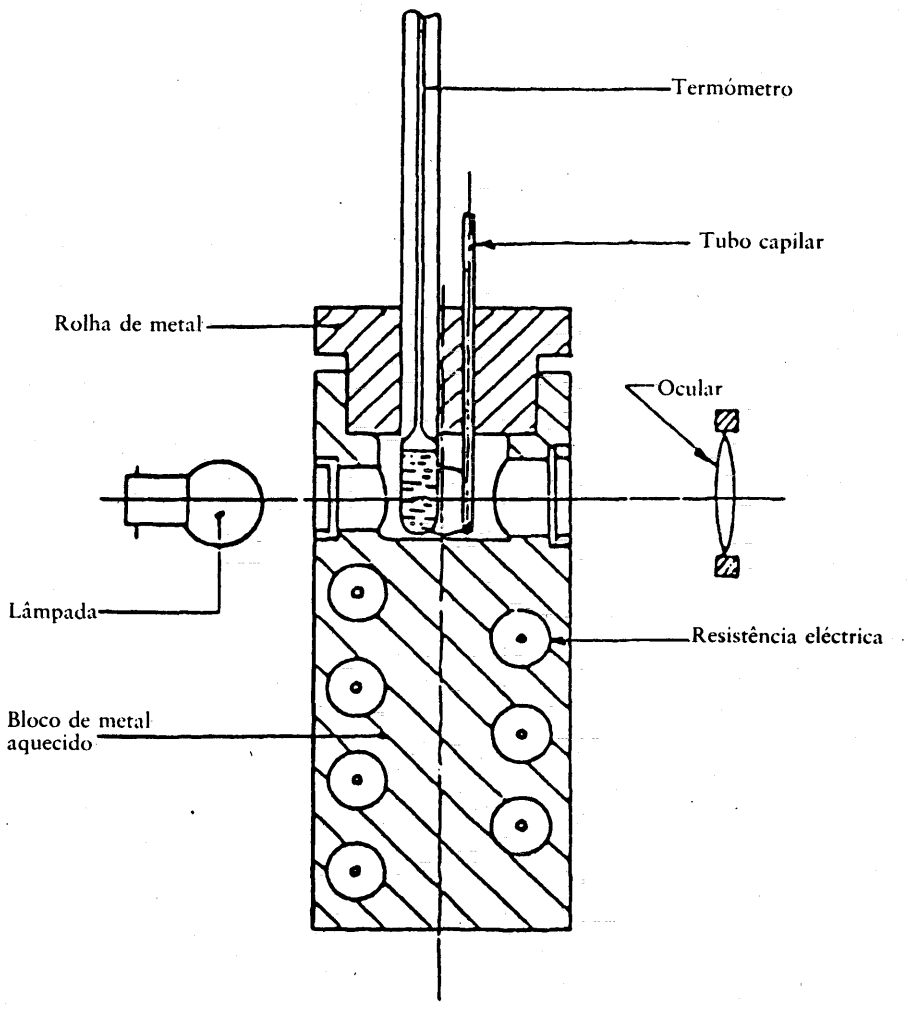
— um tubo capilar, em vidro resistente ao calor e fechado numa das extremidades (ver 1.6.1.1).

Termómetro:

Ver normas do ponto 1.6.1.1.

Podem também ser utilizados instrumentos termo-eléctricos de precisão equivalente.

Figura 3



Procedimento:

Ver 1.6.1.1. A correcção do termómetro não é necessária neste dispositivo. A temperatura de fusão registada é considerada como ponto de fusão.

1.6.1.3. Detecção fotoeléctrica

Aparelho e procedimento:

O aparelho consiste numa câmara metálica com sistema de aquecimento automático. Enchem-se três tubos capilares, como descrito no ponto 1.6.1.1 e colocam-se no forno.

Deve dispor-se de cinco variações lineares de temperatura para calibrar o aparelho. O aumento adequado da temperatura é regulado electricamente a uma velocidade pré-seleccionada constante e linear. Os registadores indicam a temperatura real do forno e o ponto de fusão da substância nos tubos capilares.

1.6.2. *Métodos envolvendo superfícies aquecidas*

1.6.2.1. Barra quente de Kofler

Ver apêndice.

1.6.2.2. Microscópio de fusão

Ver apêndice.

1.6.2.3. Método do menisco (poliamidas)

Ver apêndice.

Na proximidade do ponto de fusão, o aumento da temperatura deve ser inferior a 1 K por minuto.

1.6.3. *Métodos de determinação do ponto de congelação*

Ver apêndice.

2. RESULTADOS

Impõe-se em certos casos uma correcção do termómetro.

3. RELATÓRIO DE ENSAIO

Deve ser indicado o método utilizado.

O ponto de fusão indicado no relatório é no mínimo a média de duas determinações que não ultrapassem os limites da precisão aproximada (ver quadro). Deve ser dada uma estimativa da precisão. Se a diferença entre as temperaturas inicial e final da fusão se situar nos limites de precisão do método, a temperatura referente à fase final da fusão é considerada como o ponto de fusão; caso contrário são indicadas as duas temperaturas.

Certas substâncias podem decompor-se ou sublimar-se antes de terem atingido o ponto de fusão. Este facto deve ser assinalado.

Devem ser dadas todas as informações e observações de interesse para a interpretação dos resultados, designadamente, relativamente a impurezas e ao estado físico da substância.

4. REFERÊNCIAS

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 102 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, vol.48, 1976, p. 505-515.

Apêndice

Para detalhes técnicos adicionais podem ser consultadas, por exemplo, as seguintes normas:

1.	**Métodos do tubo capilar**	
1.1.	*Dispositivos com um banho líquido*	
	ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals
	BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range
	DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillar--verfahren
	JIS K 00-64	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products
1.2.	*Dispositivos com bloco metálico*	
	DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
	ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of « Melting Point »
2.	**Métodos com superfícies aquecidas**	
2.1.	*Banca quente de Kofler*	
	ANSI/ASTM D 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings
2.2.	*Microscópio de fusão*	
	DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
2.3.	*Método do menisco (poliamidas)*	
	ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of « Melting-Point »
	ANST/ASTM D 2133-66	Standard Specification for acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials
	NF T 51 050	Résines de polyamides. Détermination du « point de fusion ». Méthode du ménisque
3.	**Métodos de determinação do ponto de congelação**	
	BS 4633	Method for the Determination of Crystallizing Point
	BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
	DIN 10319	Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch

DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbezolen
DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunktes am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines

A.2. PONTO DE EBULIÇÃO/INTERVALO DE EBULIÇÃO

1. MÉTODOS

Os métodos descritos baseiam-se nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

Os métodos e dispositivos aqui descritos aplicam-se às substâncias líquidas que não sofrem reacção química a temperaturas inferiores à do ponto de ebulição (por ex. auto-oxidação, rearranjo, degradação,etc.). Os métodos aplicam-se a substâncias líquidas puras ou impuras.

A importância dada à descrição do método que recorre à detecção fotoeléctrica é devida ao facto de que este permite a determinação, não só do ponto de ebulição, mas também do ponto de fusão, e ainda de que as determinações podem ser efectuadas automaticamente.

O «método dinâmico» tem a vantagem de poder ser igualmente utilizado para a determinação da pressão do vapor, não sendo necessário corrigir a temperatura de ebulição para a pressão normal (101,325 KPa), pois esta pode ser mantida durante a determinação. No entanto este método não está ainda automatizado.

Observações

A influência das impurezas na determinação do ponto de ebulição depende muito da sua natureza. Esta influência pode ser considerável se a amostra contiver um solvente muito volátil.

A composição da amostra varia em cada determinação devido à volatilização dos componentes de ponto de ebulição baixo. Nestas condições, obtêm-se valores cada vez mais altos.

1.2. Definições e unidades

A temperatura de ebulição normal é definida como sendo a temperatura à qual a pressão do vapor saturante de um líquido é igual à pressão normal.

O valor medido do ponto de ebulição depende da pressão atmosférica. Esta dependência pode ser calculada quantitativamente pela equação de Clapeyron-Clausius:

$$\log p = - \frac{\Delta H_v}{2{,}3\,RT} + \text{constante}$$

sendo:

p = pressão do vapor da substância em Pascal

ΔH_v = calor de vaporização em J mol $^{-1}$

R = constante molar universal dos gases
= 8,31 J mol $^{-1}$ K^{-1}

T = temperatura expressa em K.

A temperatura no ponto de ebulição (temperatura de ebulição) é dada à pressão ambiente no momento da determinação.

Conversões:

Pressão (unidade: kPa).

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa (a utilização da unidade «bar» é ainda permitida, mas não recomendável).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (a utilização das unidades «Torr» e «mm Hg» não é permitida).

Temperatura (unidade: K)

$t = T - 273{,}15$

(t en °C et T em K).

1.3. **Substâncias de referência**

Não é necessária a utilização de substâncias de referência sempre que se estuda uma nova substância. Estas substâncias de referência servem essencialmente para aferir periodicamente o método e permitir comparar resultados.

Nos métodos enumerados no apêndice figuram algumas substâncias-padrão.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

Todos os métodos de determinação do ponto de ebulição (ou do intervalo de ebulição) são baseados na determinação da temperatura de ebulição. Descrevem-se a seguir cinco métodos:

1.4.1. *Método do ebuliómetro*

Apesar de os ebuliómetros terem sido originalmente concebidos para a determinação do peso molecular por elevação do ponto de ebulição, podem igualmente ser utilizados na determinação exacta do ponto de ebulição. A norma ASTM D 1120-72 (ver apêndice) descreve um aparelho muito simples em que o líquido é aquecido até à ebulição à pressão atmosférica em condições de equilíbrio.

1.4.2. *Método dinâmico*

Neste método mede-se a temperatura de recondensação do vapor com a ajuda de um termopar colocado no refluxo durante a ebulição. Neste método a pressão pode ser alterada.

1.4.3. *Método da destilação para ponto e intervalo de ebulição*

Este método envolve a destilação do líquido, a determinação da temperatura de recondensação do vapor e a determinação da quantidade do destilado.

1.4.4. *Método de Siwoloboff*

Aquece-se uma amostra num tubo de ensaio que se encontra imerso num banho líquido aquecido.

Mergulha-se no tubo de ensaio um capilar selado, contendo uma bolha de ar na sua parte inferior. Determina-se a temperatura a que uma série contínua de bolhas se desprende do capilar ou a temperatura a que a série de bolhas se interrompe quando haja um resfriamento momentâneo e o fluido começa abruptamente a subir no capilar (Siwoloboff).

1.4.5. *Detecção fotoeléctrica*

Seguindo o princípio de Siwoloboff, a ascensão das bolhas permite uma medição fotoeléctrica automática.

1.5. **Critérios de qualidade**

São indicadas no quadro I a aplicabilidade e a precisão dos diferentes métodos utilizados para a determinação do ponto de ebulição/intervalo de ebulição.

1.6. **Descrição dos métodos**

As técnicas de alguns métodos de ensaio são descritas em normas internacionais (ver apêndice).

1.6.1. *Ebuliómetro*

Ver apêndice.

1.6.2. *Método dinâmico*

Ver o método de ensaio A.4 para a determinação da pressão do vapor. É registada a temperatura de ebulição a 101,325 kPa.

1.6.3. *Método de destilação (intervalo de ebulição)*

Ver apêndice.

QUADRO 1: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS

Métodos de medição	Precisão aproximada	Observações
Ebuliómetro	± 1,4 K (até 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (acima de 373 K) (1) (2)	Norma existente ASTM D 1120-72 (1)
Método dinâmico	± 0,5 K (2)	
Método da destilação (intervalo de ebulição)	± 0,5 K	Exemplos de normas existentes ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Método de Siwoloboff	± 1 K a ± 2 K (2)	
Detecção fotoeléctrica	± 0,3 K (a 373 K) (2)	

(1) Esta precisão é válida somente para os aparelhos simples como o decrito na norma ASTM D 1120-72; é possível melhorá-lo utilizando ebuliómetros mais aperfeiçoados.

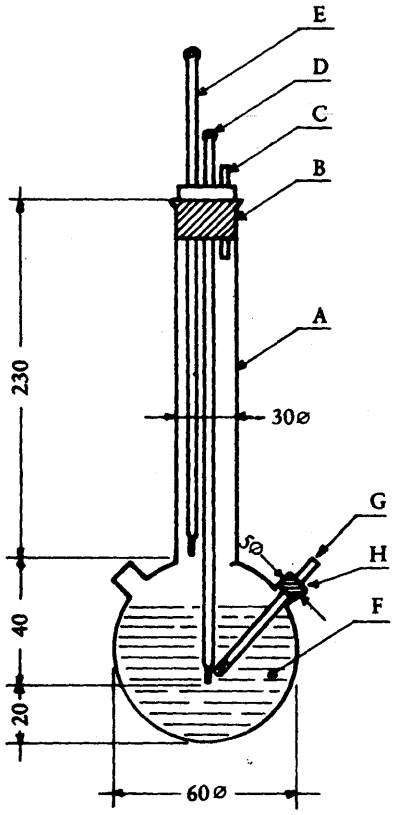
(2) Válido somente para substâncias puras.

1.6.4. *Método de Siwoloboff*

Introduzir a amostra num tubo de ensaio de cerca de 5 mm de diâmetro aquecido num aparelho que serve para a determinação do ponto de fusão (ver figura 1).

A figura 1 exemplifica um aparelho normalizado que serve para determinar o ponto de fusão e o de ebulição (JIS K 0064). As especificações são dadas em milímetros e o aparelho é de vidro.

Figura 1



A: Balão de medida
B: Rolha
C: Tubo de ventilação
D: Termómetro
E: Termómetro auxiliar
F: Banho líquido
G: Tubo de ensaio (diâmetro exterior 5 mm no máximo)
Tubo capilar (dimensões aproximadas:
— comprimento: 100 mm
— diâmetro interior: 1 mm
— espessura da parede: 0,2 a 0,3 mm
H: Tubo lateral

Um tubo capilar (capilar de ebulição), selado a cerca de 1 cm acima da sua extremidade inferior, é mergulhado no tubo de ensaio contendo a substância a testar. A parte selada do capilar deve ficar abaixo da superfície do líquido. O tubo de ensaio contendo o capilar de ebulição deve ser quer apertado ao termómetro com um elástico ou fixado lateralmente com um suporte (fig. 2).

Figura 2

Método de Siwoloboff

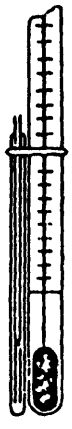
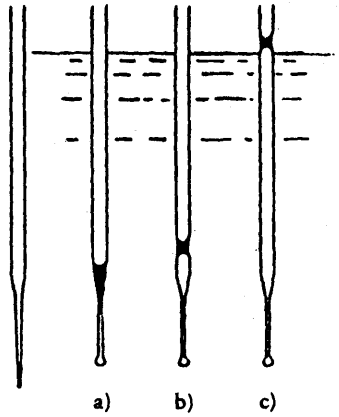


Figura 3

Método alterado



O líquido do banho é escolhido em função da temperatura de ebulição. Pode ser utilizado ácido sulfúrico ou óleo de silicone para temperaturas até 573 K. A utilização de parafina líquida só é conveniente para temperaturas inferiores a 473 K.

De início, o aquecimento do banho deve ser regular de modo a obter-se um aumento de temperatura de 3 K/minuto. É conveniente agitar o líquido do banho. A cerca de 10 K abaixo do presumível ponto de ebulição, o aquecimento é reduzido de tal modo que o aumento da temperatura não ultrapasse 1K/minuto. Na proximidade da temperatura de ebulição, começarão a sair bolhas do capilar.

O ponto de ebulição é definido pela temperatura a que, aquando de um arrefecimento, a fila de bolhas é interrompida e o líquido sobe no capilar. A temperatura lida no termómetro neste preciso momento corresponde à temperatura de ebulição da substância a ensaiar.

No método alterado (fig 3), o ponto de ebulição é determinado num capilar de ponto de fusão. A extremidade inferior deste é esticada numa ponta fina de cerca de 2 cm de comprimento (a) e aspirada para o seu interior uma pequena quantidade da substância a testar. A ponta é então selada de modo a deixar no interior uma pequena bolha de ar na extremidade. Ao aquecer no aparelho de ponto de fusão, a bolha de ar dilata-se (b). O ponto de ebulição corresponde à temperatura a que a amostra da substância atinge o nível da superfície do líquido do banho (c).

1.6.5. *Detecção fotoeléctrica*

A amostra da substância a testar é aquecida num tubo capilar colocado no interior de um bloco metálico aquecido.

Pelas aberturas existentes no bloco, é enviado um feixe de luz através da substância para uma célula fotoeléctrica aferida de modo preciso. Durante o aumento de temperatura da amostra, escapam-se algumas bolhas de ar do capilar de ebulição. Quando a temperatura de ebulição é atingida, o número de bolhas aumenta fortemente. A alteração da intensidade luminosa que se segue é registada pela célula fotoeléctrica, a qual envia um sinal de paragem ao indicador de temperatura de um termómetro de resistência de platina colocado no bloco.

Este método é particularmente útil pois permite efectuar determinações inferiores à temperatura ambiente até 253,15 K (− 2O°) e isto sem nenhuma alteração do aparelho. Deve apenas ser colocado numa câmara fria ou num banho refrigerante. As instruções técnicas fornecidas com o aparelho dão todos os pormenores necessários a uma boa execução da determinação do ponto de ebulição.

2. **RESULTADOS**

Para pequenas variações da pressão normal (máx. ± 5 kPa), as temperaturas do ponto de ebulição podem ser corrigidas (T_n) pela equação de Sidney-Young:

$$T_n = T + f_T \times \Delta p$$

sendo,

Δp = (101,325 − p) (atenção ao sinal)

p = pressão barométrica em kPa

f_T = velocidade da variação do ponto de ebulição com a pressão, em K/kPa

T = valor da temperatura de ebulição medida, em K

T_n = valor da temperatura de ebulição corrigida, em K à pressão normal

Os factores de correcção da temperatura (f_T) e as equações para a sua aproximação constam das normas internacionais e nacionais citadas no texto (válidas para numerosas substâncias).

O método DIN 53171, por exemplo, dá as correcções para os solventes contidos em tintas:

QUADRO 2: FACTORES DE CORRECÇÃO DA TEMPERATURA

Temperatura T em K	Factor de correção f_T em K/kPA
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

Deve ser indicado o método utilizado. O ponto de ebulição determinado é a média de pelo menos duas determinações que se situem dentro dos limites de precisão indicados no quadro 1. Caso as determinações não sejam reprodutivas, outros métodos devem ser encarados.

Devem ser indicados os valores determinados dos pontos de ebulição bem como as suas médias e a pressão(ou pressões) em kPa à qual foram efectuadas as determinações.

A pressão deve ser de preferência próxima da pressão normal. Sempre que a ebulição duma substância a ensaiar se efectue numa longa gama de temperatura, este intervalo de ebulição deve constar do relatório.

Serão dadas estimativas em matéria de precisão para todos os resultados.

Devem ser fornecidas todas as informações e observações de interesse para a interpretação dos resultados, nomeadamente no que se refere às impurezas e ao estado físico da substância.

4. REFERÊNCIAS

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C(81) 30 Final.

Apêndice

Para mais detalhes podem consultar-se as seguintes normas:

1. **Ebuliómetro**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine antifreezes

2. **Método da destilação (intervalo de ebulição)**

ISO/R 918	Test method for distillation (distillation yield and distillation range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel fur Anstrichstoffe. Bestimmung des Siedeverlaufes

A.3. DENSIDADE RELATIVA

1. MÉTODO

Os métodos descritos baseiam-se nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

Os métodos de determinação da densidade relativa descritos, aplicam-se às substâncias sólidas e líquidas, qualquer que seja o seu grau de pureza. Os diversos métodos a aplicar estão enumerados no quadro 1.

1.2. Definições e unidades

A densidade relativa (D_4^{20}) dos sólidos ou líquidos é a razão entre a massa de um certo volume da substância a testar, determinada a 20°C, e a massa de igual volume de água, determinada a 4°C. A densidade relativa é um valor abstracto (sem dimensões).

A densidade (p) de uma substância é o quociente da sua massa m pelo seu volume v.

Em unidades SI, a densidade é dada em quilograma por metro cúbico (Kg/m^3).

1.3. Substâncias de referência (1) / (2)

Não é necessária a utilização de substâncias de referência sempre que se estuda uma nova substância.

Devem-se utilizar essencialmente para calibração periódica das técnicas e para permitir a comparação de resultados.

1.4. Princípio dos métodos

São aplicados quatro métodos.

1.4.1. *Métodos de flutuabilidade*

1.4.1.1 Areómetro (para líquidos)

Podem obter-se determinações de densidade suficientemente precisas e rápidas com a ajuda de areómetros flutuantes que permitem deduzir a densidade de um líquido, através da profundidade de imersão lida sobre uma escala graduada.

1.4.1.2 Balança hidrostática (para substâncias líquidas e sólidas)

A diferença entre o peso da amostra medido ao ar e na água pode servir para determinar a sua densidade.

No caso dos sólidos, a densidade medida só é representativa da amostra utilizada. Para determinar a densidade de um líquido, pesa-se um corpo com um volume V conhecido, primeiro ao ar e depois no líquido.

1.4.1.3 Método da esfera imersa (para substâncias líquidas) (3)

Neste método, a densidade de um líquido é determinada a partir da diferença entre os resultados da pesagem desse líquido antes e depois da imersão de uma esfera de volume conhecido no líquido.

1.4.2. *Métodos picnométricos*

Para os sólidos ou líquidos, podem utilizar-se picnómetros de formas variades cujas capacidades são conhecidas. A densidade é calculada a partir da diferença de peso entre o picnómetro cheio e vazio, por um lado, e do seu volume conhecido, por outro.

1.4.3. *Picnómetro de comparação ao ar (para sólidos)*

A densidade de um sólido, qualquer que seja a sua forma pode ser determinada, à temperatura ambiente, com a ajuda de um picnómetro de comparação de gás. O volume duma substância ao ar ou num gás inerte é medido num tubo cilíndrico de volume calibrado variável. Para o cálculo da densidade, é efectuada uma avaliação da massa após a avaliação do volume.

1.4.4. *Densímetro oscilante (4) (5) (6)*

A densidade de um líquido pode ser medida com um densímetro oscilante, isto é um oscilador mecânico em forma de tubo em U, que oscila a uma frequência dependente da sua massa.

A introdução da amostra altera a frequência de ressonância do oscilador. O aparelho deve ser calibrado com 2 substâncias líquidas de densidades conhecidas.

Estas substâncias devem ser escolhidas de modo a que as suas densidades cubram o intervalo de medida.

1.5. **Critérios de qualidade**

Apresenta-se no quadro a aplicabilidade dos diferentes métodos utilizados para a determinação da densidade.

A precisão mencionada na norma ISO refere-se unicamente a substâncias puras.

1.6. **Descrição dos métodos**

As referências das normas citadas em exemplo, que podem ser consultadas para obter detalhes técnicos suplementares constam do apêndice.

Os ensaios devem ser efectuados à temperatura de 20°C e abranger, no mínimo, duas determinações.

2. **RESULTADOS**

Ver normas.

3. **RELATÓRIO DO ENSAIO**

O método ou a norma utilizada será objecto de um relatório.

A densidade relativa (D_4^{20}) deve ser indicada de acordo com a definição do ponto 1.2. ao mesmo tempo que o estado físico da substância a examinar. Devem ser dadas todas as informações e observações relevantes para a interpretação dos resultados, nomeadamente no que diz respeito às impurezas e ao estado físico das substâncias.

QUADRO 1: APLICABILIDADE DOS MÉTODOS

Métodos de medição	Densidade		Viscosidade dinâmica máxima possivel	Observações
	sólida	líquida		
1.4.1.1. Aréometro		×	5 Pa s	ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2. Balanca hidrostática				ISO/R 1185 (A)
a) Sólidos	×			ISO/R 91 et
b) Líquidos		×	5 Pa s	R 758
1.4.1.3. Método da esfera imersa		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Picnómetro				
a) Sólidos	×		500 Pa s	ISO/R 3507
b) Líquidos		×		ISO/R 1183 (B) ISO/R 758
1.4.3. Picnómetro de comparação ao ar	×			DIN 55990 partie 3 DIN 53243
1.4.4. Densímetro oscilante		×	5 Pa s	

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of Physico-chemical Properties. — Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 508.

(3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, Vol. 11, 1979, p. 427-430.

(4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, p. 297-302.

(5) Baumgarten, D. Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen-Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung. Die Pharmazeutische Industrie, Vol. 37, 1975, p. 717-726.

(6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, p. 253-255.

Apêndice

Para mais detalhes técnicos, podem consultar-se as seguintes normas:

1. **Métodos da flutuabilidade**

1.1. *Aréometro*

DIN 12790	Hydrometer: general instructions
ISO 387	
DIN 12791	Part I: Density hydrometers: construction, adjustment and use
	Part II: Density hydrometers: standardised sizes, designation
ISO/R 649	
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 *Balança hidrostática*

Para substâncias sólidas:

ISO R 1183	Method A. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
ASTM-D-792	Specific Gravity and Density of Plastics by Displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Para substâncias líquidas

ISO R 91	ISO R 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density.

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 et ASTM D 1481-62

ASTM D 1298	Density, Specific gravity or API gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method
BS 4714	Density, Specific gravity or API gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method

1.3. *Método da esfera imersa*

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (enlargement for immersed ball method to be published in 1981)

2. **Métodos picnométricos**

2.1. *Para substâncias líquidas*

ISO 3507	Pycnometers
ISO/ R 758	Liquid chemical products: determination fo density at 20°C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ $m^2 s^{-1}$ at 15°C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ $m^2 s^{-1}$ at 20°C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90°C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)

DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products: determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber Products-Chemical Analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for Determination of Specific Gravity and Density of Petroleum Products (Graduated Bicapillary Pycnometer Method)
BP 5903	Method for determination of Relative Density and Density of Petroleum Products by the Capillary-Stoppered Pycnometer Method

2.2 *Para substâncias sólidas*

ISO/R 1183	Methods B: Methods for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics
DIN 19683	Determination of the Density of Soils

3. **Picnómetro de comparação ao ar**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere: Prüfung

A.4. PRESSÃO DO VAPOR

1. MÉTODO

Os métodos descritos são baseados nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

É desejável dispor de informações referentes à estrutura, ao ponto de fusão e ao ponto de ebulição da substância, antes de proceder a este ensaio.

Não existe qualquer método que seja aplicável a toda a gama de pressões de vapor. Por isso, são recomendados vários métodos que vão de $< 10^{-3}$ Pa a 10^5 Pa.

De um modo geral, as impurezas têm incidência sobre a pressão de vapor. A influência das impurezas sobre a determinação depende em grande parte da sua natureza. Este facto pode ser relevante se se encontrar presente na amostra um solvente altamente volátil.

1.2. Definições e unidades

A pressão de vapor de uma substância é a pressão de saturação exercida sobre uma substância sólida ou líquida. No equilíbrio termodinâmico, a pressão de vapor duma substância pura é unicamente função da temperatura.

A unidade SI de pressão que deve ser utilizada é o Pascal (Newton/m^2).

Unidades correntes utilizadas antigamente e seus factores de conversão são:

1 Torr (mm Hg) = $1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 atmosfera (física, atm) = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 atmosfera (técnica, at) = $9{,}81 \times 10^4$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

A unidade SI de temperatura é o grau Kelvin (K).

1.3. Substâncias de referência

Não é necessário a utilização, em todos os casos, de substâncias de referência no estudo de uma nova substância. Estas substâncias devem servir para verificar periodicamente a credibilidade do método e permitir comparar os resultados obtidos por outro método.

1.4. Princípio dos métodos

Propõem-se cinco métodos de determinação da pressão de vapor que são aplicáveis às diferentes gamas de pressão de vapor. Em cada um, a pressão de vapor é determinada a diferentes temperaturas. Numa gama limitada de temperaturas, o logaritmo da pressão de vapor duma substância pura é uma função linear do inverso da temperatura.

1.4.1. *Método dinâmico*

O método dinâmico é baseado na medida da temperatura de ebulição que corresponde a uma pressão específica.

Gama recomendada: de 10^3 Pa até 10^5 Pa; entre 20°C e 100°C.

O presente método é também recomendado para a determinação, de pontos de ebulição que não ultrapassem 350°C.

1.4.2 *Método estático*

Neste processo, a pressão de vapor que se estabelece num sistema fechado em equilíbrio termodinâmico, é determinado a uma temperatura específica.

É aplicável ãos sólidos e líquidos que contêm um ou mais componentes.

Gama recomendada: de 10 Pa até 10^5 Pa; entre 0°C e 100°C.

1.4.3. *Isoteniscópio*

Este método normalizado é também um método estático, mas não é usualmente adaptável a sistemas com vários componentes. Existe informação adicional na norma ASTM D-2879-75.

Gama recomendada:

de 100 Pa a 10^5 Pa, entre 0°C e 100°C.

1.4.4. *Balança de pressão de vapor*

Neste método determina-se a quantidade de substância vaporizada de uma célula-reservatório por unidade de tempo, através de um orifício de tamanho conhecido, sob pressão reduzida, de forma a que seja desprezável a quantidade de substância que regressa à célula (por ex., por medida do impulso imprimido a uma balança sensível pelo jacto de vapor ou por medida da perda de peso da célula-reservatório).

Gama recomendada:

de 10^{-3} Pa até 1 Pa; entre 0°C e 100°C.

1.4.5. *Método da saturação de gases*

É enviada uma corrente de gás portador inerte através da substância de modo a que ele saia carregado de vapor saturante. Este vapor é em seguida recolhido num colector adequado para o efeito. A determinação da quantidade de substância transportada para um volume conhecido de gás portador, permite calcular a pressão de vapor a uma determinada temperatura.

Gama recomendada:

até 1 Pa.

1.5. **Critérios de qualidade**

O quadro seguinte apresenta uma comparação dos diferentes métodos de determinação da pressão de vapor, quanto a repetibilidade, reprodutibilidade, gama de medidas e normalização existente.

QUADRO: CRITÉRIO DE QUALIDADE

Método de medição	Substância		Estimativa de repetibilidade (1)	Estimativa de reprodutibilidade (1)	Gama recomendade	Normalização existente
	sólida	liquida				
1.4.1. Método dinâmico		×	até 25 %	até 25 %	De 10^3 Pa à $2 \cdot 10^3$ Pa	—
			1—5 %	1—5 %	De $2 \cdot 10^3$ Pa à 10^5 Pa	—
1.4.2. Método estático	×	×	5—10 %	5—10 %	De 10 Pa à 10^5 Pa	—
1.4.3. Isoteniscópio	×	×	5—10 %	5—10 %	De 10^2 Pa à 10^5 Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Balança de pressão de vapor	×	×	5—20 %	até 50 %	De 10^{-3} Pa à 1 Pa	—
1.4.5. Método da saturação de gases	×	×	10—30 %	até 50 %	De $< 10^{-3}$ Pa até 1 Pa	—

(1) Depende do grau de pureza.

1.6. Descrição dos métodos

1.6.1. *Método dinâmico*

1.6.1.1 Aparelho

O aparelho de medida consiste num recipiente de refluxo com refrigerante em vidro ou metal (ver fig. 1), num dispositivo de regulação e de medida da temperatura, bem como num aparelho de regulação e de medição da pressão. O aparelho de medição representado no esquema é em vidro e compõe-se de cinco partes principais:

Um tubo de parede parcialmente dupla, com junta normalizada, um refrigerante, um recipiente de arrefecimento e um orificio de admissão.

Um cilindro em vidro ligado a uma bomba Cottrell, que é montado sobre a secção do tubo onde se efectua a ebulição e que possui uma superfície rugosa para evitar ressaltos da ebulição.

Um termopar ou um termómetro de resistência mergulhado numa pequena quantidade de óleo, inserido num tubo de carga equipado com junta normalizada macho na sua extremidade superior e selado na extremidade inferior e que permite a medição da temperatura.

Uma tubuladura que permite ligar o dispositivo de regulação e de medição da pressão.

Um volume-tampão que é ligado ao aparelho de medição por intermédio de um tubo capilar.

Um elemento de aquecimento que é inserido do exterior pelo fundo do aparelho em vidro para aquecer a coluna de ebulição. A energia necessária é obtida por meio de um transformador-regulador e controlada por um amperímetro.

Uma bomba de óleo que permite obter o vácuo desejado (entre 10^2 e 10^5 Pa aproximadamente).

Uma garrafa de azoto utilizada para obter a pressão desejada é ligada ao aparelho por intermédio de uma válvula e serve também para ventilar o aparelho.

Um medidor de pressão de precisão, ligado à tubuladura permite efectuar as medições.

1.6.1.2. Processo de medição

Mede-se a pressão de vapor determinando o ponto de ebulição da amostra a várias pressões, de aproximadamente 10^3 Pa a 10^5 Pa.

O ponto de ebulição (ou o equilíbrio no caso de mistura) é atingido desde que a temperatura permaneça constante (para uma dada pressão). Este processo não é aplicável às substâncias que espumam.

Antes da medição, todos os elementos de vidro do aparelho devem ser cuidadosamente limpos e secos e depois evacuados. A substância é então introduzida no aparelho. Quando os sólidos não estão em pó, o enchimento pode trazer problemas. No entanto é possível remediá-los aquecendo a água da manga de arrefecimento. Após o enchimento, o aparelho é montado e a substância desgaseificada. É estabelecida a mais baixa pressão desejada, o sistema de aquecimento é posto a funcionar e o termopar ou o termómetro de resistência é ligado a um registador. Logo que este indique uma temperatura de ebulição fixa à pressão constante, o equilíbrio é atingido. Após o registo do ponto deste equilíbrio, estabelece-se uma pressão mais elevada. 0 processo prossegue da mesma forma até que seja atingida uma pressão de 10^5 Pa num total de cerca de 5 a 10 medições, que serão repetidas a pressões decrescentes para verificação.

1.6.2. *Método estático*

1.6.2.1 Aparelho

O aparelho de medição (fig. 2) comporta não só um sistema de aquecimento e um sistema de arrefecimento de vidro e de metal para levar a amostra à temperatura desejada, mas também um dispositivo de regulação e de medida da pressão e da temperatura.

A célula que contém a amostra é ligada, por um lado, à torneira de vácuo em aço inoxidável e, por outro, a um tubo em U cheio de um líquido manométrico adequado. A outra extremidade do tubo em U, termina numa tubuladura de três braços que conduzem, respectivamente,à bomba de vácuo, à garrafa de azoto e ao medidor de pressão.

Para levar uma amostra à temperatura desejada, a célula-reservatório assim como o corpo da torneira e uma secção suficientemente importante do tubo em U (praticamente até à altura da torneira) são mergulhados num banho a temperatura constante. A temperatura é medida e registada por meio dum termopar ou dum termómetro de resistência, colocado próximo do exterior da célula.

Sempre que a amostra precise de ser fortemente arrefecida, utiliza-se azoto líquido, ou uma mistura de neve carbónica e álcool. Neste caso as medições são efectuadas com a ajuda de um ultracrióstato.

Uma bomba adequada permite evacuar o aparelho à pressão desejada.

A pressão de vapor de uma substância é em geral medida indirectamente com a ajuda de um indicador de zero. Este indicador pode ser um tubo em U que contenha um líquido, como é seguidamente descrito, ou, por exemplo, um manómetro de membrana. No banho à temperatura controlada, a pressão de vapor destrói o equilíbrio do líquido contido no tubo em U. Restabelece-se o equilíbrio da pressão por introdução de azoto no aparelho. O medidor de precisão, que se encontra à temperatura ambiente, permite medir a pressão do azoto utilizado, a qual corresponde à pressão de vapor da substância à temperatura constante correspondente. Podem ser utilizados no tubo em U diferentes líquidos (mercúrio, óleos de silicone ou ftalatos), segundo a gama de pressões e o comportamento químico da substância, na regulação do zero.

O mercúrio pode ser utilizado para a pressão atmosférica até 10^2 Pa e os óleos de silicone e os ftalatos de 10^2 Pa a 10 Pa; quanto ao manómetro de membrana, este pode ser utilizado para pressões inferiores a 10^{-1} Pa.

1.6.2.2. Métodos de medição

Antes da medição, todos os componentes do aparelho (esquematizado na figura 2), são cuidadosamente limpos com o auxilio de solventes e secas sob vácuo.

O tubo em U é cheio com o líquido desejado que deve ser previamente desgaseificado a temperatura elevada.

Após a introdução da substância a testar, o aparelho é ligado e a célula é suficientemente arrefecida. A torneira é então aberta e estabelecido o vácuo no aparelho. Após alguns minutos a torneira é fechada, a amostra levada à temperatura desejada e o desvio das colunas de líquido do tubo em U compensado pela introdução de azoto. Então a célula é novamente arrefecida. Qualquer pressão residual observada resultante deste arrefecimento deve-se, quer à presença de uma certa quantidade de ar libertado pela amostra durante o aquecimento (este pode ser eliminado fazendo novamente o vácuo na célula), quer a um arrefecimento insuficiente. Por isso, é necessário utilizar azoto liquido como refrigerante.

Quando a amostra estiver suficientemente desgaseificada, a dependência da pressão de vapor em relação à temperatura, é determinada em intervalos curtos de temperatura.

1.6.3. *Isoteniscópio*

Uma descrição completa deste método encontra-se na referência (2). Para o princípio do aparelho de medida veja-se a figura 3. A semelhança do método estático descrito no ponto 1.6.2, o isoteniscópio é aplicável aos sólidos e líquidos.

No caso dos líquidos, a própria substância serve de líquido de enchimento do manómetro auxiliar. No caso dos sólidos, escolhe-se um dos manómetros líquidos citados no ponto 1.6.2, tendo em conta as gamas de pressões e temperaturas exigidas. A esfera do isoteniscópio para líquidos é cheia com a substância que é desgaseificada a temperatura elevada durante a ebulição.

A fracção da substância que é destilada durante a desgaseificação e condensada na esfera superior arrefecida, vai depois cair no tubo em U. Sempre que este contenha uma quantidade suficiente de substância desgaseificada é mergulhado com a esfera inferior num banho termostatisado. Quando a temperatura desejada é atingida, a pressão de vapor resultante é medida de forma indirecta tal como no método descrito no ponto 1.6.2.

No caso dos sólidos, a ampola do lado da extremidade mais longa do isoteriscópio é cheia com o líquido desgaseificado do manómetro. O sólido é em seguida introduzido na esfera inferior e desgaseificado a temperatura elevada. O isoteriscópio é então inclinado de tal modo que o líquido manométrico possa correr para o tubo em U. A medição da pressão de vapor em função da temperatura é feita de acordo com a descrição apresentada no ponto 1.6.2.

1.6.4. *Balança de pressão de vapor*

1.6.4.1. Aparelho

A literatura descreve vários modelos deste aparelho (1). O aparelho representado na figura 4 ilustra bem o princípio deste método. Compõe-se de um prato de base encimado por uma compânula de protecção, duma bomba com dispositivo de medida para vácuo e dum equipamento de determinação de pressão de vapor com fixação do desvio da agulha. 0 equipamento a seguir descrito é montado sobre o prato de base:

— um forno de evaporação com manilha e canal de alimentação rotativo. Trata-se de um recipiente plano e cilíndrico em cobre (ou por vezes em vidro reforçado com cobre), que é colocado num estribo em cobre aparafusado numa peça de aço inoxidável à altura do seu bordo saliente inferior. A peça de aço inoxidável também é directamente montada no prato de base com a ajuda de um elo de modo a poder rodar em torno do eixo do forno. O aquecimento é produzido por uma resistência encastrada na peça de aço inoxidável, e assim, isolada da câmara de vácuo,

— a tampa do forno é em cobre e tem três orifícios de evaporação de secções diferentes, situados a 90° uns dos outros. Por rotação do forno, podem-se colocar o orifício escolhido ou uma posição intermédia sob a fenda do refrigerante, disposto excentricamente em relação ao forno, o que permite centrar o feixe molecular sobre o prato da balança ou desviá-lo. É montado um termopar ou termómetro de resistência sobre a parede do forno para medição da temperatura,

— a balança é um instrumento de bobina móvel. A agulha é substituída por um pequeno tubo sobre o qual são montados o travessão e os contrapesos. O travessão possui um prato substituível constituído por uma fina placa de alumínio revestida de ouro. E ligado um fio de constante com uma espessura de 0,1 mm, aproximadamente no centro do travessão sobre o qual é possível colocar os pesos padrões. A pressão de vapor pode ser registada por um método fotoeléctrico de registo do ponto zero,

— um cilindro em latão rodeia o prato da balança, com excepção das duas fendas, permitindo assim o movimento do travessão e de uma abertura estreita para a entrada do feixe molecular. A dissipação do calor para o exterior é assegurada por uma barra de cobre, que parte do cimo do cilindro e atravessa o prato de base através de um tubo de aço inoxidável termicamente isolado.A barra mergulha num vaso de Dewar,que contém azoto líquido, sob o prato de base.

1.6.4.2. Método de medição

O forno de cobre é enchido com a substância e a tampa é fechada; o orifício do prato, a protecção e o refrigerante são dispostos sobre o forno. A campânula é posta no lugar e as bombas de vácuo ligadas. A pressão a obter antes do início da medição é de cerca de 10^{-4} Pa; a partir de 10^{-2} Pa começa o arrefecimento do recinto de refrigeração.

A balança atinge, após algum tempo, uma temperatura suficientemente baixa para que o jacto de vapor que sai se condense sobre o prato da balança. Esta condensação produz um sinal no registador ligado à balança. Este sinal pode ser utilizado de duas maneiras diferentes: no que se refere ao aparelho aqui descrito, a pressão do vapor é determinada a partir da pressão exercida sobre o prato da balança (não é necessária a massa molecular). Simultaneamente, é determinada a massa condensada e, por consequência, pode ser calculada a velocidade de evaporação a partir do tempo de deposição. Isto é válido para os aparelhos mais comuns. A pressão do vapor pode então ser calculada a partir da velocidade de evaporação e da massa molecular através da fórmula de Hertz:

$$p = G \sqrt{\frac{2 \pi RT \times 10^3}{M}}$$

em que,

G = velocidade de evaporação (kg/s.m^2)

M = massa molecular (g/mol)

T = temperatura (K)

R = constante molar universal dos gases perfeitos (J/mol. K)

p = pressão de vapor (Pa).

Logo que o vácuo necessário é atingido, é feita uma série de medições à mais baixa das temperaturas escolhidas. É aberto o orifício necessário, o jacto de vapor atravessa a protecção directamente montada acima da cobertura e vem embater no prato arrefecido da balança. Este é dimensionado de forma a que o jacto seja totalmente recolhido. Sob a acção do momento do jacto de vapor, exerce-se uma força sobre o prato onde as moléculas se condensam em contacto com a superfície fria. Esta força faz desviar o travessão da balança da sua posição de equilibrio. Na extremidade do travessão há uma lamela que é observada opticamente com a ajuda de um prisma e de dois fotodíodos.

Um circuito de controlo regula e conduz então momentaneamente o travessão à posição de equilíbrio. O binário necessário é registado e corresponde, após uma aferição com a ajuda dos pesos, à pressão de vapor da substância.

Para as medições seguintes, a temperatura é aumentada a pequenos intervalos até ser atingido o valor mais alto escolhido. A amostra é então novamente arrefecida, podendo ser registada uma segunda curva de pressão de vapor. As duas séries de medições só são reprodutíveis se a substância for suficientemente pura. Se a terceira tentativa não confirmar os resultados da segunda, é possível que a substância se decomponha às temperaturas escolhidas para a determinação.

1.6.5. *Método da saturação de gases*

1.6.5.1 Aparelho

O aparelho utilizado neste método compreende um certo número de elementos que estão esquematizados na figura 5 e que são a seguir descritos (1).

Gás inerte: o gás portador não deve reagir com a substância do ensaio.

O azoto serve para a maioria dos casos, mas outros gases podem ser utilizados, devendo ser, no entanto, sempre utilizados secos (figura 5, nº 4: sonda de humidade relativa).

Controlo do fluxo gasoso: é indispensável um sistema adequado para assegurar um fluxo constante e suficiente através da coluna de saturação.

Colectores de vapor: a sua escolha depende das características da amostra assim como do método de análise utilizado. O vapor deve ser recolhido quantitativamente e de forma a permitir a análise posterior. Utilizam-se para certas substâncias colectores, que contenham líquidos tais como o hexano ou o etilenoglicol. Para outros, recorre-se a absorventes sólidos.

Permutador de calor: pode ser necessário para determinações a diferentes temperaturas.

Coluna de saturação: após ter sido posta em solução, a substância é repartida num suporte inerte e em seguida introduzida na coluna de saturação. As dimensões desta e a velocidade de escoamento devem ser escolhidas de modo a assegurar a saturação completa do gás portador. A coluna também deve ser termostatizada. Para as determinações que se efectuem a temperaturas superiores a 20°C, o espaço entre as colunas e os colectores deve ser aquecido para impedir a condensação da substância.

1.6.5.2. Método de medição

Preparação da coluna de saturação:

Após ter sido posta em solução num solvente volátil, a substância de ensaio é adicionada a uma dada quantidade do material de suporte. A quantidade de substância adicionada deve ser suficiente para manter a saturação durante todo o tempo do ensaio. O solvente é completamente evaporado ao ar ou num evaporador rotativo e o material bem homogeneizado é introduzido na coluna. Uma vez a amostra termostatizada, faz-se passar uma corrente de azoto através do aparelho.

Medição:

Os colectores são ligados aos tubos de saída da coluna, e o tempo é registado. O caudal é controlado no início da experiência e a intervalos regulares, através de um conta-bolhas (ou ainda continuamente, com a ajuda de um fluxómetro mássico).

É necessário medir a pressão à saída da coluna de saturação:

a) Quer intercalando um medidor de pressão entre o saturador e os colectores (isto devido ao aumento do espaço morto e à superfície de absorção);

b) Quer determinando as baixas de pressão através dos colectores utilizados em função do débito numa experiência separada (este método pode revelar-se pouco satisfatório para os colectores de líquidos).

O tempo que é preciso para recolher a quantidade de substância necessária nos diferentes métodos de análise é determinado durante ensaios preliminares ou por estimativa. Antes de calcular a pressão de vapor a dada temperatura, convém efectuar ensaios preliminares para determinar o débito máximo que saturará completamente o gás portador com o vapor da substância. Para isso é necessário que o gás portador passe pelo saturador com lentidão suficiente, de forma a que nenhuma velocidade inferior forneça uma pressão de vapor calculada mais elevada.

A escolha do método de análise será feita em função da natureza da substância a testar (por exemplo, cromatografia em fase gasosa ou gravimetria).

É calculada a quantidade de substância transportada num volume conhecido de gás portador.

1.6.5.3. Cálculo da pressão de vapor

A pressão de vapor é calculada a partir da densidade do vapor (m/V), através da equação seguinte:

$$p = \frac{m}{V} \times \frac{RT}{M}$$

em que,

p = pressão de vapor (Pa)

m = massa da substância absorvida (g)

V = volume de gás saturado (m^3)

R = constante molar universal dos gases perfeitos (J/mol. K)

T = temperatura (K)

M = massa molecular (g/mol)

Os volumes medidos devem ser corrigidos para se ter em conta as diferentes pressões e a temperatura entre o fluxómetro e o saturador termostatizado. Se o fluxómetro é colocado a seguir ao colector de vapor, podem ser necessárias correcções para se ter em conta a evaporação eventual de produtos contidos nos colectores (1).

2. RESULTADOS

Qualquer que seja o método escolhido, a pressão do vapor deve ser determinada no mínimo a duas temperaturas. São preferíveis três ou mais valores de temperatura entre 0°C e 50°C para verificar a linearidade da curva de pressão de vapor.

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

Se possível, incluir no relatório, as especificações seguintes:

— descrição da substância (identificação e impurezas),

— no mínimo dois valores para a pressão de vapor e para a temperatura, de preferência entre 0°C e 50°C. Devem ser igualmente incluídos todos os valores medidos e uma curva log p em função de 1/T. E ainda necessária uma estimativa da pressao de vapor a 20°C ou a 25°C,

Em caso de transição (mudança de estado, decomposição) deve indicar-se o seguinte:

— descrição da alteração,

— temperatura à qual aquela ocorre à pressão atmosférica,

— pressão de vapor a 10°C e a 20°C abaixo da temperatura de transição assim como a 10°C e a 20°C acima daquela temperatura (excepto na transição do estado sólido ao estado gasoso).

Devem ser assinaladas todas as informações e notas úteis para a interpretação dos resultados.

Deve ser especificado o método utilizado.

4. REFERÊNCIAS

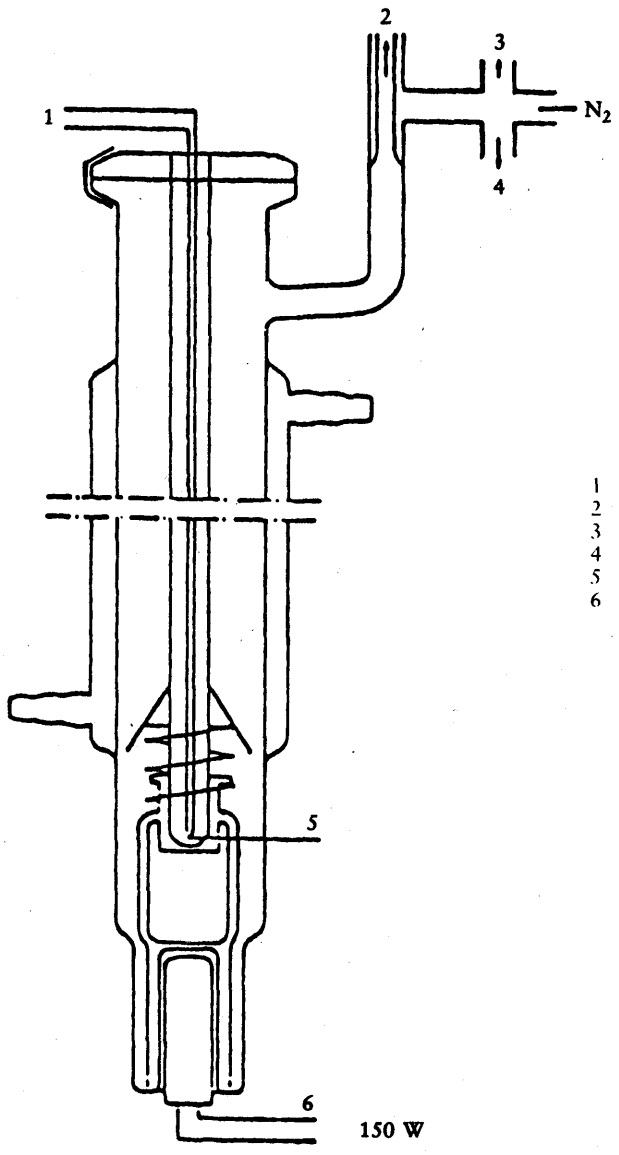
(1) OECD Paris, 1981, Test Guideline 104. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OECD Paris, 1981, Test Guideline 104. ref. (4). Decision of the Council C (81) 30 Final.

Apêndice

Figura 1

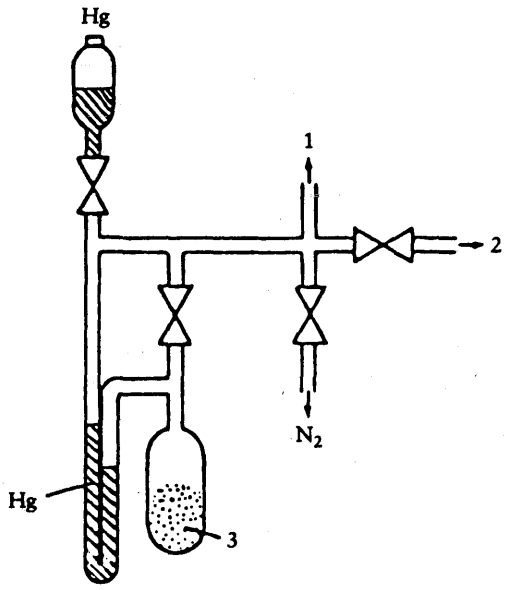
Aparelho para medição da pressão de vapor, segundo o método dinâmico



1 = Termopar
2 = Volume tampão
3 = Medidor de pressão
4 = Vácuo
5 = Ponto de medição
6 = Elemento aquecido a cerca de 150 W

Figura 2

Aparelho para medição da pressão de vapor, segundo o método estático

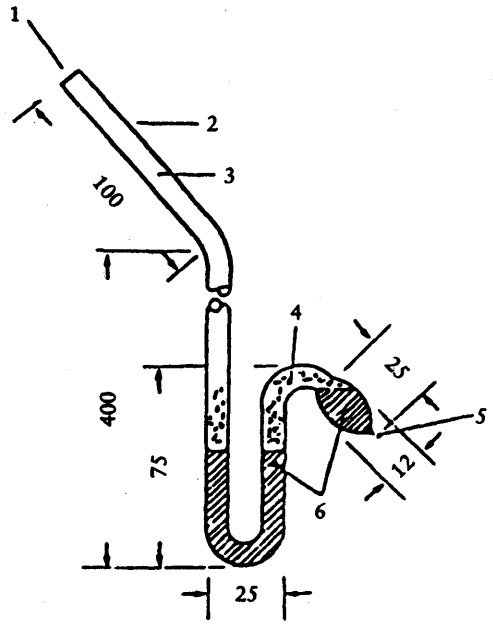


1 = Medidor de pressão
2 = Vácuo
3 = Amostra

Figura 3

Isoteniscópio

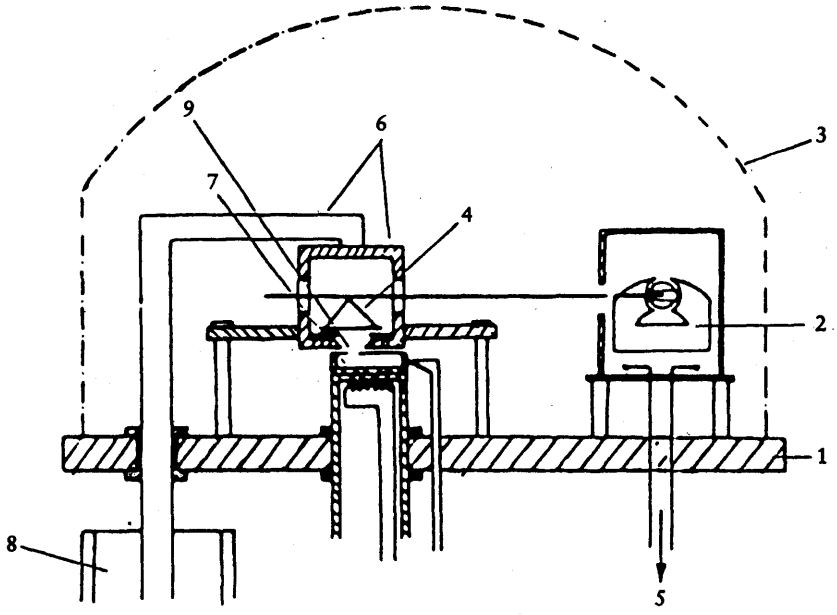
Referência (2)



1 = Sistema de medição e controlo da pressão
2 = Tubo com diâmetro exterior de 8 mm
3 = Azoto seco no sistema de pressão
4 = Vapor da amostra
5 = Pequena ponta
6 = Amostra líquida

Figura 4

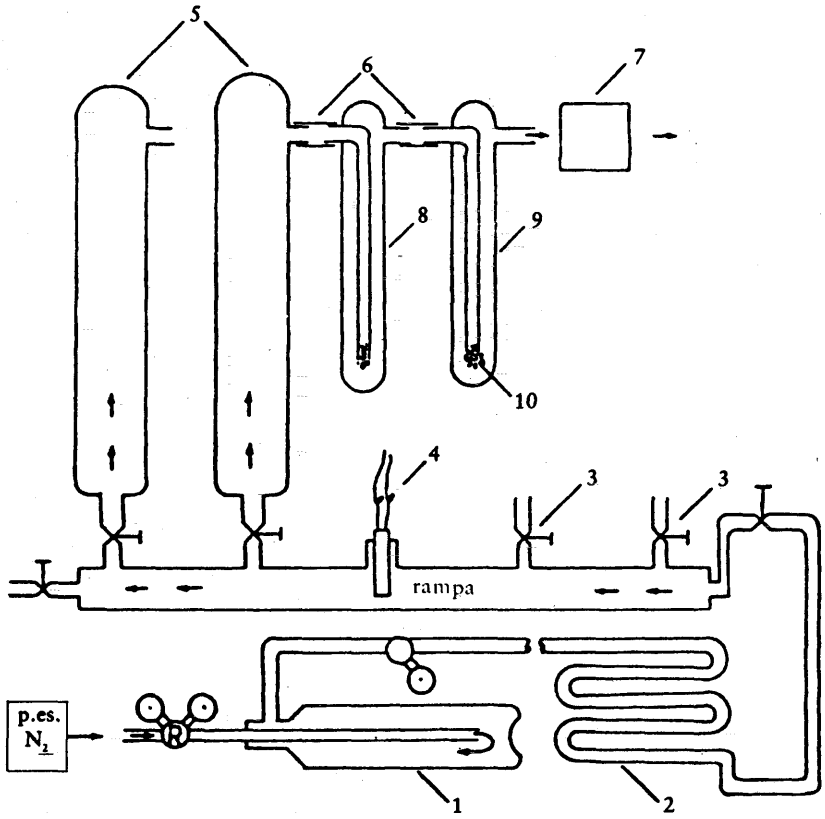
Aparelho para determinação da curva da pressão do vapor, segundo o método da balança de pressão de vapor



1 = Prato de base
2 = Instrumento de bobina móvel
3 = Campânula de protecção
4 = Balanca de prato
5 = Dispositivo para medição do vácuo
6 = Recipiente de refrigeração e barra de arrefecimento
7 = Forno de evaporação
8 = Dewar contendo azoto líquido
9 = Protecção

Figura 5

Modelo de aparelho que serve para a determinação da pressão de vapor, pelo método da saturação de gases



1 = Regulador de fluxo
2 = Permutador de calor
3 = Válvulas de agulha
4 = Sonda de humidade relativa
5 = Colunas de saturação
6 = Juntas em PTFE
7 = Fluxómetro
8 = Colector (absorvente)
9 = Colector (óleo)
10 = Borbulhador de placa porosa de bolhas de gás

A.5. TENSÃO SUPERFICIAL

1. MÉTODO

Os métodos descritos baseiam-se nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

Os métodos descritos aplicam-se à determinação da tensão superficial de soluções aquosas.

Antes de se efectuarem estes ensaios, é útil possuir sobre a substância informações preliminares quanto à solubilidade na água, à estrutura, às propriedades na hidrólise e à concentração crítica de formação de micelas.

Os métodos seguintes aplicam-se à maioria das substâncias químicas, qualquer que seja o seu grau de pureza.

A determinação da tensão superficial pelo método do tensiómetro de anel é limitada às soluções aquosas que tenham uma viscosidade dinâmica inferior a cerca de 200 m Pa s.

1.2. Definições e unidades

A entalpia livre de superfície por unidade de superfície é designada por tensão superficial. Esta exprime-se por:

N/m (unidades do SI)

mN/m (subunidade do SI)

$1 N/m = 10^3$ dines/cm

1mN/m = 1 dine/cm no sistema CGS cuja utilização não é autorizada.

1.3. Substâncias de referência

Não é necessário utilizar substancias de referência em todos os casos em que se estuda uma nova substância. É principalmente na aferição periódica do método e na comparação dos resultados quando outro método é aplicado que ele é necessário.

São dadas substâncias de referência cobrindo uma vasta gama de tensões superficiais nas referências (1) e (2).

1.4. Princípio dos métodos

Os métodos são baseados na medição da força máxima que é necessario exercer verticalmente sobre um estribo ou um anel em contacto com a superfície do líquido a estudar, colocado em recipiente adequado de forma a separá-lo desta superfície, ou sobre uma placa, com um dos bordos em contacto com a superfície, a fim de assegurar o levantamento da película formada.

1.5. Critérios de qualidade

Os métodos dão uma maior precisão do que a provavelmente necessária para o controlo da protecção do ambiente.

1.6. Descrição dos métodos

1.6.1. *Método da placa*

Ver ISO 304 (substâncias tensioactivas — determinação da tensão superficial por arrancamento das películas líquidas).

1.6.2. *Método do estribo*

Ver ISO 304 (substâncias tensioactivas — determinação da tensão superficial pelo método do arrancamento das películas líquidas).

1.6.3. *Método do anel*

Ver ISO 304 (substâncias tensioactivas — determinação da tensão superficial por levantamento das películas líquidas).

1.6.4. *Método do anel harmonizado OCDE*

1.6.4.1. Aparelho

Os tensiómetros comerciais são adequados. São constituídos pelos seguintes elementos:

— porta-amostra móvel,

— dinamómetro,

— corpo de medição (anel),

— recipiente de medida.

1.6.4.1.1. Porta-amostra móvel.

Este serve de suporte ao recipiente de medição termostatizado, que contém o líquido a ensaiar. E montado sobre o mesmo suporte que o dinamómetro.

1.6.4.1.2. Dinamómetro.

Este (ver figura) é colocado sobre o porta-amostra. O erro na determinação da força não deve exceder $\pm 10^{-6}$ N, o que equivale a um limite de erro de ± 0,1 mg na determinação da massa. Na maioria dos casos, a escala de medidas dos tensiómetros disponíveis no comércio é calibrada em mN/m, podendo então ler-se directamente a tensão superficial em mN/m com uma precisão de 0,1 mN/m.

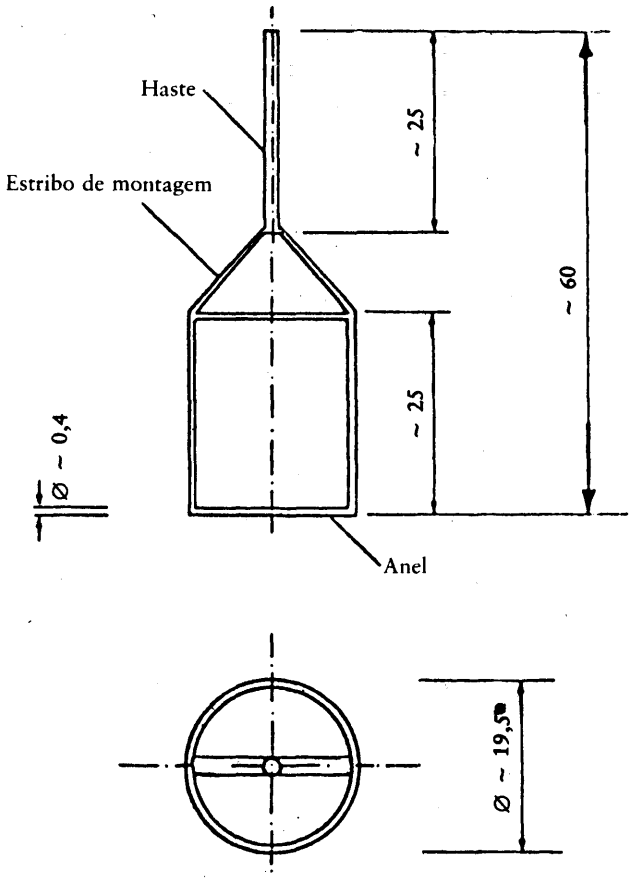
1.6.4.1.3. Corpo de medida (anel)

O anel é habitualmente constituído por um fio de platina ou de platina-irídio de cerca de 0,4mm de espessura e um perímetro médio de 60 mm. Este anel é suspenso horizontalmente do estribo de montagem que é ligado por uma haste metálica ao dinamómetro (ver figura).

Figura

Corpo de medição

(todas as dimensões são expressas em milímetros)



1.6.4.1.4. Recipiente de medida

Este contém a solução a testar e deve ser um recipiente em vidro termostatizado. Deve ser concebido de modo a que durante a determinação, a temperatura do líquido e da fase gasosa acima da sua superfície, se mantenha constante e que não haja evaporação. Recipientes cilíndricos de vidro de diâmetro interior mínimo de 45 mm, satisfazem estas exigências.

1.6.4.2. Preparação do aparelho

1.6.4.2.1. Limpeza

Os recipientes de vidro devem ser limpos com cuidado. Quando for necessário, devem ser lavados com uma mistura sulfocrómica, depois com ácido fosfórico xaroposo (83 a 98 % em peso de H_3PO_4), passados abundantemente por água corrente e em seguida com água destilada, até terem uma reacção neutra, por fim são secos ou lavados com uma pequena porção do líquido em estudo.

O anel será em primeiro lugar lavado abundantemente com água corrente para eliminar todos os vestígios de substâncias solúveis em água, mergulhado alguns segundos na mistura sulfocrómica, passado com água bidestilada até se obter uma reacção neutra e por fim, rapidamente secos à chama de metanol.

Nota:

Os vestígios de substâncias que não são dissolvidas ou destruídas pela mistura sulfocrómica ou pelo ácido fosfórico, como os silicones, devem ser eliminados com a ajuda de um solvente orgânico adequado.

1.6.4.2.2. Aferição do aparelho

A aferição do aparelho consiste em verificar o zero e em regulá-lo de modo a que a indicação dada pelo aparelho permita uma determinação fidedigna em mN/m.

Montagem:

O aparelho será nivelado, por exemplo, usando um nível de bolha de ar colocado sobre o suporte, ajustando o parafuso de regulação.

Regulação do ponto zero:

Após montagem do anel no aparelho e antes da sua imersão no líquido, o indicador do tensiómetro deve ser regulado a zero; verifica-se o paralelismo do anel utilizando a superfície do líquido como espelho.

Aferição:

A aferição do aparelho pode ser efectuada por um dos métodos seguintes:

a) Com a ajuda de uma massa: este processo utiliza cavaleiros de massa conhecida (entre 0,1g e 1,0g) que são colocados sucessivamente sobre o anel. O factor de aferição Φ_a, pelo qual se multiplicam todas as leituras do instrumento, será determinado pela equação (1).

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

em que,

$\sigma_r = \frac{m.g}{2b}$ (mN/m)

m = massa de cavaleiro (g)

g = aceleração da gravidade (981 $cm.s^{-2}$ do nível do mar)

b = perímetro médio do anel (cm)

σ_a = leitura do tensiómetro após colocação do cavaleiro no anel (mN/m);

b) Com a ajuda de água: este processo utiliza água pura cuja tensão superficial é, por exemplo, de 72,3 mN/m a 23°C. É mais rápido do que a aferição com os cavaleiros, mas comporta sempre o risco de que a tensão superficial da água seja alterada pelos vestígios de substâncias tensioactivas.

O factor de aferição Φ_b, pelo qual é necessário multiplicar todas as leituras do aparelho, determina-se pela equação (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

σ_o = valor dado na literatura para a tensão superficial da água (mN/m) à temperatura escolhida para o ensaio.

σ_b = valor medido da tensão superficial da água (mN/m) a essa mesma temperatura.

1.6.4.3. Preparação das amostras

As soluções aquosas das substâncias são preparadas tendo em conta as concentrações requeridas. É imprescindível que a dissolução da substância seja completa.

A solução assim preparada deve ser mantida a uma temperatura constante (± 0,5°C). Tendo em conta que a tensão superficial duma solução colocada no recipiente de medida se altera após certo tempo,

devem ser feitas várias medições em momentos diferentes e é necessário traçar uma curva das tensões superficiais em função do tempo. Quando já não houver alterações, foi atingido o estado de equilíbrio.

A poeira ou os vapores doutras substâncias falseiam a medição. O trabalho deve pois ser efectuado sob campânula de protecção.

1.6.5. *Condições do ensaio*

As medições devem ser feitas a uma temperatura de cerca de 20°C, com variações não superiores a ± 0,5°C.

1.6.6. *Desenvolvimento do ensaio*

Põe-se no recipiente de medida, cuidadosamente limpo, a solução a medir, tendo o cuidado de evitar a formação de espuma; em seguida, o recipiente de medida é colocado sobre o suporte que é elevado até que o anel fique imerso por baixo da superfície da solução. O suporte é então baixado gradual e uniformemente (a uma velocidade de cerca de 0,5 cm/minuto),para retirar o anel da superfície do líquido,e isto até que uma força máxima seja atingida. A camada de líquido agarrada ao anel não deve ser retirada. Uma vez concluídas as determinações, o anel será de novo imerso abaixo da superfície e as determinações repetidas até que se chegue a uma tensão superficial constante. Em cada determinação será registado o tempo que decorre após a transferéncia da solução para o recipiente. As leituras serão efectuadas no ponto do valor máximo da força necessária para retirar o anel da superfície do líquido.

2. **RESULTADOS**

Para calcular a tensão superficial, multiplica-se primeiro o valor lido no aparelho em mN/m pelo factor de aferição Φ_a ou Φ_b (segundo o processo de aferição utilizado). Obtém-se então um valor que é somente uma aproximação e que deve pois ser corrigido.

Harkins e Jordan (3) estabeleceram de modo empírico os factores de correcção para os valores da tensão superficial obtidos pelo método do anel, factores que dependem das dimensões do anel, da densidade do líquido e da sua tensão superficial.

Dado que é laboriosa a determinação do factor de correcção próprio para cada medida a partir das tabelas de Harkins e Jordan, é autorizada a utilização de um processo simplificado de leitura directa da tensão superficial corrigida, através da tabela que é apresentada a seguir para soluções aquosas (Recorre-se à interpolação para as leituras que se situam entre dois valores da tabela).

QUADRO: CORRECÇÃO DOS VALORES MEDIDOS DA TENSÃO SUPERFICIAL

Válido somente para soluções aquosas: $\rho = 1\ g/cm^3$

R = 9,55 mm (raio médio do anel)

r = 0,185 mm (raio do fio que constitui o anel)

Valor experimental (mN/m)	Valor corrigido (mN/m)	
	Aferição com cavaleiros (ver 1.6.4.2.2. (a))	Aferição com água (ver 1.6.4.2.2. (b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Esta tabela foi estabelecida baseando-se na correcção de Harkins-Jordan e corresponde à da norma DIN (DIN 53914) referentes à água e às soluções aquosas (densidade $\rho = 1\ g/cm^3$) e para um anel disponível no comércio cujas dimensões são R = 9,55 mm (raio médio do anel) e r = 0,185 mm (raio do fio que constitui o anel). A tabela dá os valores corrigidos das determinações da tensão superficial efectuadas após aferição por meio de cavaleiros ou de água pura.

Uma outra alternativa consiste, sem aferição prévia, no cálculo da tensão superficial segundo a seguinte fórmula:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4 \pi R}$$

em que,

F = força medida no dinamómetro no ponto de ruptura da película

R = raio do anel

f = factor de correcção (1).

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório deve conter, se possível, as informações seguintes:

— método utilizado: método harmonizado do tensiómetro de anel, ISO ou OCDE,

— tipo de água ou solução utilizada,

— descrição precisa da substância testada (identificação e impurezas),

— resultados das determinações: tensão superficial (lida) abrangendo as diferentes leituras e a sua média aritmética, assim como o valor médio corrigido (tendo em conta o factor equipamento e a tabela de correcção),

— concentração da solução,

— temperatura do ensaio,

— idade da solução utilizada, em particular o espaço de tempo entre a preparação da solução e a medição,

— evolução da tensão superficial da solução em função do tempo a partir do momento em que foi transferida para o recipiente de medida,

— todas as informações e observações de interesse para a interpretação dos resultados devem ser assinalados, nomeadamente no que se refere às impurezas e ao estado físico da substância.

4. REFERÊNCIAS

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 115 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) *Pure and Applied Chem,* Vol. 48, 1976, p. 511.

(3) Harkins, W.D., Jordan, H.F., *J. Amer. Chem. Soc.,* Vol. 52, 1930, p. 1751.

A.6. HIDROSSOLUBILIDADE

1. MÉTODOS

Os métodos descritos baseiam-se nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

É útil dispor de informações sobre a substância, a sua fórmula de estrutura, a pressão de vapor, a constante de dissociação e hidrólise (função do pH), para realizar este ensaio.

Um só método não é suficiente para cobrir toda a gama de solubilidades na água.

O método não é aplicável às substâncias voláteis.

Os dois métodos de ensaio descritos permitem cobrir a seguinte gama:

— a primeira, a seguir denominada « método por eluição em coluna », aplica-se às substâncias essencialmente puras, de fraca solubilidade ($< 10^{-2}$ g/l) e estáveis na água,

— a segunda, a seguir denominada « método do frasco », aplica-se às substâncias essencialmente puras, de maior solubilidade ($> 10^{-2}$ g/l) e estáveis na água.

A hidrossolubilidade das substâncias pode ser consideravelmente afectada pela presença de impurezas.

1.2. Definições e unidades

A hidrossulubilidade duma substância é a concentração mássica de saturação da substância na água a uma dada temperatura. Exprime-se em unidades de massa por volume da solução.

A unidade SI é o kg/m^3 (g/l também pode ser utilizado).

1.3. Substâncias de referência

Não é necessária a utilização de substâncias de referência nos casos em que se estuda uma nova substância. Elas devem servir essencialmente para controlar periodicamente o método e permitir a comparação dos resultados desde que um outro método seja utilizado.

1.4. Princípio do método de ensaio

A quantidade aproximada da amostra e o tempo necessário para obter a concentração màssica de saturação devem ser determinados através de um ensaio preliminar simples.

1.4.1. *Método por eluição sobre coluna*

Este método é baseado na eluição da substância de ensaio com água numa microcoluna cheia com um material de suporte inerte como esferas de vidro, silica-gel ou areia e carregada com um excesso de substância a testar. A hidrossulubilidade é determinada quando a concentração mássica do eluído é constante. É indicada por um patamar de concentração em função do tempo.

1.4.2. *Método do frasco*

Neste método, a substância (se sólida, deve ser pulverizada) é dissolvida na água a uma temperatura um pouco superior à do ensaio. Quando é atingida a saturação, a mistura é arrefecida, mantida à temperatura de ensaio e agitada até que seja atingido o equilíbrio (2). Nesse momento, a concentração mássica da substância na solução aquosa, que não deve conter qualquer partícula não dissolvida, é determinada de acordo com um método analítico adequado.

1.5. **Critérios de qualidade**

1.5.1. *Reprodutibilidade*

Pelo que foi referido sobre o método de eluição em coluna, a reprodutibilidade susceptível de ser obtida é inferior a 30 % ; quanto ao método do frasco, ela deve ser inferior a 15 %.

1.5.2. *Sensibilidade*

Depende do método de análise, mas a concentração mássica pode ser determinada até um mínimo de 10^{-6} g/l.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Condições de ensaio*

O ensaio deve ser efectuado de preferência a 20°C ± 0,5°C. Se se receia uma incidência da temperatura na solubilidade (> 3 %/°C), utilizar-se-ão igualmente duas outras temperaturas, pelo menos 10°C acima e abaixo da temperatura inicialmente escolhida. Neste caso a temperatura é ajustada a ± 0,1°C. Será mantida constante a temperatura escolhida em todas as partes relevantes da aparelhagem.

1.6.2. *Ensaio preliminar*

Numa proveta de 10 ml, calibrada e tapada, adicionar a cerca de 0,1g da amostra (as substâncias sólidas devem ser pulverizadas) volumes crescentes de água destilada à temperatura ambiente, segundo a progressão indicada no quadro seguinte:

0,1 g solúvel em «x» ml de água	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilidade aproximada (g/1)	>1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	< 1

Após cada adição da quantidade de água indicada, agitar vigorosamente a mistura durante dez minutos, depois verificar visualmente se contém partículas não dissolvidas. Então, se após adição de 10 ml de água, a amostra ou alguma porção não se encontrar dissolvida, é transferida para outra proveta graduada de 100 ml; enche-se esta de água até 100 ml e agita-se. Se a solubilidade é fraca, o tempo necessário para dissolver a substância pode ser consideravelmente longo (prever 24 h). A solubilidade aproximada está indicada no quadro anterior com o volume de água ao qual se efectua a dissolução completa da amostra. Se a substância permanece insolúvel, proceder a uma nova diluição a fim de se saber se vai ser utilizado o método de eluição em coluna ou o método por solubilidade em frasco.

1.6.3. *Método por eluição em coluna*

1.6.3.1. Material de suporte, solvente e eluente

Neste método, o material de suporte deve ser inerte. Podem utilizar-se para o efeito esferas de vidro ou sílica. Para aplicar a substância de ensaio ao suporte, utiliza-se um solvente volátil adequado, de bom grau de pureza. Como eluente ou solvente utiliza-se água bidestilada, obtida em aparelhagem de vidro ou quartzo.

Nota:

Não utilizar água proveniente directamente de um permutador de iões orgânico.

1.6.3.2. Carga do material de suporte

Pesar e transferir cerca de 600 mg de material de suporte para um balão de fundo redondo de 50 ml.

Dissolver uma quantidade adequada e pesada de substância de ensaio, no solvente escolhido. Juntar ao suporte uma quantidade conveniente dessa solução. O solvente deve ser completamente evaporado, por exemplo em evaporador rotativo, a fim de assegurar a saturação do suporte em água, saturação que, de outro modo não se fará, devido ao efeito de partição à superfície.

A impregnação do suporte pode causar problemas (resultados errados), se a substância de ensaio for depositada sob a forma de óleo ou em fase cristalina diferente. Este problema deve ser examinado experimentalmente.

Deixar o suporte assim impregnado mergulhado cerca de 2 horas em cerca de 5 ml de água e depois transferir a suspensão para a microcoluna. Pode igualmente verter-se nesta o suporte carregado a seco, tendo sido a microcoluna previamente cheia de água e depois equilibrada durante cerca de 2 horas.

Técnica:

A eluição da substância a partir do suporte pode efectuar-se segundo dois processos diferentes:

— bomba de circulação (Ver figura 1),

— reservatório de nível (Ver figura 4).

1.6.3.3. Método por eluição em coluna com bomba de circulação

Aparelhagem:

É indicada na figura 1 uma montagem esquemática dum sistema correntemente utilizado. A figura 2 mostra uma microcoluna adequada, embora qualquer outra dimensão seja aceitável, na condição de satisfazer os critérios de reprodutibilidade e de sensibilidade. A coluna deve ter um volume livre superior correspondente no mínimo a 5 vezes o volume do suporte, mais um volume mínimo de cinco amostras. Pode no entanto reduzir-se esta dimensão se se utilizar um acréscimo de solvente para substituir os cinco volumes referidos, eliminados com as impurezas.

A coluna deve ser ligada a uma bomba de circulação capaz de assegurar um débito aproximado de 25 ml/h. Esta bomba é equipada com ligações em politetrafluoretileno e/ou vidro. A coluna e a bomba quando ligadas devem permitir a recolha de amostras do efluente e o equilíbrio à pressão atmosférica do reservatório. O material na coluna é suportado por um pequeno tampão em lã de vidro (5 mm) que serve igualmente para filtrar as partículas. Como bomba de circulação pode utilizar-se nomeadamente uma bomba peristáltica (vigiar para que contaminações ou absorções não afectem o material que constitui o tubo) ou uma bomba de membrana.

Processo de medição:

A circulação na coluna é iniciada, sendo o débito recomendado de 25 ml/h aproximadamente (cerca de 10 volumes de enchimento por hora para a coluna acima descrita). Os cinco primeiros volumes (mínimo) são rejeitados a fim de eliminar as impurezas solúveis na água. Após o que, ligar a bomba de circulação, fazendo funcionar o aparelho até atingir o estado de equilíbrio que é definido pelas cinco amostras sucessivas cujas concentrações não diferem de modo aleatório de ± 30 %. Estas amostras devem ser separadas umas das outras por um intervalo de tempo correspondente à passagem de pelo menos 10 volumes através do enchimento.

1.6.3.4. Método de eluição em coluna com reservatório tampão

Aparelhagem (Ver figuras 3 e 4):

Reservatório: a ligação ao reservatório é assegurada por uma junta esmerilada, ligada a um tubo em politetrafluoretileno. Débito recomendado: cerca de 25 ml/hora. Os sucessivos eluídos serão recolhidos e analisados seguindo o método escolhido.

Processo de medição:

As fracções provenientes do intervalo médio de eluição, para as quais as concentrações são constantes (± 30 %) em pelo menos cinco fracções consecutivas, serão utilizadas para determinar a hidrossolubilidade.

Repetir-se-á a operação com o débito reduzido a metade. Se os resultados das duas operações forem coincidentes, o ensaio é considerado satisfatório; se se constatar uma solubilidade aparentemente mais elevada no débito inferior, reduzir-se-á novamente a metade, até que duas operações sucessivas dêem a mesma solubilidade.

Nos dois casos (bomba de circulação ou reservatório de água), observar nas fracções a eventual presença de matéria coloidal através da detecção do efeito de Tyndall (dispersão da luz). A presença de tais partículas falseia os resultados e o ensaio deve ser repetido melhorando a acção de filtração na coluna. Examinar o pH de cada amostra. Efectuar uma segunda operação à mesma temperatura.

1.6.4. *Método por solubilidade em frasco*

1.6.4.1. Aparelhagem

Este método requer o seguinte material:

— material de vidro e equipamento normal de laboratório,

— dispositivo adequado para agitar as soluções a temperaturas constantes e controladas,

— centrífuga termostatizada, se necessário, em presença de emulsão,

— equipamento para a determinação analítica.

1.6.4.2. Processo de medição

Avaliar, a partir de um ensaio preliminar, a quantidade de produto necessário para saturar um volume escolhido de água. Este depende do método analítico e do intervalo de solubilidade. Pesar cerca de cinco vezes a quantidade do material atrás determinado e introduzi-lo em três recipientes de vidro com rolha também de vidro (por exemplo: tubos de centrífuga ou balões). Juntar a cada recipiente o volume de água escolhido e fechá-los então hermeticamente. Agitar os recipientes fechados a 30°C (utilizar um dispositivo de agitação susceptível de operar a temperatura constante, por exemplo, agitação magnética em banho-maria controlado por termóstato). No dia seguinte, retirar um dos recipientes e reequilibrar durante 24 horas à temperatura do ensaio, agitando de vez em quando. O conteúdo do recipiente é em seguida centrifugado à temperatura do ensaio e é determinada a concentração do composto na fase aquosa límpida através de um método analítico adequado. Os dois outros balões são tratados do mesmo modo após um primeiro equilíbrio a 30°C, durante dois e três dias respectivamente. Se as concentrações de pelo menos os dois últimos recipientes concordarem com a reprodutibilidade exigida, o ensaio é considerado satisfatório. Repetir o conjunto de operações, utilizando tempos de equilíbrio mais longos se os resultados dos recipientes 1, 2 e 3 acusarem uma tendência para aumentar de valores.

O pH de cada amostra deve ser anotado.

1.6.5. *Análise*

É preferível para estas determinações um método de análise específico da substância dado que pequenas quantidades de impurezas solúveis podem provocar erros sensíveis na solubilidade medida. Exemplos de métodos: cromatografia em fase gasosa ou líquida, métodos titulimétricos, fotométricos ou voltamétricos.

2. RESULTADOS

2.1. Método por eluição em coluna

O valor médio determinado em pelo menos cinco amostras consecutivas retiradas durante o estádio de saturação deve ser calculado para cada operação, tal como o desvio padrão.

2.2. Método do frasco

Os resultados individuais devem ser indicados para cada um dos 3 frascos; faz-se a média e exprimem-se em unidades de massa por volume da solução os resultados considerados constantes (reprodutibilidade inferior a 15 %); esta operação pode exigir a conversão das unidades de massa em unidades de volume utilizando a densidade, sempre que a solubilidade é muito elevada (> 100 g/l).

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

3.1. Método por eluição em coluna

O relatório deve conter, se possível, a indicação dos resultados do ensaio preliminar, assim como os seguintes dados:

— descrição precisa da substância (identificação e impurezas),

— concentrações individuais, débito e pH de cada amostra,

— desvios médios e padrões de pelo menos cinco amostras no patamar de saturação de cada operação,

— média de duas operações aceitáveis consecutivas,

— temperatura da água durante o processo de saturação,

— método de análise utilizado,

— natureza do material de suporte utilizado,

— quantidade de substância depositada no suporte,

— solvente utilizado

— evidência instabilidades químicas eventuais da substância durante o ensaio e método utilizado,

— todos os dados pertinentes para a interpretação dos resultados.

3.2. Método do frasco

O relatório deve conter, se possível, os seguintes dados:

— descrição precisa da substância (identificação e impurezas),

— resultados analíticos individuais e média, desde que seja determinado mais do que um valor para o mesmo recipiente,

— pH de cada amostra,

— média dos valores para os diferentes recipientes em concordância,

— temperatura do ensaio,

— método analítico utilizado,

— evidência de eventuais instabilidades químicas da substância durante o ensaio e método utilizado,

— todos os dados pertinentes para a interpretação dos resultados.

4. REFERÊNCIAS

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 116. Decision of the Council C (81) 30 Final.

Apêndice

Figura 1

Esquema do dispositivo de ensaio

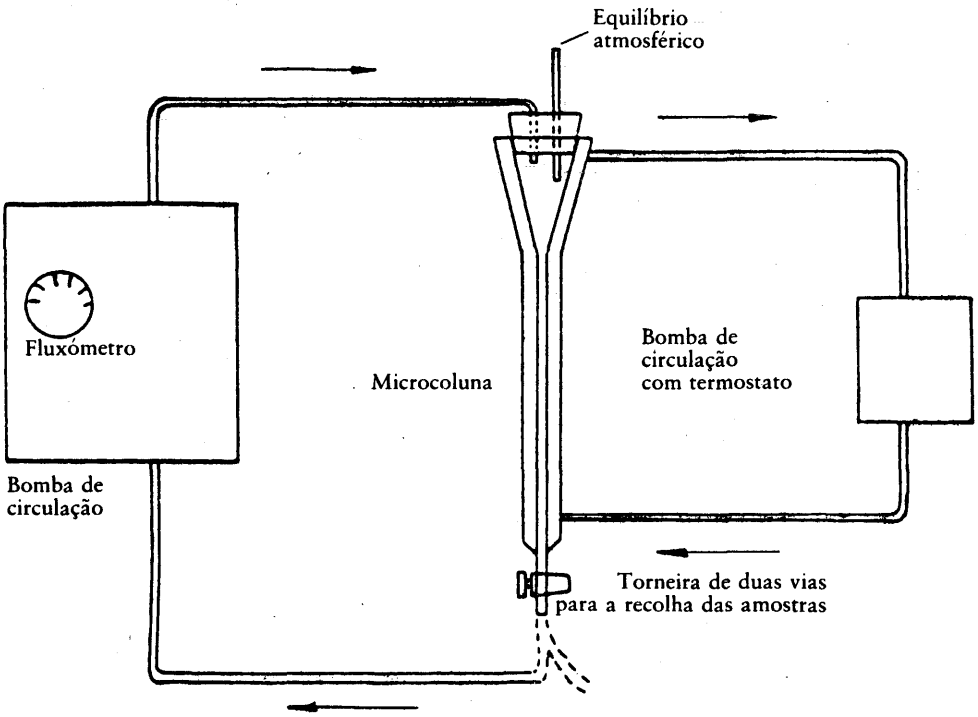


Figura 2

Microcoluna tipo

(dimensões en mm)

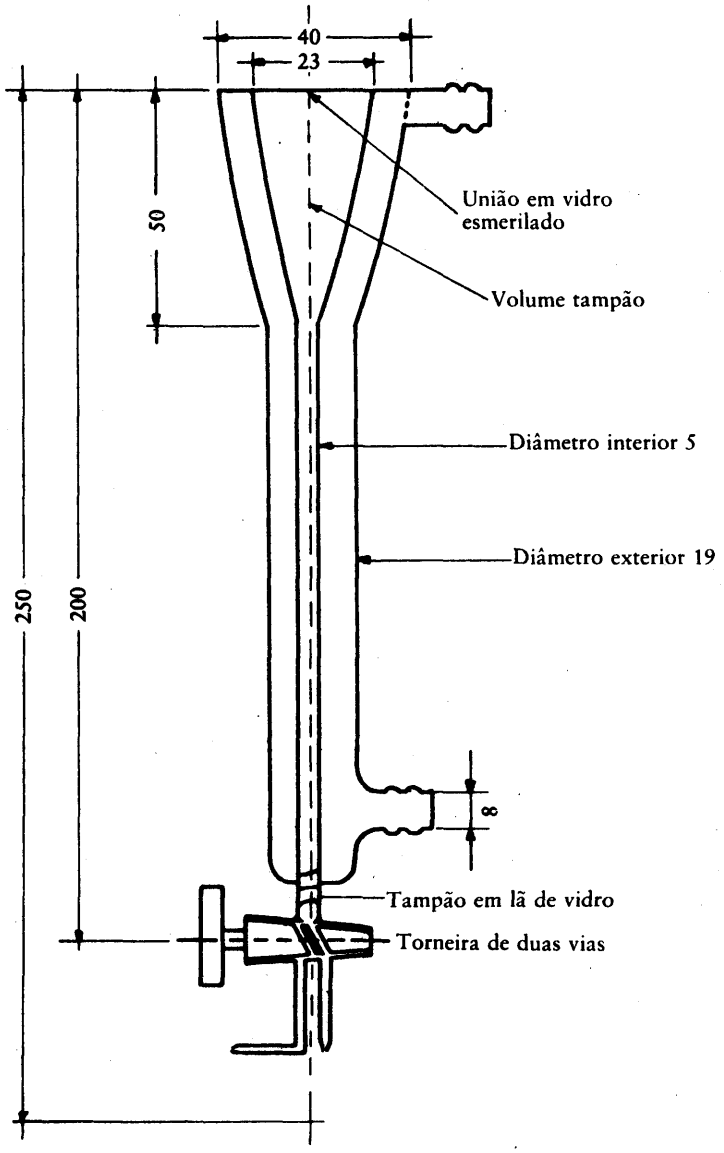


Figura 3

Microcoluna tipo

(dimensões en mm)

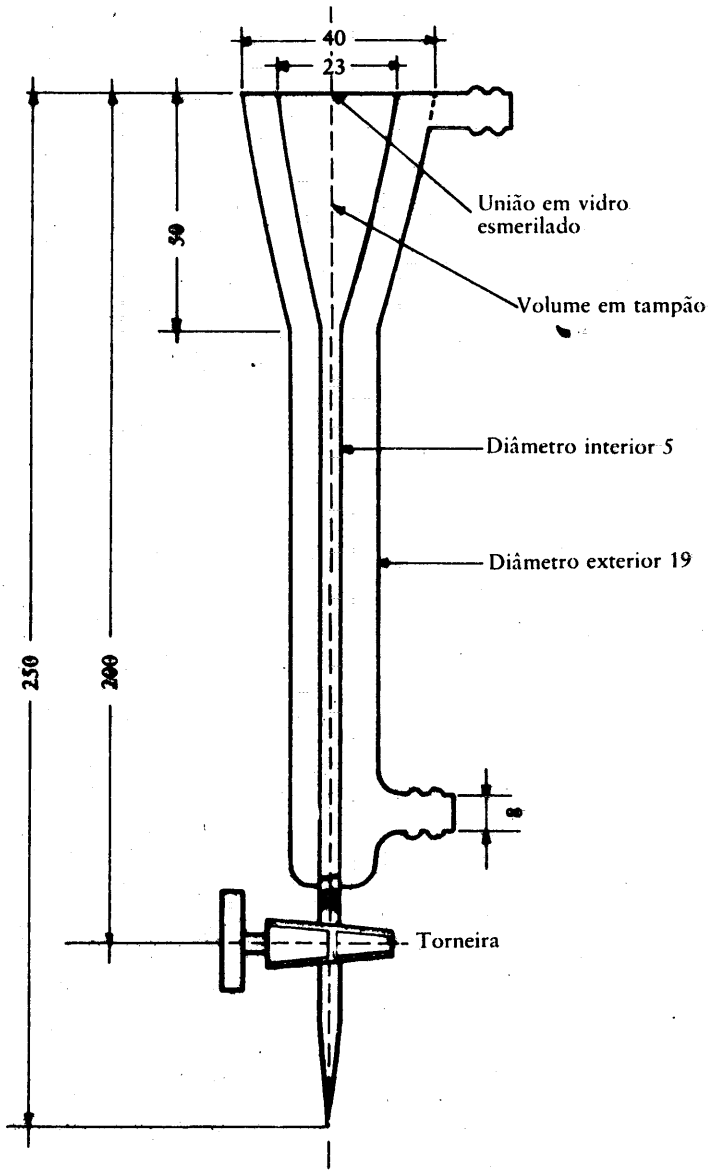
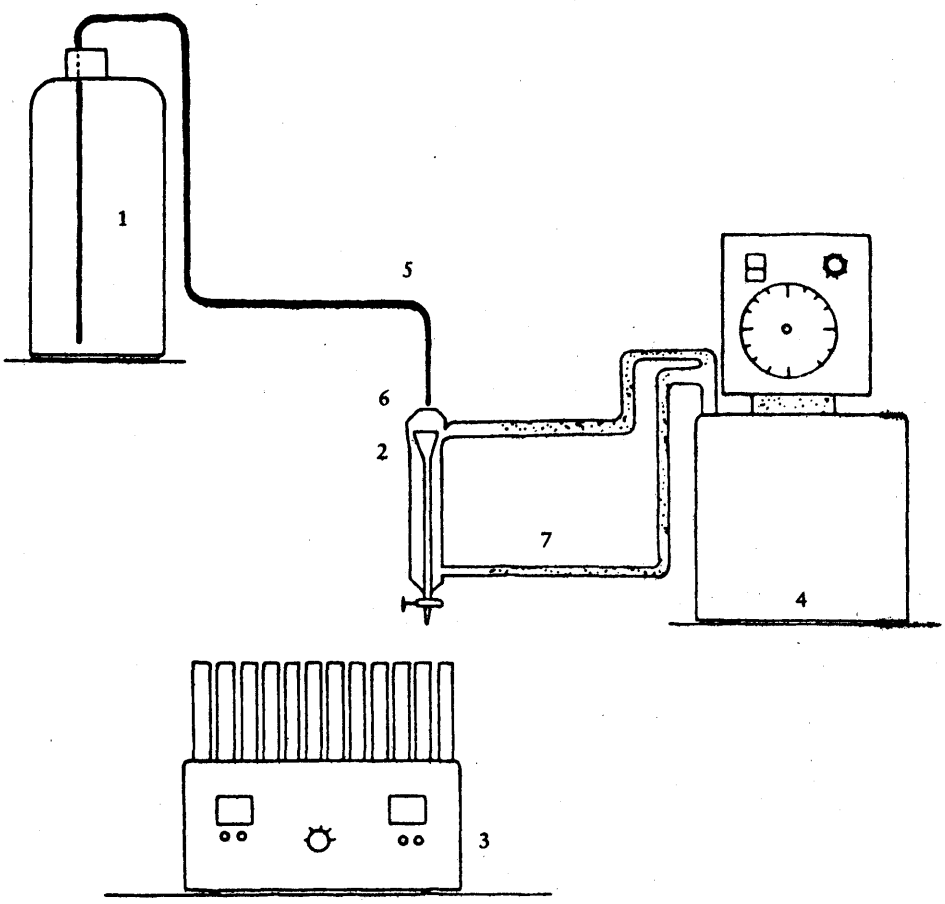


Figura 4

Dispositivo de ensaio para a determinação da hidrossolubilidade des substâncias pouco solúveis e pouco voláteis



1 = Reservatório de água por exemplo um balão (capacidade: 2,5 l)
2 = Coluna (ver figura 3)
3 = Colector de fracções
4 = Termóstato
5 = Tubo em teflon
6 = Rolha esmerilada em vidro
7 = Conduta de água (entre o termóstato e a coluna; diâmetro interior ± 8 mm)

A.7. LIPOSSOLUBILIDADE

1. MÉTODO

O método descrito baseia-se nas directivas da OCDE (1).

1.1. Introdução

É útil, para a realização deste ensaio, dispor-se de dados preliminares sobre o coeficiente de partição, hidrossolubilidade, fórmula de estrutura e estabilidade da substância a 50 °C. Este método só é aplicável às substâncias essencialmente puras, estáveis a 50 °C e não significativamente voláteis nas mesmas condições.

O método não é conveniente para as substâncias que reagem com os triglicéridos nas condições do ensaio.

1.2. Definições e unidades

A fracção mássica duma substância que forma uma fase homogénea com uma gordura líquida (óleo) sem dar origem a reacções químicas, é definida como lipossolubilidade. O valor máximo desta fracção chama-se fracção mássica de saturação e é dependente da temperatura.

A fracção mássica de saturação duma substância deve ser indicada em miligramas por 100 gramas de gordura padrão, a 37 °C ± 0,5 °C.

Existe a seguinte relação entre a solubilidade em grama por 100 gramas de solução (S') e a solubilidade em gramas por 100 gramas de solvente (S):

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g de gordura padrão}$$

Multiplicando S por 1000, obtém-se a solubilidade em miligramas por 100 gramas de gordura padrão.

1.3. Substâncias de referência

As substâncias de referência não têm necessariamente de ser utilizadas em todos os casos de análise de uma nova substância. Elas servem essencialmente para verificar periodicamente a reprodutibilidade do método e permitir comparar os resultados quando se utiliza um método diferente.

1.4. Princípio do método

A substância é adicionada a uma gordura-padrão líquida e em agitação. A quantidade de substância é posta em excesso. A quantidade dissolvida é determinada por um método analítico adequado.

1.5. Critérios de qualidade

1.5.1. *Especificidade*

Presentemente não se conhece a reprodutibilidade da medição.

Os resultados aplicam-se às gorduras-padrão e a substâncias relativamente puras. Mesmo a 37 °C as gorduras podem formar emulsões ou suspensões finas de substâncias sólidas. Como estas interferem com a determinação da fracção mássica, deve ser evitada a sua formação.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Preparação*

1.6.1.1. Equipamento

Equipamento necessário:

— material de vidro normal de laboratório,

— balança,

— centrífuga termostatizada,

— agitador em combinação com um sistema de controlo da temperatura,

— termostato.

1.6.1.2. Gorduras-padrão

É necessária a utilização de gorduras-padrão facilmente especificáveis. No apêndice consta um exemplo.

1.6.1.3. Ensaio preliminar

Deve ser efectuado um ensaio preliminar simplificado, para se determinar a quantidade aproximada de substância necessária para obter a fracção mássica de saturação à temperatura do ensaio (37 °C).

Nota

A velocidade de obtenção do equilíbrio de saturação pode depender em larga medida da granulometria (caso das substâncias sólidas). Por isso, estes produtos devem ser pulverizados.

1.6.1.4. Preparação da substância

Pesar oito amostras e colocá-las em frascos de ensaio de 50 ml. Normalmente a quantidade de cada uma destas amostras deve ser a dupla da necessária à saturação, tal como foi determinado pelo ensaio preliminar.

Após adição de uma quantidade pesada de cerca de 25 g de gordura padrão liquefeita e misturada, fechar hermeticamente os frascos e agitá-los. Metade deles (grupo 1) agitam-se a 30 °C e a outra metade (grupo 2) a cerca de 50 °C, durante pelo menos uma hora.

1.6.2. *Condições do ensaio*

A determinação da lipossolubilidade é efectuada a 37 °C ± 0,5 °C.

1.6.3. *Metodologia*

Agitar o conteúdo dos frascos dos dois grupos a 37 °C ± 0,5 °C até obter uma mistura perfeita.

O tempo de agitação necessário para estabelecer o equilíbrio não pode, regra geral, ser previsto. Nas substâncias líquidas, a saturação pode ser obtida em alguns minutos; para as substâncias sólidas pode levar horas. O tempo de agitação não ultrapassa, em geral, as três horas. Depois, interromper a agitação de dois dos frascos dos dois grupos e deixá-los repousar a 37 °C durante pelo menos uma hora, de modo a separar a quantidade de substância não dissolvida e permitir a formação da fase homogénea. Se se formar uma emulsão ou suspensão (por exemplo o efeito de Tyndall), eliminá-la por um método adequado como a centrifugação termostatizada.

Agitar o terceiro e o quarto frascos dos dois grupos, pelo menos durante 24 h deixando-os depois repousar uma hora a 37 °C ± 0,5 °C.

Nota:

Se não se depositar nenhum sedimento (para as substâncias sólidas), ou se nenhuma separação de fase aparecer (para as substâncias líquidas) neste intervalo de tempo, o ensaio deve ser repetido com uma quantidade maior de substância.

1.6.4. *Análise*

Retirar uma amostra de cada fase de gordura saturada para a análise. Pesá-la e determinar a fracção mássica dissolvida.

Qualquer método analítico adequado pode ser utilizado, quer directamente quer após extracção com água ou com um solvente orgânico, ou por qualquer outra técnica de separação.

Exemplos:

— espectrofotometria,

— cromatografia em fase gasosa ou líquida,

— voltametria.

2. RESULTADOS

Se os resultados acusarem diferenças sensíveis, quer na sub-saturação quer na sobresaturação quer ainda nos períodos de repouso longos ou curtos, o ensaio deve ser repetido com tempos de agitação mais longos.

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

Os dados seguintes devem, se possível, constar do relatório do ensaio:

— descrição precisa da substância (identificação e impurezas),

— especificação da gordura (por exemplo: descrição concreta, características, origem, composição),

— método de análise, desvios e características especiais.

Os resultados devem ser avaliados como foi anteriormente descrito e mencionados no relatório do ensaio. Se não se constatar nenhuma diferença significativa entre os valores observados em mg/100g, devem os valores individuais, o valor médio e os desvios padrão ser registados. Se se notarem diferenças significativas, mesmo depois de um novo ensaio, só serão assinalados os resultados individuais.

Todas as observações e dados pertinentes para a interpretação dos resultados serão anotados.

4. REFERÊNCIAS

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 116 — Decision of the Council C(81) 30 Final.

Apêndice

EXEMPLO DE UMA GORDURA-PADRÃO

O quadro seguinte indica a composição de uma gordura-padrão.

Distribuição do ácido gordo

Numero de átomos de C na fracção de ácido gordo	6	8	10	12	14	16	18	outros
% (áreas por CGL)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Distribuição dos glicéridos

Número de átomos de C na fracção de ácido gordo	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
% (áreas por CGL)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	16,1

Pureza

Teor em monogliceridos (enzimático)	≤ 0,1 %
Teor em diglicéridos (enzimático)	≤ 0,4 %
Teor não saponificável	≤ 0,1 %
Índice de Wijs	≤ 0,5 %
Índice de acidez	0,02
Teor em água (K. Fischer)	≤0,1 %
Ponto de fusão claro	28,5 °C

Espectro de absorção-tipo (espessura da camada d=1 cm, comparação; água, 35 °C

Comprimento de onda (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Transmissão (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Mínimo 10 % de transmissão da luz a 303 nm.

Esta gordura é uma mistura sintética de glicéridos saturados, com uma distribução em ácidos gordos e triglicéridos semelhante à de óleo de coco.

A.8. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

1. MÉTODO

O método descrito é baseado nas directivas da OCDE (1)

1.1. Introdução

É conveniente dispor de dados preliminares sobre a constante de dissociação, a hidrossolubilidade e a tensão superficial da substância para executar este ensaio.

O método só se aplica às substâncias essencialmente puras, solúveis na água e no n-octanol. Não é aplicável às substâncias tensioactivas.

1.2. Definições e unidades

O coeficiente de partição (P) é definido como sendo a razão das concentrações no ponto de equilíbrio (c_i) duma substância dissolvida num sistema bifásico que consiste em dois solventes praticamente não miscíveis. Neste caso eles são o n-octanol e a água:

$$P_{O,A} = \frac{C_{Octanol}}{C_{água}}$$

O coeficiente de partição (P) é, pois, o quociente entre duas concentrações; é geralmente indicado sob a forma do seu logaritmo na base 10 (log P).

1.3. Substância de referência

Não é necessário utilizar substâncias de referência em todos os casos em que se analisa uma nova substância.Elas servem essencialmente para controlar periodicamente a reprodutibilidade do método e permitir comparar resultados quando se utilizarem métodos diferentes.

1.4. Princípio do método

Para a determinação do coeficiente de partição, pretende-se atingir o equilíbrio entre o conjunto dos elementos constitutivos do sistema em interacção e determinar as concentrações das substâncias dissolvidas nas duas fases.Na literatura sobre o tema aparecem numerosas técnicas que podem ser utilizadas para alcançar este objectivo, isto é, a mistura completa das duas fases seguida da sua separação, a fim de determinar a concentração, após equilíbrio da substância em estudo.

1.5. Critérios de qualidade

1.5.1. *Reprodutibilidade*

Para se obter um coeficiente de partição rigoroso, fazem-se determinações duplas em três séries de condições de ensaios diferentes, podendo variar a quantidade da substância assim como a relação entre os volumes de solvente. Os valores determinados deste coeficiente, expressos sob a forma dos seus logaritmos decimais, devem situar-se num intervalo de ± 0,3 unidades logarítmicas.

1.5.2. *Sensibilidade*

O intervalo de medição do método é determinado pelo limite de detecção do processo analítico. Isto deverá ser suficiente para a estimativa dos valores de $P_{O,A}$ até 10^5, desde que a concentração do soluto, em cada fase, não exceda 0,01 mol/litro.

1.5.3. *Especificação*

A lei da partição de Nernst aplica-se apenas a soluções diluídas, com temperatura, pressão e pH constantes. Aplica-se estritamente a substâncias puras dispersas em dois solventes puros. Os resultados podem ser afectados pelo aparecimento simultâneo, numa ou nas duas fases, de vários solutos diferentes.

A associação ou a dissociação das moléculas dissolvidas conduzem a desvios à lei de partição de Nernst. Nestes casos verifica-se uma dependência do coeficiente de partição da concentração da solução.

Devido aos equilíbrios múltiplos em presença este método de ensaio não deve ser aplicado sem correcção aos compostos ionisáveis (utilizar soluções-tampão em vez de água em tais situações).

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Estimativa preliminar do coeficiente de partição*

O valor do coeficiente de partição por ser estimado, quer por simples cálculo (2) quer utilizando as solubilidades da substância de ensaio em solventes puros (1).

Logo,

$$P_{\text{estimativa}} = \frac{C_{\text{saturação (n-octanol)}}}{C_{\text{saturação (água)}}}$$

Pode igualmente fazer-se uma determinação simplificada através de um ensaio preliminar simples.

1.6.2. *Preparação*

n-Octanol: a determinação do coeficiente de partição deve ser feita com um reagente de qualidade analítica.

Água: utilizar água destilada ou bidestilada proveniente de um aparelho de vidro ou de quartzo.

Nota:

Evitar a água proveniente directamente de um permutador de iões.

1.6.2.1. Pré-saturação dos solventes

Antes de se determinar o coeficiente de partição, as fases do sistema de solventes são saturadas reciprocamente por agitação a temperatura do ensaio. Para isso, agitar durante 24h num agitador mecânico dois recipientes grandes que contenham n-octanol puro de qualidade analítica ou água, com uma quantidade suficiente do outro solvente. Depois, deixar repousar até que as fases se separem e que se atinja o estado de saturação.

1.6.2.2. Preparação para o ensaio

O volume do líquido deve encher quase completamente o recipiente de ensaio a fim de evitar qualquer perda por volatilização. A razão de volumes e as quantidades de substância a utilizar são as seguintes:

— estimativa preliminar do coeficiente de partição (ver atrás),

— quantidade mínima de substância de ensaio necessária para o processo analítico utilizado,

— limite de concentração máxima em cada fase, de 0,01 mol/l.

Serão efectuados três ensaios. No primeiro, junta-se a razão de volumes calculada, no segundo duas vezes o volume de n-octanol, e no terceiro, a metade do volume de n-octanol.

1.6.2.3. Substância de ensaio

Para assegurar o equilíbrio durante o ensaio, é preparada uma solução de reserva em n-octanol com uma concentração mássica compreendida entre 1 e 100 mg/ml. A concentração mássica real desta solução de reserva deve ser determinada rigorosamente antes de ser utilizada na determinação do coeficiente de partição. Deve ser guardada em condições estáveis.

1.6.3. *Condições de ensaio*

A temperatura do ensaio deve ser constante (± 1 °C) e situar-se entre 20 °C e 25 °C.

1.6.4. *Processo de medição*

1.6.4.1. Estabelecimento do equilíbrio de partição

Para cada série de condições do ensaio, preparar o dobro dos recipientes de ensaio que contenham as quantidades necessárias, cuidadosamente pesadas, dos dois solventes, assim como a quantidade necessária da solução de reserva.

Medir os volumes de octanol. Colocar num agitador adequado, ou agitar à mão, os recipientes para o ensaio. Um método de agitação recomendado consiste em rodar rapidamente de 180 °C o tubo de centrífuga em torno do seu eixo transversal de modo a que o ar eventualmente retido atravesse as duas fases.

1.6.4.2. Separação das fases

Para separação das fases, centrifuga-se a mistura. Efectuar esta operação com uma centrífuga de laboratório mantida à temperatura ambiente ou, caso se utilize uma centrífuga sem controlo de temperatura, reequilibrar os tubos à temperatura do ensaio pelo menos uma hora antes da análise.

1.6.5. *Análise*

Para determinar o coeficiente de partição, é necessário analisar as concentrações da substância nas duas fases. Para isso, retirar uma porção de cada uma das duas fases de cada tubo para cada uma das séries de condições de ensaio e analisá-las segundo o processo escolhido. A quantidade total da substância presente nas duas fases deve ser calculada e comparada com a quantidade de substância inicialmente introduzida.

A amostragem da fase aquosa deve ser tal que reduza ao mínimo o risco de serem incluídos vestígios de octanol. Para tal pode utilizar-se uma seringa de vidro com agulha permutável: primeiro, enche-se parcialmente a seringa de ar que é depois lentamente expulso, ao inserir-se a agulha na camada de n-octanol. Um volume adequado da fase aquosa é retirado com a seringa. Retirar rapidamente a seringa da solução e tirar a agulha. O conteúdo da seringa pode então ser utilizado como a amostra aquosa. A concentração nas duas fases distintas deve ser determinada de preferência utilizando um processo específico para a substância. Exemplos de determinações físico-químicas adequadas:

— métodos fotométricos,

— cromatografia em fase gasosa,

— cromatografia em fase líquida a alta pressão.

2. **RESULTADOS**

Se o $P_{O,A}$ medido for superior a 10^4, recomenda-se a comparação dos resultados com um valor de $P_{O,A}$ calculado, como por exemplo, segundo o método indicado na referência (3).

A credibilidade dos valores determinados de P pode ser verificada procedendo a uma comparação da média das determinações em duplicado com a média geral.

3. **RELATÓRIO DO ENSAIO**

Os seguintes dados devem, se possível, figurar no relatório:

— descrição precisa da substância (identificação e impurezas),

— temperatura a que foram feitas as determinações,

— processo analítico utilizado para determinar as concentrações,

— concentrações medidas nas duas fases por cada determinação (por consequência, num total de 12 concentrações),

— peso da substância de ensaio, volume de cada fase utilizada em cada recipiente e quantidade total calculada da substância presente em cada fase, após equilíbrio,

— para cada série de condições de ensaio e, para a média do conjunto das determinações, os valores calculados dos coeficientes de partição (P) e o valor médio. Anotar qualquer presumível dependência da concentração em relação ao coeficiente de partição,

— desvio padrão dos valores individuais de P em relação à sua média,

— valor médio de P do conjunto das determinações expresso pelo seu logarítmo (base 10),

— $P_{O,A}$ teórico calculado,se este foi determinado ou se o valor medido for, $> 10^4$

— P_H da água utilizada e da fase aquosa durante o ensaio,

— quaisquer observações e notas pertinentes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, PARIS, 1981, Test Guideline 107. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OECD, PARIS, 1981, Test Guideline 107. ref (2) Decision of the Council C (81) 30 Final.

(3) OECD, PARIS, 1981, Test Guideline 107. ref (10) Decision of the Council C (81) 30 Final.

A.9. PONTO DE INFLAMAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Para realizar este ensaio é útil dispor de informações preliminares sobre a inflamabilidade da substância. O modo operatório é aplicado às substâncias líquidas, na sua forma comercial, cujos vapores podem ser inflamados por fontes de inflamação. Os métodos de ensaio aqui descritos só são válidos para os intervalos do ponto de inflamação especificados em cada método.

1.2. Definições e unidades

O ponto de inflamação é a temperatura, corrigida para uma pressão de 101,325 kPa, à qual o líquido a ensaiar liberta vapores num recipiente de ensaio fechado nas condições definidas no respectivo método e em quantidades tais que daí resulte a formação de uma mistura inflamável vapor/ar no recipiente de ensaio.

Unidade: °C

$t = T - 273{,}15$

(t em °C e T em K).

1.3. Substâncias de referência

Não é necessária a utilização de substâncias de referência em todos os casos em que se estudar uma nova substância. Regra geral elas servem para a calibração periódica do método e permitem a comparação de resultados nos casos de aplicação de um outro método.

1.4. Princípio do método

A substância é colocada num recipiente de ensaio, que é aquecido progressivamente até que a concentração dos vapores no ar produza uma mistura susceptível de se inflamar.

1.5. Critérios de qualidade

1.5.1. *Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade depende do intervalo do ponto de inflamação e do método utilizado; máximo: ± 2 °C.

1.5.2. *Sensibilidade*

A sensibilidade depende do método utilizado.

1.5.3. *Especificidade*

A especificidade de certos métodos de ensaio é limitada a certos intervalos do ponto de inflamação e depende de certos dados relativos à substância (por ex.: alta viscosidade).

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparação*

A amostra da substância é colocada num aparelho de ensaio de acordo com os pontos 1.6.3.1 e/ou 1.6.3.2.

1.6.2. *Condições do ensaio*

É conveniente instalar o aparelho ao abrigo de correntes de ar.

1.6.3. *Desenvolvimento do ensaio*

1.6.3.1. Método do equilíbrio

Ver as normas ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. Método do não-equilíbrio

Aparelho de Abel:

Ver as normas BS 2000, parte 170, NF M07-011 e NF T66-009.

Aparelho de Abel-Pensky:

Ver as normas (EN 57), DIN 51755, primeira parte (para temperaturas de 5 °C a 65 °C), DIN 51755, segunda parte (para temperaturas inferiores a 5 °C) e NF M07-036.

Aparelho de Tag:

Ver as normas ASTM D-56 e ISO 2719.

Aparelho de Pensky-Martens:

Ver as normas ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 2000-34 e NF M07-019.

Notas:

Sempre que o ponto de inflamação determinado por um método de não-equilíbrio (ver 1.6.3.2) tem os valores seguintes: 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, deve ser confirmado por um método baseado no equilíbrio utilizando o mesmo aparelho.

Só os métodos susceptíveis de darem a temperatura do ponto de inflamação podem ser utilizados para uma notificação.

Para determinar o ponto de inflamação de líquidos viscosos(tintas, gomas, etc.) contendo solventes, utilizar apenas aparelhos e métodos que permitam a determinação do ponto de inflamação para líquidos viscosos. Ver as normas ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 e DIN 53213, parte 1.

2. RESULTADOS

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório deve abranger, se possível, as informações seguintes:

— descrição precisa da substância (identificação e impurezas),

— descrição do método utilizado e todas as eventuais variantes,

— os resultados e quaisquer informações ou observações úteis para interpretação dos resultados.

4. REFERÊNCIAS

Nenhuma.

A.10. INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Antes de se proceder a este ensaio, é útil dispor de informações preliminares das propriedades explosivas potenciais da substância.

O presente método é unicamente aplicável às substâncias pulverulentas, granulosas ou pastosas.

De forma a não englobar todas as substâncias susceptíveis de serem inflamadas, mas somente as que ardem rapidamente ou as de combustão particularmente perigosa de um ou de outro modo, só são consideradas muito inflamáveis as substâncias cuja velocidade de combustão exceda um certo limite. Além disso, os pós metálicos susceptíveis de serem consumidos serão igualmente considerados como muito inflamáveis se a incandescência se propagar por toda a amostra. Esta incandescência e as dificuldades ligadas à extinção do fogo constituem a principal razão para se considerar os pós metálicos especialmente perigosos. Os agentes de extinção habituais, como o dióxido de carbono e/ou a água, podem aumentar consideravelmente os riscos.

1.2. Definição e unidades

O tempo de combustão é expresso em segundos.

1.3. Substâncias de referência

Não especificadas.

1.4. Princípio do método

A substância na forma comercial é disposta numa pilha de 250 mm de comprimento. É em seguida inflamada de acordo com as condições definidas no ponto 1.6.3 e mede-se o tempo da combustão.

1.5. Critérios de qualidade

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparação*

No caso de uma substância em pó ou em grânulos, a substância na sua forma comercial é posta a granel numa forma metálica de 250 mm de comprimento e de secção transversal triangular, cuja altura e largura interiores são respectivamente de 10 mm e 20 mm. De ambos os lados da forma, no sentido do comprimento, dispõem-se placas metálicas destinadas a funcionar como limites laterais. Estas placas ultrapassam em 2 mm o bordo superior da secção triangular transversal (Ver figura). Em seguida deixa-se cair a forma três vezes de uma altura de 2 cm sobre uma superfície dura. Repor mais substância se necessário. Retirar então as placas laterais e raspar o excesso de substância. Colocar sobre a forma uma placa não combustível e não porosa, inverter o conjunto e desenformar.

Estender as substâncias pastosas sobre uma superfície não combustível em forma de cordão de 250 mm de comprimento e cerca de 1 cm^2 de secção transversal.

Utilizar uma fonte de inflamação adequada, tal como uma pequena chama ou um fio aquecido a uma temperatura de pelo menos 1 000 °C para inflamar a pilha numa das extremidades.

1.6.2. *Condições do ensaio*

No caso das substâncias sensíveis à humidade, efectuar o ensaio o mais rapidamente possível após se ter retirado a substância do seu recipiente.

1.6.3. *Desenvolvimento do ensaio*

Inflamar uma das extremidades da pilha. Logo que se tenha queimado uma distância de 80 mm, medir a velocidade de combustão nos 100 mm seguintes. Efectuar o ensaio seis vezes seguidas utilizando cada vez uma placa arrefecida e limpa.

2. **RESULTADOS**

Para se proceder à avaliação, é necessário dispor dos valores do tempo de combustão apurados durante seis ensaios.

3. **RELATÓRIO DO ENSAIO**

3.1. **Relatório**

O relatório deve conter, se possível, as seguintes informações:

— descrição precisa da substância (identificação e impurezas),

— descrição da substância de ensaio, seu estado físico,incluindo o conteúdo em humidade,

— resultados das medições,

— quaisquer notas complementares que possam ser úteis para a interpretação dos resultados.

3.2. **Interpretação dos resultados**

As substâncias pulverulentas, granulosas ou pastosas devem ser consideradas como facilmente inflamáveis sempre que o tempo de combustão durante os seis ensaios efectuados de acordo com o modo operatório descrito no ponto 1.6, for inferior a 45 segundos. Os pós metálicos ou de ligas metálicas devem ser considerados inflamáveis sempre que a chama ou a zona de reacção se estenda a toda a amostra.

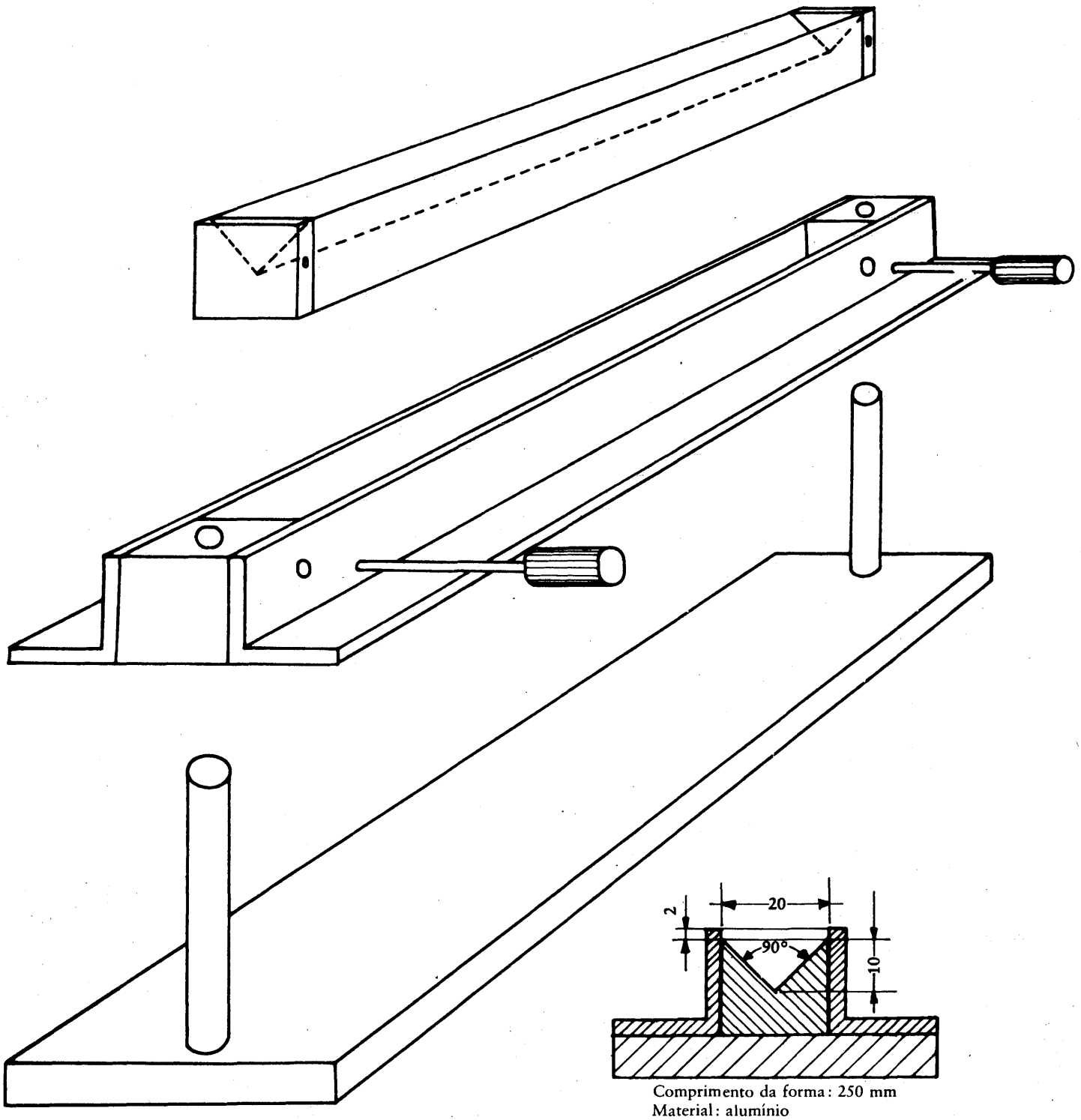
4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

Apêndice

Figura

Forma e acessórios para a preparação da pilha
(dimensões expressas en mm)



Comprimento da forma: 250 mm
Material: alumínio

A. 11. INFLAMABILIDADE (GASES)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O presente método permite determinar se os gases misturados no ar à temperatura e pressão ambientes, apresentam um intervalo de inflamabilidade. As misturas que contenham concentrações crescentes do gás de ensaio são expostas a uma faísca eléctrica e observa-se se se produz inflamação.

1.2. Definição e unidades

O intervalo de inflamabilidade é o intervalo de concentração entre os limites superior e inferior de explosão. Os limites superior e inferior de explosão são as concentrações no ar do gás inflamável às quais o fogo não se propaga.

1.3. Substância de referência

Nao especificada.

1.4. Princípio do método

A concentração do gás no ar é aumentada gradualmente e a mistura é exposta em cada fase a uma faísca eléctrica.

1.5. Critérios de qualidade

Não fixados.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Aparelho*

O recipiente de ensaio é um cilindro em vidro de diâmetro interior mínimo de 50 mm e de altura mínima de 300 mm disposto verticalmente. Os eléctrodos de inflamação encontram-se distanciados um do outro de 3 a 5 mm e colocados a 60 mm do fundo do cilindro. O cilindro está equipado com uma válvula de pressão. O aparelho deve ser protegido por blindagem adequada para minimizar os danos de uma eventual explosão.

A fonte de inflamação é uma faísca induzida de 0.5 segundos de duração, gerada por um transformador de alta tensão com uma tensão de saída de 10 a 15 kV (a potência máxima é de 300W).

1.6.2. *Condições do ensaio*

Deve realizar-se à temperatura ambiente.

1.6.3. *Desenrolar do ensaio*

Com a ajuda de bombas doseadoras, o cilindro de vidro é cheio com uma mistura ar-gás de concentração conhecida. Faz-se saltar uma faísca na mistura e observa-se se uma chama se destaca da fonte de inflamação e se se propaga de modo independente. A concentração do gás é aumentada, cada vez, de 1 % em volume, até que a inflamação se produza da forma anteriormente descrita.

2. **RESULTADOS**

A propagação da chama constitui o único dado de informação válida para a determinação desta propriedade.

3. **RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório deve conter, se possível, as seguintes informações:

— descrição precisa da substância (identificação e impureza),

— descrição do aparelho utilizado, mencionando as suas dimensões,

— temperatura ambiente a que decorrer o ensaio,

— concentrações ensaiadas assim como os resultados obtidos,

— resultado do ensaio: gás não inflamável ou facilmente inflamável,

— desde que se conclua da não inflamabilidade, interessa declarar que todas as concentrações foram ensaiadas aumentando-as cada vez de 1 %, de 0 a 100 %,

— qualquer informação ou observação útil para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

A. 12. INFLAMABILIDADE (SUBSTÂNCIAS E PREPARAÇÕES QUE, EM CONTACTO COM A ÁGUA OU O AR HÚMIDO, LIBERTAM GASES FACILMENTE INFLAMÁVEIS EM QUANTIDADES PERIGOSAS)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Este método de ensaio pode ser utilizado para determinar se da reacção duma substância com a água resulta a libertação de uma quantidade perigosa de um ou vários gases, susceptíveis de serem facilmente inflamáveis ou tóxicos.

Pode ser aplicado às substâncias sólidas e líquidas, mas não às que se inflamem espontaneamente em contacto com o ar.

1.2. Definições e unidades

Facilmente inflamáveis — substâncias e preparações que, em contacto com a água ou o ar húmidos, libertam uma quantidade perigosa de gases facilmente inflamáveis, com um débito mínimo de 1l/kg.h. Este limite não tem em conta a toxicidade do gás.

1.3. Princípio do método

O ensaio de substâncias abrange várias fases, a seguir descritas; se a inflamação ocorre em qualquer uma destas fases, já não é necessário prosseguir o ensaio.

1.3.1. *Fase 1*

Colocar a substância num cadinho que contenha água destilada a 20 °C e observar se o gás se inflama ou não.

1.3.2. *Fase 2*

Colocar a substância sobre um papel de filtro a flutuar em água destilada a 20 °C contida numa cápsula, observar se o gás que se liberta se inflama ou não. O papel de filtro serve apenas para manter a substância imóvel, o que aumenta a probabilidade de inflamação.

1.3.3. *Fase 3*

Colocar a substância numa pilha de 2 cm de altura e de 3 cm de diâmetro, aproximadamente. Juntar algumas gotas de água à pilha e observar se o gás que se liberta se inflama ou não.

1.3.4. *Fase 4*

Misturar a substância com água destilada a 20 °C e medir o débito de libertação do gás de uma em uma hora durante 7 horas. Se o débito for variável ou se aumentar após 7 horas, o tempo de medida deve ser prolongado até um máximo de 5 dias. O ensaio pode ser interrompido se, em dado momento, o débito exceder 1l/kg.h.

1.4. **Substâncias de referência**

Não especificadas.

1.5. **Critérios de qualidade**

Não indicados.

1.6. **Descrição dos métodos**

1.6.1. *Fase 1*

1.6.1.1. Condições do ensaio

A substância é utilizada na sua forma comercial e o ensaio é realizado à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

1.6.1.2. Desenrolar do ensaio

Colocar uma pequena quantidade (cerca de 2mm de diâmetro) da substância num cadinho com água destilada. Anotar se: i) há libertação de gás; ii) o gás se inflama. Se o gás se inflamar, é desnecessário prosseguir o ensaio, sendo desde já de se considerar a substância como perigosa.

1.6.2. *Fase 2*

1.6.2.1. Equipamento

Papel de filtro flutuando na superfície da água destilada em recipiente adequado, por ex., uma cápsula de 100 mm de diâmetro.

1.6.2.2. Condições do ensaio

A substância é utilizada na sua apresentação comercial e o ensaio é realizado à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

1.6.2.3. Desenrolar do ensaio

Colocar uma pequena quantidade da substância de ensaio (cerca de 2 mm de diâmetro) no centro de um papel de filtro. Anotar se: i) há libertação de gás e ii) o gás se inflama. Se o gás se inflamar não é necessário prosseguir o ensaio da substância, sendo esta desde logo considerada como substância perigosa.

1.6.3. *Fase 3*

1.6.3.1. Condições de ensaio

A substância é utilizada na sua forma comercial e o ensaio é realizado à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

1.6.3.2. Desenrolar do ansaio

Pôr a substância numa pilha de 2 cm de altura e de aproximadamente 3 cm de diâmetro, tendo no cimo uma pequena reentrância. Adicionar algumas gotas de água na concavidade e anotar se: i) há libertação de gás; ii) o gás se inflama. Se o gás se inflamar, não é necessário prosseguir o ensaio da substância, sendo esta considerada desde logo como substância perigosa.

1.6.4. *Fase 4*

1.6.4.1. Equipamento

A montagem do equipamento é indicada na figura em apêndice.

1.6.4.2. Condições do ensaio

Assegurar que o recipiente que contém a substância está livre de partículas pulverulentas (< 500 µm). Se estas representarem mais de 1 %, em peso, do total ou se a amostra for friável, deve reduzir-se a dimensão das partículas durante a armazenagem e a manipulação; caso contrário, a substância será utilizada na forma comercial. Realizar o ensaio à temperatura ambiente (20 °C) e à pressão atmosférica.

1.6.4.3. Desenrolar do ensaio

Deitar água no funil de carga do aparelho. Pesar e colocar no vaso cónico uma quantidade suficiente de substância com um peso máximo de 25 g, a fim de se obter uma libertação de gás de 100 a 250 cm^3. Medir por qualquer meio adequado o volume de gás libertado. Abre-se a torneira do funil para deixar entrar a água no vaso cónico e liga-se o cronómetro. Anotar o tempo necessário à libertação total do gás e, se possível, proceder a leituras intermédias. O ensaio deve ser realizado três vezes.

Se a identidade química do gás não for conhecida, este deve ser analisado. Se o gás contiver constituintes facilmente inflamáveis e se se ignorar se o conjunto da mistura é facilmente inflamável, preparar e ensaiar uma mistura com a mesma composição de acordo com o método (A.11).

2. RESULTADOS

Para que uma substância seja considerada como perigosa é suficiente que uma inflamação ou uma libertação de gás facilmente inflamável tenha um débito superior a 1 l/kg.h nos três ensaios (1.6.1, 1.6.2 e 1.6.3).

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório deve incluir, se possível, os dados seguintes:

— indicação e descrição precisa da substância tal como foi recebida (por ex.: cor, dimensão das partículas, estado físico),

— qualquer preparação inicial da substância,

— resultados dos ensaios,

— identificação química do gás libertado,

— débito do gás libertado (1.6.4),

— todas as informações pertinentes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

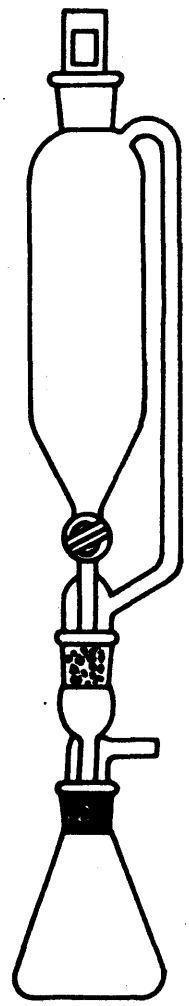
(1) ISO 1773.

(2) OECD, Paris, *Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances wich give off Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water*, A 80/28 - Final report of the OECD chemical testing programme.

(3) UN doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1.

Apêndice

Figura
Montagem do equipamento



A. 13. INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS E LÍQUIDOS)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

É útil dispor de informações preliminares sobre a auto-inflamabilidade duma substância. O processo de ensaio é aplicável às substâncias sólidas e líquidas tal como comercializadas, sujeitas a inflamar-se espontaneamente em pequenas quantidades, pouco tempo após terem entrado em contacto com o ar à temperatura ambiente.

As substâncias não cobertas por este método são aquelas cuja inflamação espontânea apenas ocorra após várias horas ou dias de exposição à temperatura ambiente ou aquelas que só se inflamam espontaneamente após exposição a uma temperatura consideravelmente elevada.

1.2. Definições e unidades

Os líquidos e os sólidos são considerados como facilmente inflamáveis se se inflamam espontaneamente pelo menos uma vez em cada seis ensaios praticados nas condições descritas no ponto 1.6.

A auto-inflamabilidade dos líquidos pode igualmente necessitar de ser testada segundo o método citado no ponto A.15.: Auto-inflamabilidade: determinação da temperatura de auto-inflamabilidade dos líquidos e gases voláteis.

1.3. Substâncias de referência

Não especificadas.

1.4. Princípio do método

A substância é posta em contacto com o ar à temperatura de 25 ± 10 °C durante 5 minutos. Caso haja inflamação a substância é considerada como facilmente inflamável.

1.5. Critérios de qualidade

Reprodutibilidade: dada a importância de que o aspecto da segurança se reveste; um só resultado positivo em 6 ensaios é suficiente para concluir que a substância é altamente inflamável.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. *Equipamento*

Encher uma cápsula de porcelana com cerca de 10 cm de diâmetro com terra de infusórios (diatomáceas), com uma espessura de cerca de 5 mm, à temperatura ambiente.

Nota:

A terra de infusórios ou qualquer outra substância inerte semelhante que se encontre disponível, será considerada representativa do solo no qual a substância pode acidentalmente ser espalhada.

1.6.2. *Realização do ensaio*

a) Sólidos pulverulentos

Deitar 1 ou 2 cm^3 da substância pulverulenta a ensaiar duma altura de cerca de 1m sobre uma superfície não combustível e observar se a substância se inflama durante a queda ou durante os 5 primeiros minutos em que se encontrar depositada;

b) Líquidos

Deitar cerca de 5 cm^3 do líquido a ensaiar numa cápsula de porcelana preparada e observar se ele se inflama num intervalo de 5 minutos.

2. **RESULTADOS**

Para a avaliação são necessários os resultados de 6 ensaios.

3. **RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório deve conter, se possível, os dados seguintes:

— descrição da substância a ensaiar,

— resultados do ensaio.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, *Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids*. A80/23 — Final report for the OECD chemical testing programme.

A. 14. PROPRIEDADES EXPLOSIVAS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Trata-se de um método de ensaio que permite determinar se uma substância ou preparação sólida, líquida ou pastosa apresenta ou não perigo de explosão, desde que sujeita ao efeito duma chama (sensibilidade térmica), ao choque ou à fricção (sensibilidade aos estímulos mecânicos).

O método compreende três partes:

a) Ensaio de sensibilidade térmica;

b) Ensaio de sensibilidade mecânica (choque);

c) Ensaio de sensibilidade mecânica (fricção).

O método fornece os dados que permitem avaliar a probabilidade que certos estímulos comuns têm de desencadear uma explosão. Não tem por fim determinar se uma substância ou uma preparação é ou não susceptível de explodir em certas condições, nem de determinar em que medida a decomposição inicial se pode propagar e causar a explosão de toda a amostra.

O método é capaz de determinar se uma substância ou preparação apresenta um perigo de explosão (sensibilidade térmica e mecânica) nas condições especiais definidas pela directiva. Os ensaios são irrelevantes se os dados termodinâmicos disponíveis (calor de formação, calor de decomposição, ausência de certos grupos reactivos (1) na fórmula de estrutura) permitem estabelecer de forma razoavelmente segura que a substância ou a preparação não é susceptível de se decompor, de formar gases e de desenvolver calor muito rapidamente (isto é, o material não deve apresentar riscos de explosão). Admite-se, no entanto, que o método não tem um valor definitivo. Inclui um certo número de tipos seleccionados de aparelhos específicos, largamente utilizados a nível internacional e que dão, regra geral, resultados significativos.

O experimentador pode preferir um outro tipo de aparelhos para os 3 métodos atrás citados com a condição de que essa escolha seja justificada cientificamente e que a aparelhagem seja reconhecida a nível internacional. Neste caso deve ser determinada a correlação dos seus resultados com os obtidos com os aparelhos especificados.

1.2. Definições e unidades

Substâncias e preparações explosivas:

As susceptíveis de explodir sob o efeito de uma chama ou que são mais sensíveis ao choque ou à fricção do que o dinitrobenzeno.

1.3. Substâncias de referência

Meta-dinitrobenzeno, produto técnico cristalizado para os ensaios por fricção e por choque.

1.4. Princípio do método

E necessário um teste preliminar de protecção para determinar as condições de segurança que devem orientar a execução dos três ensaios de sensibilidade.

1.4.1. *Ensaio preliminar de protecção*

As amostras em quantidades muito reduzidas (cerca de 10 mg) de substância ou de preparação são submetidas: ao aquecimento sem limite a uma chama de um bico de Bunsen, ao choque com todas as formas adequadas de instrumentos e à fricção utilizando um malho e uma bigorna ou qualquer outro tipo de dispositivo de fricção. Tem por objectivo determinar até que ponto a substância é sensível e explosiva, de forma que os ensaios de sensibilidade prescritos se realizem com certas precauções, a fim de evitar quaisquer danos corporais ao experimentador.

1.4.2. *Sensibilidade térmica*

Este método consiste em aquecer a substância ou preparação num tubo de aço com diferentes graus de confinamento, seguros por placas com orifícios de arejamento de diferentes diâmetros, para determinar se a substância ou a preparação são susceptíveis de explodir sob constrangimento térmico.

1.4.3. *Sensibilidade mecânica (choque)*

O método consiste em submeter a substância ou preparação ao choque de um malho sobre uma bigorna em aço.

1.4.4. *Sensibilidade mecânica (fricção)*

Consiste em submeter a substância ou a preparação a uma fricção entre superfícies padrão, em condições especificadas de carga e movimento relativo.

1.5. **Critérios de qualidade**

Não estabelecidos.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Equipamento*

1.6.1.1. Sensibilidade térmica (efeito de chama)

O tubo de aço é feito de chapa batida a frio (ver apêndice) por um processo de estiragem, com as seguintes dimensões: diâmetro interior-24mm; comprimento-75mm; espessura da parede-0,5mm. Na sua extremidade aberta tem uma manilha de fecho (fig.1). É munido ainda de uma placa circular de ligação com um orifício central, resistente à pressão. Esta placa está solidamente fixada ao tubo por uma junta roscada de duas partes (porca e cabeça de porca). A cabeça de placa (ver fig.1) tem uma espessura de 6mm e é constituída de aço-crómio resistente ao calor (ver apêndice).

O experimentador dispõe de uma série de placas de ligação, cujos respiradouros apresentam diferentes diâmetros (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20....mm) para determinar o grau de risco de explosão que a substância ou a preparação apresenta. A porca e a cabeça de porca (fig.1) são em aço crómio-manganésio (ver apêndice), não dando origem a faíscas até 800 °C. Os tubos em aço só são utilizados numa experiência.

1.6.1.2. Sensibilidade mecânica (choque)

O material típico para queda de peso é constituído essencialmente por: bloco de ferro fundido (ferro-fundido cinzento), uma base e uma bigorna, coluna, guias, peso de queda e um mecanismo de libertação. O bloco de aço (comprimento × largura × altura = 230 × 250 × 200 mm) com uma base moldada (comprimento × largura × altura = 450 × 450 × 60 mm), sustém a bigorna de aço de 100 mm de diâmetro e 70 mm de altura sobre o qual ela é aparafusada. O suporte é aparafusado nas costas do bloco e neste mesmo suporte é fixada a coluna, que consiste num tubo de aço estirado sem soldadura de 90 mm de diâmetro exterior e 70 mm de diâmetro interior. Quatro parafusos cravados num bloco de

betão de 60 x 60 x 60 cm mantêm o peso de queda, de forma que as guias fiquem absolutamente verticais e assegurem uma queda fácil. O peso de 10 kg é em aço temperado; deve haver uma superfície de impacto em aço temperado HRC 60 a 63 com um diâmetro mínimo de 25 mm. No ensaio, a altura da queda é de 0,4 m.

A substância a ensaiar é colocada numa matriz constituída por dois cilindros coaxiais em aço temperado, colocado um por cima do outro e um cilindro de aço oco que se destina a servir de anel de orientação. Os cilindros coaxiais devem ter um diâmetro de 10 ($-0{,}003$, $-0{,}005$) mm, uma altura de 10 mm, superfícies polidas e arestas arredondadas (raio da curvatura: 0,5 mm) e dureza: HCR 58 a 65. O cilindro oco tem um diâmetro exterior de 16 mm, um orifício polido de 10 ($+ 0{,}005$, $+ 0{,}010$) mm, e uma altura de 13 mm. Se a explosão se produzir, não devem ser reutilizados em novos ensaios os cilindros de aço e o cilindro oco. A matriz é colocada sobre uma bigorna intermédia em aço de 26 mm de altura e centrada por um anel de centragem e um anel de travagem, a fim de eliminar os gases produzidos pela explosão.

1.6.1.3. Sensibilidade mecânica (fricção)

O aparelho para o ensaio por fricção consiste numa placa de base fundida (ferro fundido cinzento), sobre o qual se monta o dispositivo de fricção propriamente dito, que compreende um munhão de veio fixo em porcelana e várias placas móveis de porcelana. A placa de porcelana é fixada numa corrediça que se desloca entre dois carris. A corrediça é accionada por uma barra transmissora, uma roldana excêntrica e uma engrenagem de transmissão com motor eléctrico, de forma que a placa de porcelana se desloque numa distância de 10 mm, para trás e para a frente da barra transmissora. O munhão de porcelana é carregado com uma carga de cerca de 360 newtons.

As placas de porcelana são feitas de porcelana técnica branca com as dimensões: comprimento = 25 mm, largura = 25 mm e altura = 5 mm. Ambas as superfícies de fricção das placas são tornadas ásperas antes de serem incendiadas por fricção, com uma esponja (profundidade média 9 a 32 µm).

O munhão cilíndrico é igualmente de porcelana técnica branca: comprimento = 15 mm, diâmetro = 10 mm, com extremidades esféricas e rugosas (raio de curvatura de 10 mm).

1.6.2. *Condições de ensaio*

1.6.2.1. Sensibilidade térmica (efeito de chama)

Colocar a substância, 3 vezes em quantidades iguais, na forma física tal como é fornecida, no tubo, até uma altura de 60 mm. Comprimir ligeiramente de cada vez, aplicando uma força de 80 newtons sobre a superfície com a ajuda de um pistão em madeira adequada e de diâmetro ligeiramente inferior ao do tubo. Se a substância for gelatinosa, evitar a formação de bolhas de ar durante o enchimento.

1.6.2.2. Sensibilidade mecânica (choque)

Testar a substância no estado seco. A amostra deve ter um volume de 40 mm^3, ou ser compatível à aparelhagem indicada. No que diz respeito às substâncias sólidas, com excepção das pastosas, proceder da seguinte forma:

a) Peneirar as substâncias pulverulentas (malha de 0,5 mm); tudo o que passar na peneira é utilizado no ensaio.

b) Desagregar e peneirar as substâncias comprimidas, moldadas ou condensadas; a fracção peneirada (diâmetro de 0,5 a 1 mm) é utilizada no ensaio.

Para as substâncias líquidas, empurrar para baixo o cilindro superior de aço até à distância de 1 mm do cilindro inferior e mantê-lo nesta posição.

1.6.2.3. Sensibilidade mecânica (fricção)

Testar a substância no estado seco. A amostra deve ter um volume de 10 mm^3. Para as substâncias sólidas, com excepção das pastosas, proceder da forma seguinte:

a) Peneirar as substâncias pulverulentas (malha de 0,5 mm); tudo o que passar através da peneira é utilizado no ensaio;

b) Desagregar e peneirar as substâncias comprimidas, moldadas ou condensadas; a fracção peneirada (diâmetro < 0,5 mm) é utilizada no ensaio.

1.6.3. *Desenvolvimento do ensaio*

1.6.3.1. Sensibilidade térmica (efeito da chama)

O aquecimento é assegurado pelo gás propano, proveniente de uma garrafa de gás comprimido industrial equipada com um regulador de pressão (500 mbar), um fluxómetro e distribuído para os quatro queimadores. Estes consomem 3,2 litros de propano por minuto. Se forem utilizados outros gases, terão de ser escolhidos queimadores adequados, o consumo de gás e a entrada de ar de modo que as medições comparativas efectuadas com as substâncias inertes (areia, ftalato de dibutilo) mostrem nos tubos cheios, curvas temperatura/tempo semelhantes às obtidas com o gás propano.

Os queimadores estão situados à volta da câmara de ensaio, como indicado na figura 2.

Ajustar os queimadores de tal modo que a ponta do cone interno azul da chama quase toque o tubo. O ensaio será efectuado numa câmara em aço, cujas dimensões são indicadas na figura 2.

As dimensões dos queimadores de propano estão indicadas nas figuras 3a e 3b.

São obrigatórias 2 séries de 3 ensaios. A primeira utilizando uma placa ajustável com um orifício de 2 mm de diâmetro e a segunda com um orifício de diâmetro superior a 2 mm (por exemplo 6 mm).

Se a explosão se produzir durante a primeira série (orifício de 2 mm), já não é necessário proceder às séries de ensaios seguintes. Se a explosão não se produzir após 5 minutos, o ensaio está terminado.

1.6.3.2. Sensibilidade mecânica (choque)

Serão realizados 6 ensaios com o aparelho de ensaio indicado para o choque, com uma massa de 10 kg que cai de 0,4 metros. Noutros aparelhos, a amostra é comparada com o m-dinitrobenzeno, de acordo com um processo estabelecido (técnica de « up-and-down », etc.).

1.6.3.3. Sensibilidade mecânica (fricção)

Colocar o munhão de veio em porcelana sobre a substância a ensaiar e enganchar os pesos. Na realização do ensaio, as marcas deixadas pela esponja sobre a placa de porcelana devem ser transversais em relação à direcção do movimento. Verificar se o munhão repousa sobre a amostra, se a quantidade de substância a ensaiar é suficiente e se a placa se desloca correctamente sob o munhão, isto é, para que ele execute um movimento de vaivém numa distância de 10 mm em cada direcção e isto em 0,44 segundos. Utilizar apenas uma parte da superfície para cada ensaio.

2. RESULTADOS

2.1. Tratamento dos resultados

Os ensaios podem ser interrompidos desde que seja obtido um resultado positivo num dos testes.

2.2. Avaliação

Em princípio, uma substância ou uma preparação é considerada como apresentando perigo de explosão, se:

a) Se produz uma explosão (isto é, se o tubo rebenta em 3 ou mais bocados) no número fixado de ensaios de sensibilidade térmica;

ou se

b) Se produz uma explosão (a inflamação é equivalente a uma explosão) pelo menos uma vez durante 6 ensaios realizados com a ajuda do aparelho de ensaio por choque indicado, ou se a amostra é mais sensível do que o m-dinitrobenzeno quando um teste alternativo por choque for realizado;

ou se

c) Se produz uma explosão (a deflagração ou a inflamação é equivalente a uma explosão) pelo menos uma vez durante 6 ensaios realizados com o aparelho de fricção indicado, ou se a amostra é mais sensível do que o m-dinitrobenzeno, quando é realizado um teste alternativo por fricção.

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

3.1. Relatório

O relatório deve conter, se possível, os seguintes dados:

— identificação, composição, pureza, grau de humidade, etc., da substância ou da preparação de ensaio,

— estado físico da amostra; precisar se foi ou não peneirada,

— observações durante o ensaio (tipo de reacção, faíscas, chama, explosão, número de fragmentos, etc.),

— resultados de cada ensaio,

— se for utilizado um outro aparelho, declarar as justificações científicas da sua utilização, e a correlação entre os resultados obtidos com o aparelho equivalente e o aparelho especificado,

— todas as observações úteis, nomeadamente referências aos ensaios praticados com produtos similares, susceptíveis de serem pertinentes para a interpretação correcta dos resultados.

3.2. Interpretação e avaliação dos resultados

O relatório deve conter os resultados considerados como errados, anormais ou não representativos. Sempre que um dos resultados é rejeitado, dar uma explicação e indicar os resultados de outro ensaio alternativo ou suplementar.

Por vezes, o resultado pode ser falseado devido à forma física ou à natureza volátil da substância ou da preparação durante o ensaio; neste caso, é útil conhecer o resultado que se obteria se a substância ou a preparação fossem utilizadas na sua forma comercial. Ensaios alternativos podem permitir a obtenção destes dados. A não ser que se possa explicar deste modo um resultado anómalo, ele deve ser aceite tal e qual e utilizado consequentemente para classificar a substância ou a preparação.

4. REFERÊNCIAS

(1) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, London. Butterworths, 1979, p. 60-63.

(2) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, Vol. 3, 1955, p. 57-65 und p. 89-93.

(3) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Empfindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Öffnungen (Stahlhusenverfahren), Explosive Stoffe, Vol. 4, 1956, p. 119-125, 143-148.

(4) Koenen, H., Ide, K. H., Haupt W., Über die Prüfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinoser Beschaffenheit, Explosive Stoffe, Vol. 6, 1958, p. 178-189, 202-214 und 223-235.

(5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (document ST/SG/AC/.10/5/Add.3, Table 4.3).

Apêndice

Exemplos da especificação do material

(1) Spécification nº 1.0336.505 g, conformément à DIN 1623, feuille 1

(2) Spécification nº 1.4873, conformément à la feuille « Stahl-Eisen-Werkstoff » 490-52.

(3) Spécification nº 1.3817, conformément à la feuille « Stahl-Eisen-Werkstoff » 490-52.

Figura 1

(dimensões em milímetros)

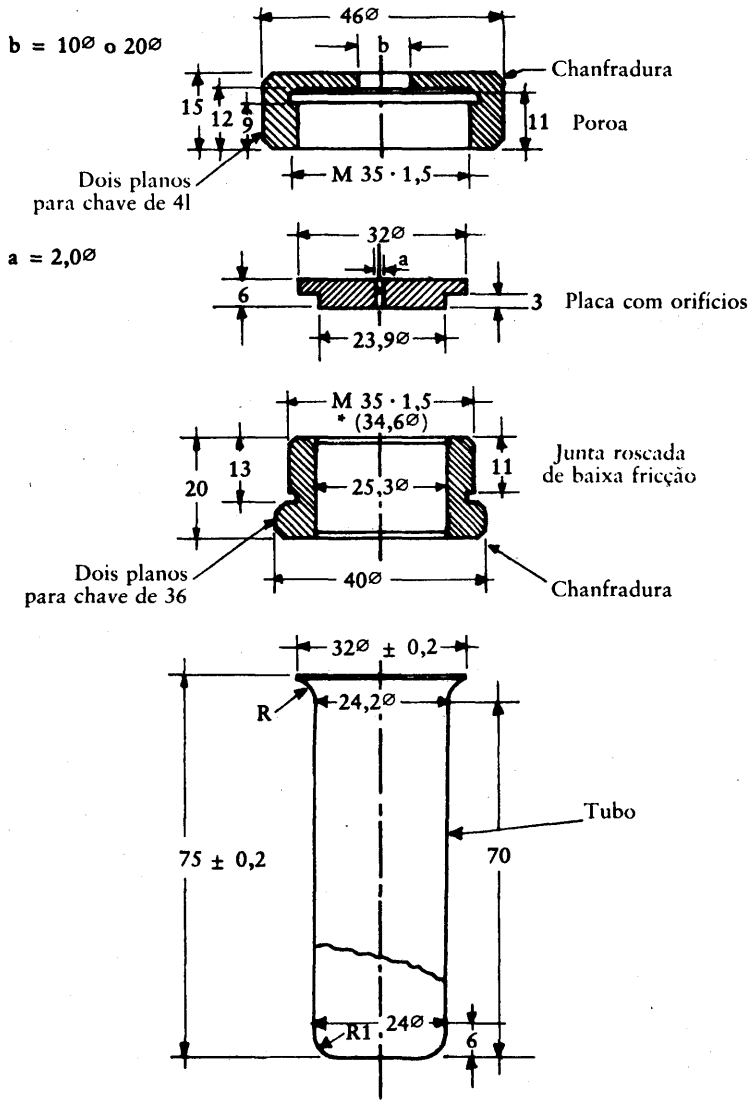


Figura 2

(dimensões em milímetros)

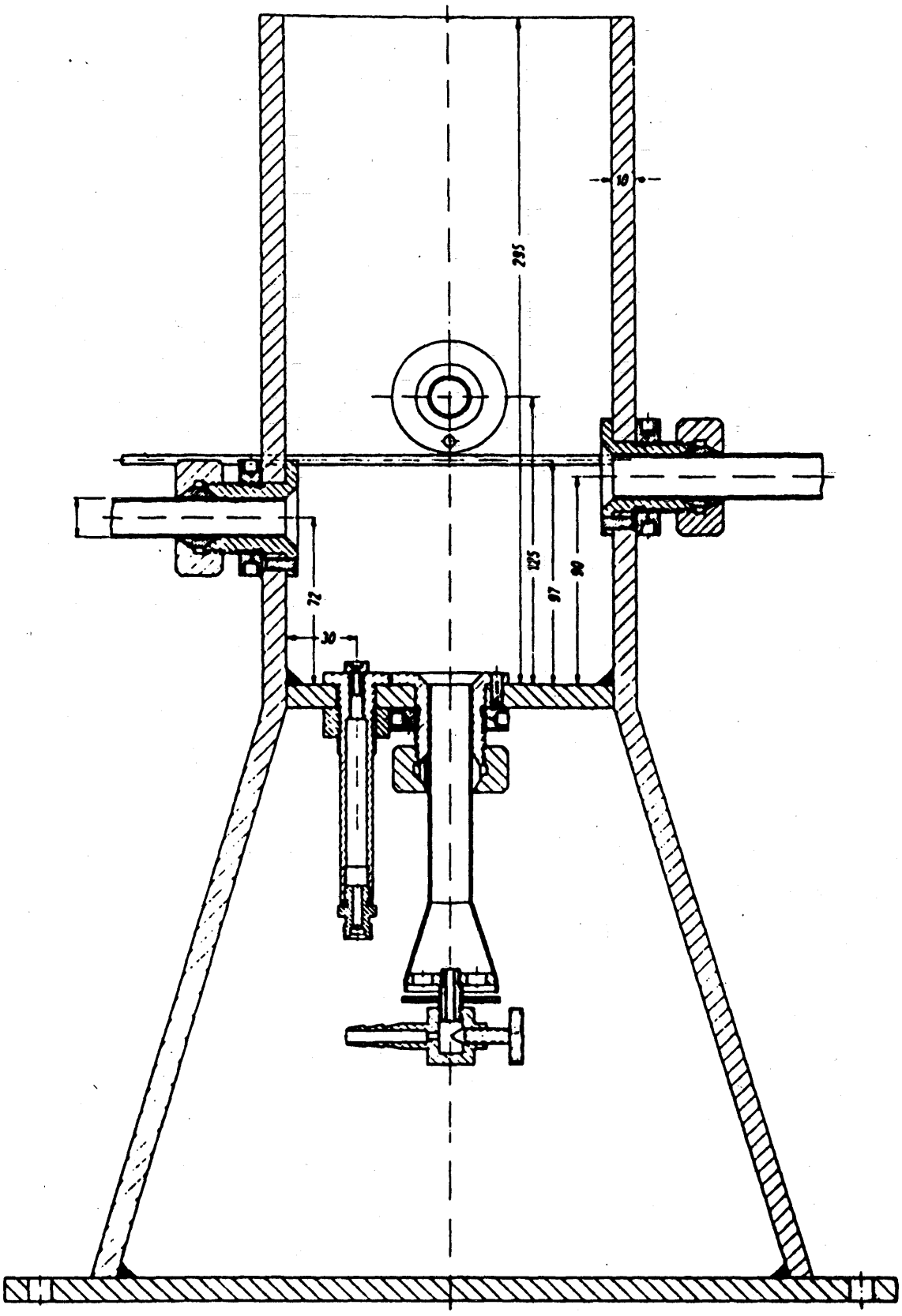


Figura 3a

Material: latão

(dimensões em milímetros)

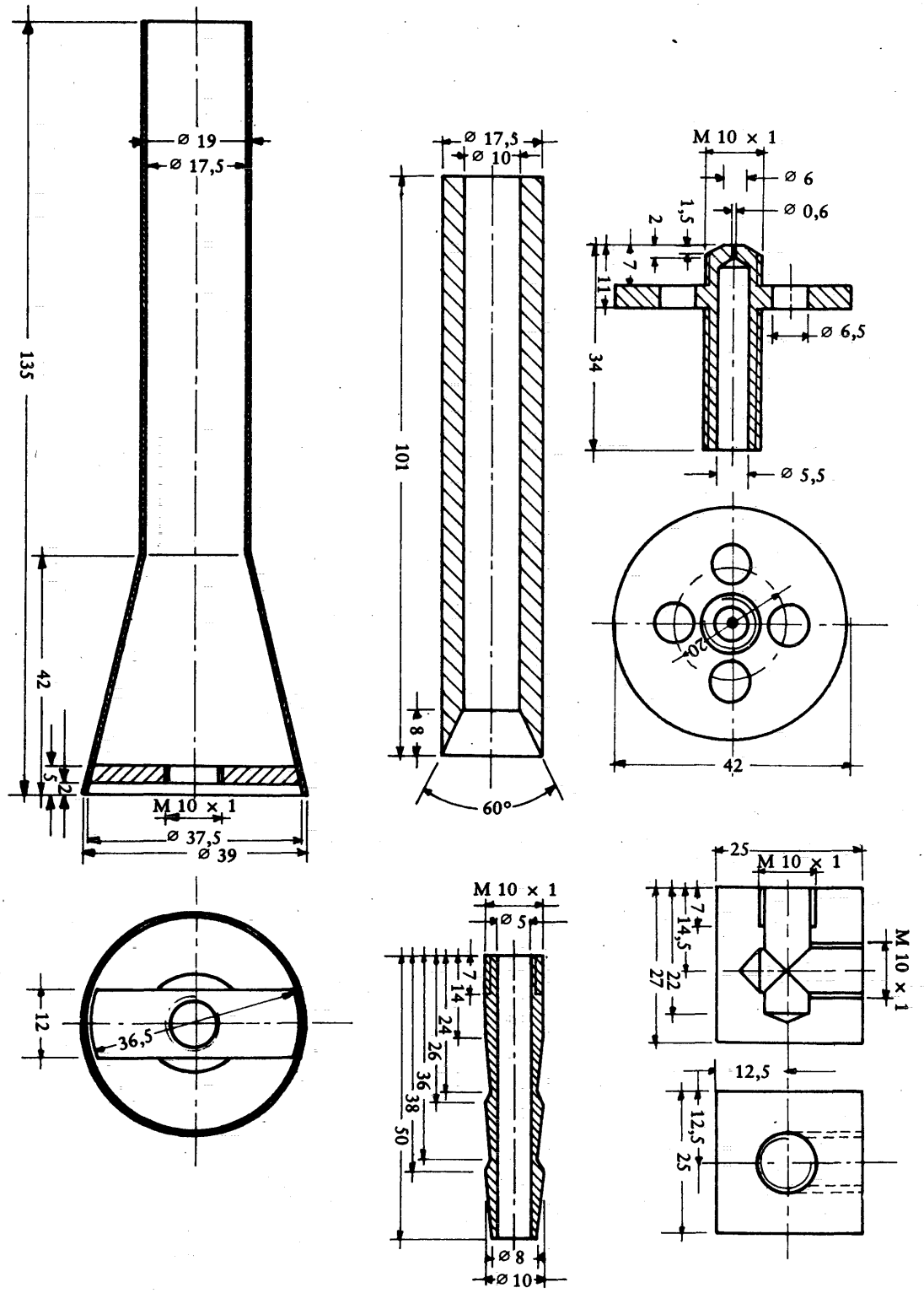
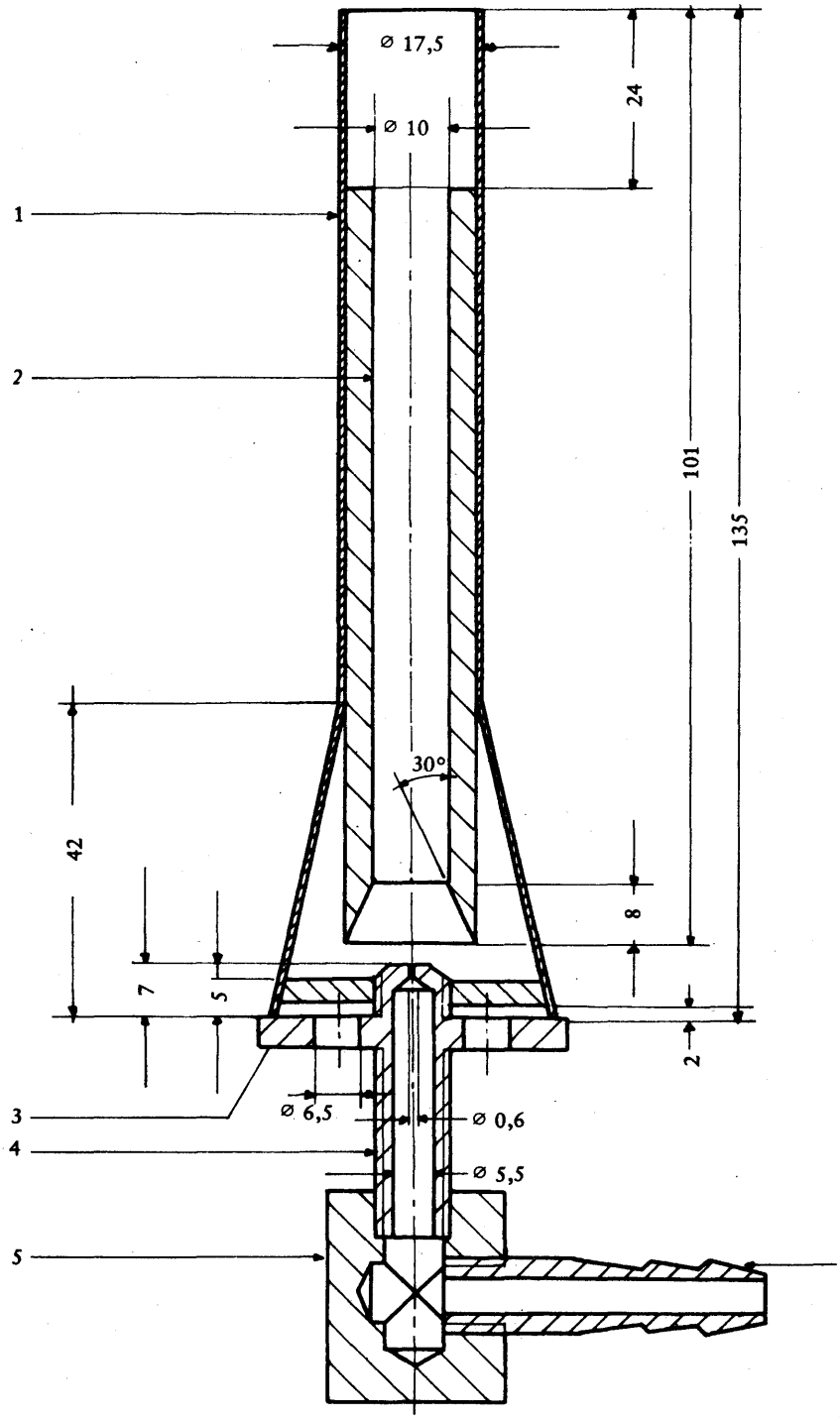


Figura 3b

Material: latão

(dimensões em milímetros)



A.15. AUTO-INFLAMABILIDADE (DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA RELATIVA DE AUTO-IGNIÇÃO DOS LÍQUIDOS VOLÁTEIS E DOS GASES)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

É útil dispor de informações preliminares sobre a auto-inflamabilidade de uma substância. A técnica seguidamente descrita é aplicável às substâncias gasosas e líquidas voláteis e aos seus vapores que, nas suas formas comerciais, podem ser inflamados por uma superfície quente em presença do ar. A temperatura de auto-inflamibilidade pode ser consideravelmente reduzida pela presença de impurezas catalíticas.

1.2. Definições e unidades

O grau de auto-inflamibilidade é expresso em termos da temperatura de auto-ignição.

A temperatura de auto-ignição é a mais baixa temperatura a que se inflama a substância de ensaio misturada com ar e nas condições definidas no método de ensaio.

1.3. Substâncias de referência

Não especificadas.

1.4. Príncipio do método

A auto-inflamabilidade dos gases e vapores é determinada por meio do aparelho descrito na norma ± EC 79-4.

1.5. Critérios de qualidade

A reprodutibilidade é função do intervalo de temperatura de auto-ignição e do método utilizado: máximo ± 0,5°C.

A sensibilidade depende do método de ensaio utilizado.

A especificidade depende igualmente do método utilizado.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Aparelho*

O aparelho encontra-se descrito no método referido no ponto 1.6.3.

1.6.2. *Condições do ensaio*

É ensaiada uma amostra da substância de acordo com o ponto 1.6.3.

1.6.3. *Desenvolvimento do ensaio*

Ver as normas ± EC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78 e BS 4056.

2. **RESULTADOS**

Anotar a temperatura do ensaio, a pressão atmosférica, a quantidade da amostra utilizada e o intervalo de tempo que decorre antes de se produzir a ignição.

3. **RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório deve conter, se possível, as seguintes informações:

— indicação precisa da substância (identificação e impurezas),

— quantidade da amostra utilizada e pressão atmosférica,

— resultados das medições (temperaturas do ensaio, resultados referentes à ignição e intervalos de tempo correspondentes),

— qualquer observação útil complementar para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

A.16. AUTO-INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS — DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA RELATIVA DE AUTO-IGNIÇÃO)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

As substâncias explosivas e as que sofrem combustão espontânea em contacto com o ar à temperatura ambiente não devem ser submetidas a este ensaio.

O objectivo é, pois, fornecer dados preliminares sobre a inflamabilidade espontânea das substâncias sólidas a temperatura elevada.

Se o calor libertado, quer por uma reacção da substância com o oxigénio, quer por decomposição exotérmica, não se dissipa com suficiente rapidez no ambiente, o auto-aquecimento provoca uma auto-ignição. Esta produz-se, por consequência, sempre que a velocidade da produção de calor excede a velocidade de dissipação do mesmo.

O processo de ensaio é útil mesmo como teste preliminar de protecção das substâncias sólidas. Tendo em conta a natureza complexa da ignição e da combustão de sólidos, a temperatura de auto-ignição determinada segundo este método só serve para fins comparativos.

1.2. Definição e unidades

A temperatura de auto-ignição, tal como é determinada por este método, é a temperatura ambiente mínima expressa em graus Celsius (°C), à qual um certo volume de uma substância sofre ignição espontânea em condições definidas.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

Colocar um volume definido da substância a ensaiar num forno à temperatura ambiente; fazer aumentar a temperatura do forno ate 400°C a uma velocidade de 0,5°C por minuto e registar a curva temperatura/tempo determinada no centro da amostra. A temperatura do forno, à qual a temperatura da amostra atinge 400°C por auto-aquecimento, é chamada temperatura de auto-ignição, para os fins do presente ensaio.

1.5. Critérios de qualidade

Nenhuns.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Equipamento*

1.6.1.1. Forno

Forno de laboratório de temperatura programada (volume: cerca de 2 l), equipado com circulação de ar natural e válvula de explosão. Deve garantir que os gases de decomposição não possam entrar em contacto com as resistências eléctricas de aquecimento, evitando-se assim qualquer risco potencial de explosão.

1.6.1.2. Cubo de rede em arame

Cortar, seguindo o modelo indicado na figura 1 (Ver apêndice) um pedaço de rede em arame de aço inoxidável, com largura de malha de 0,045 mm. Dobrar a rede em forma de cubo aberto, isto é, sem a face superior e fixá-la com arame.

1.6.1.3. Termopares

Termopares adequados.

1.6.1.4. Registador

Qualquer registador de 2 canais, calibrado de 0 a 600°C ou a tensões correspondentes.

1.6.2. *Condições do ensaio*

O ensaio incidirá sobre as substâncias tal como se apresentam na sua forma comercial.

1.6.3. *Desenvolvimento do ensaio*

Encher o cubo da substância a ensaiar. Comprimi-la suavemente e juntar nova quantidade até encher completamente o cubo. Suspender a amostra no centro do forno à temperatura ambiente. Colocar um termopar no centro do cubo e outro entre este e a parede do forno, para registo da temperatura deste.

As temperaturas do forno e da amostra são registadas continuamente, elevando a temperatura do forno até 400°C, ou até ao ponto de fusão do sólido (se este valor for menor) a uma velocidade de 0,5°C/minuto.

Logo que a substância sofrer ignição, o termopar da amostra indicará uma forte subida de temperatura em relação à temperatura do forno.

2. RESULTADOS

É pertinente para a avalia, a temperatura do forno à qual a temperatura da amostra atinge 400°C por auto-aquecimento (Ver figura 2).

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

Do relatório devem constar os seguintes dados:

— descrição da substância,

— resultados das medições, incluindo a curva temperatura/tempo,

— quaisquer observações complementares, pertinentes para interpretação dos resultados.

4. REFERÊNCIAS

Nenhuma.

Apêndice

Figura 1

Modelo do cubo de ensaio de 20 mm

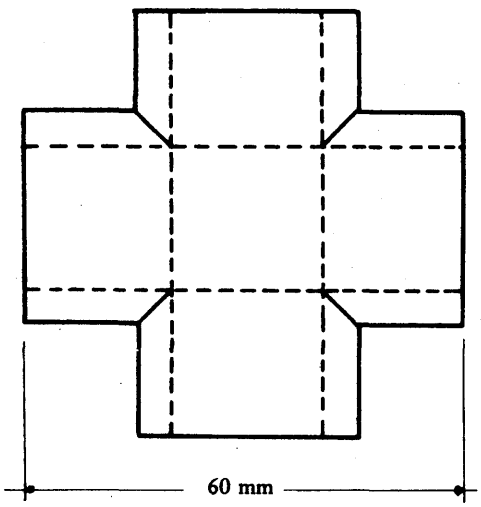
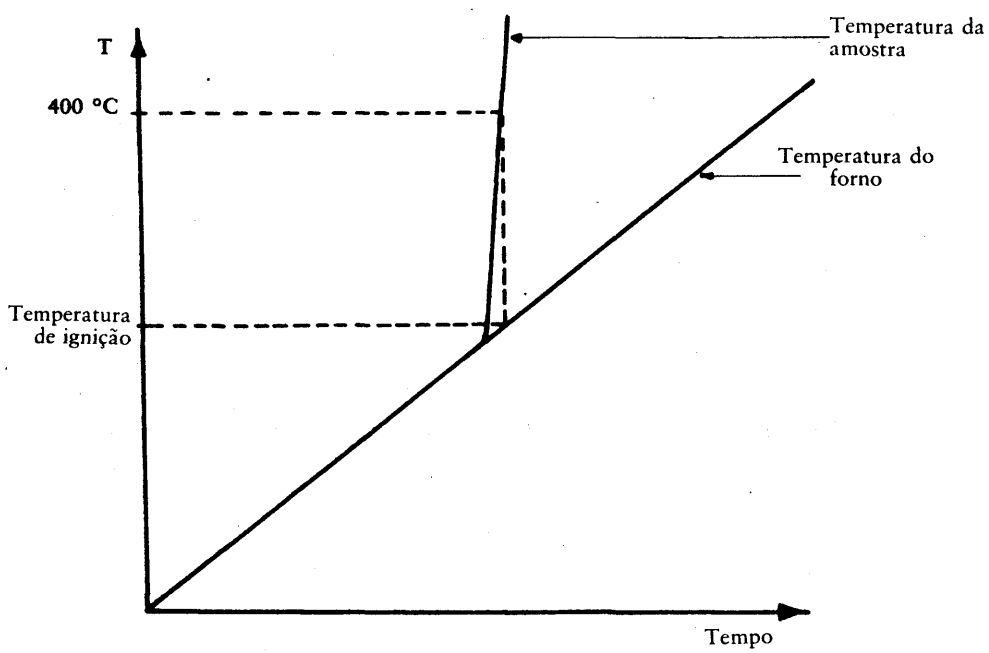


Figura 2

Curva tipo da temperatura/tempo



A.17. PROPRIEDADES COMBURENTES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Antes de efectuar este ensaio é útil possuir informações preliminares sobre propriedades potencialmente explosivas e toxicidade eventual da substância.

Não é aplicável aos líquidos, gases, substâncias explosivas ou facilmente inflamáveis, peróxidos orgânicos e substâncias sólidas que possam fundir nas condições do ensaio.

Este ensaio é irrelevante quando pelo exame da estrutura química se demonstrar indubitavelmente que a substância ou a preparação não dá reacção exotérmica com um combustível.

Deve ser efectuado um ensaio prévio para assegurar que para este ensaio não são necessárias precauções especiais.

1.2. Definições e unidades

Tempo de combustão: tempo de reacção expresso em segundos, medido na zona de reacção que se propaga pelo volume da amostra segundo o processo descrito no ponto 1.6.

Velocidade de combustão: expressa em milímetros por segundo.

Velocidade máxima de combustão: o valor mais elevado das velocidades de combustão obtido com misturas que contenham 10 a 90 %, em peso, de comburente (oxidante).

1.3. Substâncias de referência

O nitrato de bário (de pureza analítica) é utilizado como substância de referência para o ensaio e ensaio preliminar.

O dicromato de potássio pode também ser utilizado no ensaio preliminar.

Devem ser tomadas precauções especiais para a manipulação do dicromato de potássio.

A mistura de referência é constituída por nitrato de bário e por celulose em pó, preparada de acordo com o ponto 1.6 e possuindo uma velocidade de combustão máxima (trata-se usualmente de uma mistura que contenha 60 %, em peso, de nitrato de bário).

1.4. Princípio do método

É feito um ensaio prévio por razões de segurança. Caso o ensaio preliminar mostre que a substância tem propriedades oxidantes é inútil o ensaio. Excluindo este caso, a substância ou a preparação é submetida ao ensaio completo.

Neste ensaio, a substância e um combustível definido são misturados em proporções variáveis. Cada uma destas misturas é então disposta numa pilha que é inflamada numa extremidade. A velocidade máxima de combustão determinada é comparada com a velocidade máxima de combustão da mistura de referência.

1.5. Critérios de qualidade

Se necessário, qualquer método de trituração e de mistura é válido, desde que a diferença entre a velocidade máxima de combustão obtida e a média aritmética não exceda 10 % nos 6 ensaios.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Ensaio preliminar*

Secar a substância, tal como se encontra comercializada. Depois, misturá-la grosseiramente com celulose ou serradura seca na proporção de 2:1 (Substância: celulose ou serradura) em peso; a mistura assim obtida é posta numa pequena pilha cónica, de 3,5 cm de diâmetro de base e de 2,5 cm de altura, por enchimento sem compressão de uma forma cónica adequada (por exemplo: um funil em vidro de laboratório, cujo tubo é fechado).

A pilha é então posta numa superfície fria, impermeável e não condutora, sobre a fonte de ignição. A fonte de ignição é composta por um fio metálico inerte de platina ou níquel (que pode ser aquecido até cerca de 1 000°C), colocado aproximadamente a 1 mm acima da superfície de ensaio e atravessando a base da pequena pilha cónica. O ensaio deve ser realizado numa hotte (Ver 1.6.3).

A fonte de ignição permanece ligada durante o teste.

A intensidade e duração da reacção resultante são observadas e anotadas.

A substância ou preparação deve ser considerada como oxidante se a reacção for vigorosa.

Sempre que haja dúvidas quanto ao resultado, é então necessário realizar o ensaio completo, a seguir descrito.

1.6.2. *Preparações*

1.6.2.1. Substância de ensaio

A amostra é tratada como se segue, a fim de se obter uma granulometria inferior a 0,125 mm: peneirar a substância tal como é comercializada. Triturar a fracção que restou, repetindo a operação tantas vezes quantas as necessárias para que toda a amostra passe através do peneiro.

Podem ser utilizados quaisquer métodos de trituração e peneiramento que respeitem os critérios de qualidade.

Secar a substância a 105°C até se obter um peso constante antes de se proceder à mistura. Se a temperatura de decomposição da substância for inferior a 105°C, a substância será secada a uma temperatura menos elevada.

1.6.2.2. Combustível

O combustível é a celulose em pó do tipo utilizado em cromatografia em camada fina ou em coluna. E adequada uma celulose cujo comprimento em mais de 85 % das fibras esteja compreendido entre 0,020 mm e 0,075 mm. O pó da celulose é peneirado num peneiro de 0,125 mm de malha.

Antes da preparação da mistura, secar a celulose a 105°C até obter um peso constante.

Se for utilizada serradura de madeira no ensaio preliminar, prepara-se uma serradura de madeira macia que passe no peneiro de 1 600 microns, que será misturada e depois seca durante 4 h em camadas de espessura inferior a 25 mm. A serradura é então arrefecida e conservada numa embalagem estanque e tão cheia quanto possível. Utiliza-se de preferência nas 24 h após a secagem.

1.6.2.3. Misturas

Preparar misturas de comburente e de celulose que contenham de 10 a 90 %, em peso, do comburente por adições de 10 %. Para os casos limites, utilizar misturas intermédias para determinar com maior precisão a velocidade máxima de combustão.

Nota:

As misturas de oxidante e de celulose devem ser tratadas como potencialmente explosivas e devem ser manipuladas com prudência.

Faz-se a pequena pilha utilizando uma forma metálica de secção triangular com 250 mm de comprimento, altura interior de 10 mm e largura interior de 20 mm.

Colocar de ambos os lados da forma uma armação metálica que exceda em 2 mm o bordo superior da secção triangular (Ver a figura no apêndice). Encher, sem comprimir, a forma com um ligeiro excesso da mistura. Após se ter deixado cair uma vez a forma de uma altura de 2 cm sobre uma superfície dura, eliminar o material excedentário por meio de uma raspadeira actuando obliquamente. Retirar então a armação metálica e nivelar a superfície do pó com um rolo. Dispor uma placa não combustível sobre a forma, inverter e desenformar.

1.6.2.4. Fonte de ignição

Utilizar a chama dum queimador de gás ou um fio de platina aquecido electricamente a 1 000°C.

1.6.3. *Condições de ensaio*

Colocar o monte numa hotte, perpendicularmente ao sentido da corrente de ar.

A velocidade de aspiração da hotte não deve variar durante os ensaios e deve ser suficiente para evitar que os fumos não se escapem para o laboratório. Coloca-se um resguardo em torno do aparelho.

Devido às propriedades higroscópicas da celulose e das substâncias a ensaiar, o ensaio deve ser realizado o mais rapidamente possível.

Aplicar uma chama ou o fio de platina incandescente a uma extremidade do monte. Medir o tempo de reacção numa distância de 200 mm, medido depois da zona de reacção ter percorrido uma distância inicial de 30 mm.

O ensaio é efectuado com a substância de referência. Em seguida efectua-se pelo menos uma vez o ensaio com cada uma das misturas, da substância a ensaiar com a celulose. Se se encontrar uma velocidade de combustão máxima significativamente maior do que a da substância de referência, o ensaio pode ser interrompido. De outro modo com as três misturas que deram as 3 velocidades de combustão mais elevadas, os ensaios devem ser repetidos 5 vezes.

2. **RESULTADOS**

Por razões de segurança será considerada a velocidade máxima de combustão e não a média das velocidades para caracterizar as propriedades comburentes da substância examinada.

Para considerar uma dada mistura, a velocidade de combustão mais elevada medida durante 6 ensaios.

Fazer um gráfico da velocidade de combustão mais elevada para cada mistura em função do teor de comburente.

Deduzir do gráfico a velocidade máxima de combustão.

As 6 velocidades de combustão medidas para a mistura que deu a velocidade máxima de combustão não devem desviar-se de mais de 10 % da média aritmética. Caso contrário importa melhorar os métodos de trituração e de mistura.

Comparar a velocidade máxima de combustão obtida com a velocidade máxima de combustão da mistura de referência (ver 1.3.).

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

3.1. Relatório

O relatório conterá, se possível, os elementos seguintes:

— descrição da substância a examinar,

— todos os tratamentos da amostra (por exemplo: trituração/ secagem, etc),

— resultados das medições,

— tipo de reacção (por exemplo: combustão rápida superficial, combustão envolvendo toda a massa, quaisquer observações referentes aos produtos de combustão, etc.),

— todas as observações adicionais úteis à interpretação dos resultados, incluindo uma descrição da intensidade (chama, faísca, fumos, lentidão da incandescência,etc.) e a duração aproximada da reacção observada durante o teste preliminar de protecção para a substância e para a substância de referência.

3.2. Interpretação dos resultados

Uma substância é considerada como comburente quando:

a) No ensaio preliminar ela tem uma reacção vigorosa;

b) No ensaio, a velocidade máxima de combustão é superior ou igual à da mistura de referência celulose e nitrato de bário.

4. REFERÊNCIAS

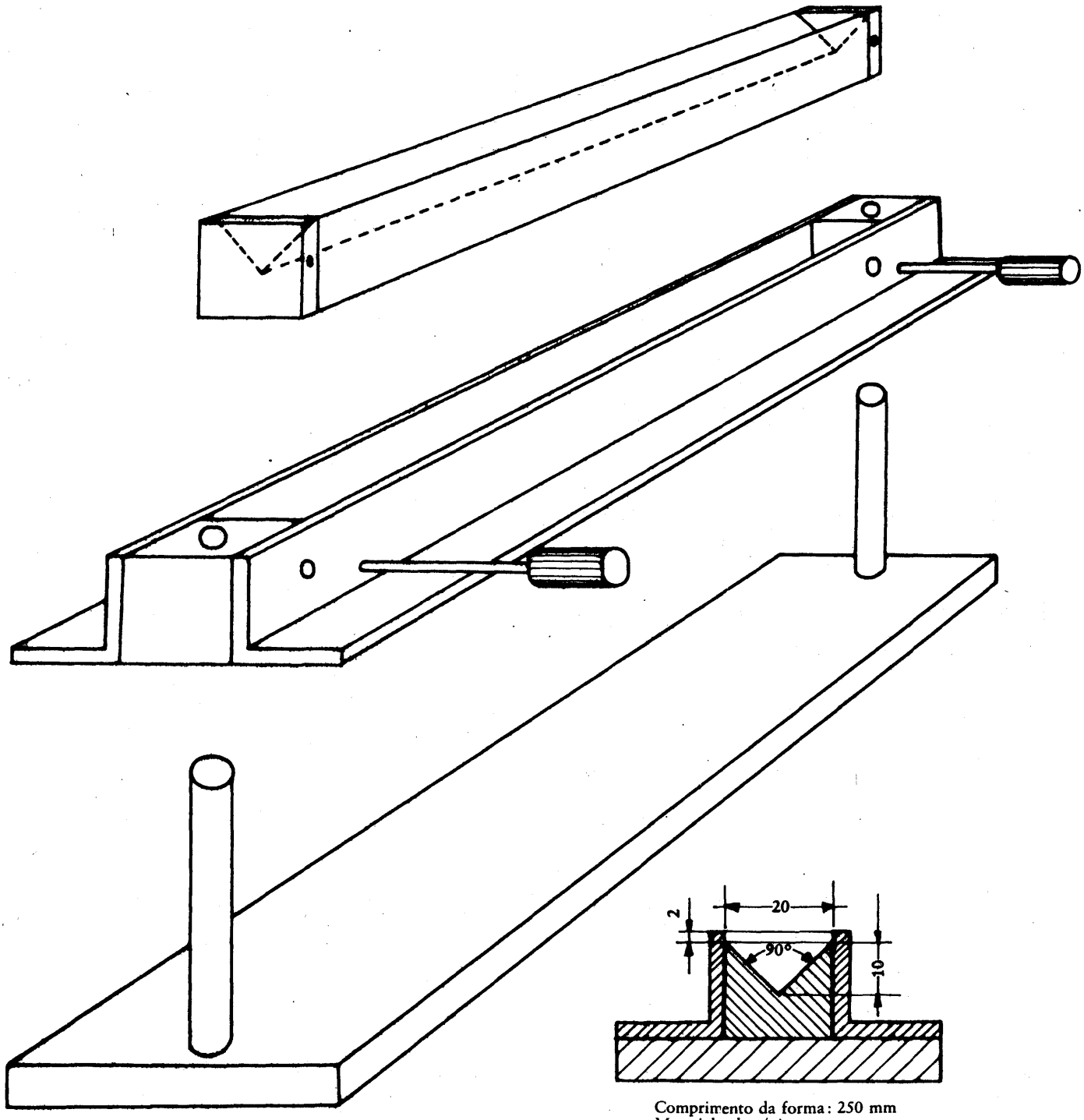
Nenhumas.

Apêndice

Figura

Forma e acessórios para a preparação do monte

(dimensões expressas en mm)



Comprimento da forma: 250 mm
Material: alumínio

PARTE B: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

INTRODUÇÃO GERAL: PARTE B

A. INTRODUÇÃO

Ver a introdução geral.

B. DEFINIÇÕES

i) *A toxicidade aguda* inclui os efeitos desfavoráveis que se manifestam durante um período imposto (habitualmente 14 dias) após a administração de uma dose única de substância.

ii) *A DL_{50}* (dose letal média) é a dose única que é, estatisticamente, responsável pela morte de 50 % dos animais aos quais a substância foi administrada. O valor de DL_{50} é expresso em peso da substância testada em relação à unidade de peso dos animais submetidos à experiência (mg/kg).

iii) *A CL_{50}* (concentração letal média) é a concentração de uma substância que é, estatisticamente, responsável durante uma exposição ou num intervalo definido após aquela, pela morte de 50 % dos animais expostos durante um período determinado. O valor de CL_{50} é expresso em peso da substância testada em relação a um volume padrão de ar (mg/l).

iv) *O nível sem efeitos tóxicos* é representado pela dose ou o nível de exposição máxima, que não produz efeito desfavorável detectável na experiência.

v) *A toxicidade subaguda/subcrónica* inclui os efeitos desfavoráveis que aparecem nos animais de experiência como resultado de administrações diárias de uma substância ou quando são expostos diariamente durante um período breve em relação ao seu tempo previsto de vida.

vi) *A dose máxima tolerável* (DMT) é o nível de intoxicação mais elevado que produz na experiência onde é utilizada, sinais de toxicidade sem alterar grandemente a sobrevivência dos animais, por exemplo, aquando de um estudo de carcinogenicidade, devido a efeitos diferentes dos tumores.

vii) *A irritação cutânea* consiste na produção de alterações cutâneas reversíveis de natureza inflamatória que aparecem após a aplicação duma substância.

viii) *A irritação dos olhos* é a produção de modificações oculares reversíveis que aparecem após a aplicação da substância na superfície anterior do olho.

ix) *A sensibilização da pele* (dermites de contacto alérgico) é uma reacção cutânea de origem imunológica a uma substância.

C. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Há limites na extrapolação directa para o homem dos resultados obtidos por experimentação animal e dos obtidos *in vitro;* é pois necessário ter esse facto em conta aquando da avaliação e da interpretação dos ensaios de toxicidade.

Desde que existam, os dados relativos ao homem são considerados como os mais adequados para a determinação dos efeitos potenciais das substâncias químicas sobre a população humana.

MUTAGENICIDADE (incluindo os ensaios de rastreio da cancerigenicidade)

A avaliação preliminar do potencial mutagénico de uma substância necessita da obtenção de informações relativas a dois mecanismos: mutação genética e alterações cromossómicas.

Estes dois mecanismos são estudados através dos testes seguintes:

i) Testes baseados na aparição de mutações genéticas (exactas) nas células procariontes, tais como a *Salmonella typhimurium;* pode igualmente utilizar-se a *Escherichia coli.* A escolha de um destes organismos é determinada pela natureza da substância a testar.

ii) Testes baseados na produção de alterações cromossómicas das células dos mamíferos cultivadas *in vitro*; pode igualmente operar-se *in vivo* (o teste do micronúcleo ou a análise das células da medula óssea no estádio de metafase).

D. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A toxicologia é uma ciência experimental em pleno desenvolvimento e existe na extensa bibliografia sobre cada assunto. Informações úteis figuram nas directivas correspondentes da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE).

Observações complementares

Cuidados a ter com os animais

Nas experiências toxicológicas é essencial proceder a controlos rigorosos das condições ambientais e usar técnicas de cuidados apropriados relativamente aos animais.

i) Condições de alojamento

As condições ambientais dos locais ou recintos das experiências devem ser adequados à natureza da espécie utilizada. Para os roedores, a temperatura deve ser 22 °C (± 3 °C) e humidade relativa de 30 a 70 %; para os coelhos e cobaias, a temperatura deve ser 20 °C (± 3 °C) e humidade relativa de 30 a 70 %.

Certas técnicas experimentais são particularmente sensíveis aos efeitos da temperatura e, nestes casos, indicações detalhadas relativamente às condições adequadas, são incluídas na descrição do método. Em todas as investigações sobre os efeitos tóxicos, os valores da temperatura e da humidade devem ser vigiados e registados no relatório final do estudo.

Sempre que se utilizar iluminação artificial, é normalmente necessário alternar 12 horas de luz com 12 horas de escuridão. Os dados relativos ao programa de iluminação devem ser registados e incluídos no relatório final.

Nos relatórios sobre experiências em animais, é importante indicar o tipo de gaiola utilizada, o número de animais alojados em cada gaiola quer durante a exposição às substâncias químicas quer durante o período de observação que se lhe segue.

ii) Alimentação

Os regimes alimentares devem satisfazer todas as necessidades alimentares da espécie sujeita à experiência. Quando são incorporadas substâncias a testar no alimento dos animais, o valor nutricional desse alimento pode ficar reduzido, devido a uma interacção entre a substância e um componente alimentar.

A possibilidade de tal interacção deve ser considerada, quando da interpretação dos resultados do ensaio.

As impurezas contidas no regime alimentar e que se sabe poderem influenciar a toxicidade não devem estar presentes numa concentração tal que possam originar interferências.

B.1. TOXICIDADE AGUDA — ADMINISTRAÇÃO ORAL

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

São administrados oralmente doses crescentes da substância de ensaio, por intubação, a vários lotes de animais de experiência, sendo utilizada uma só dose por lote. Observam-se em seguida os efeitos e a mortalidade devidos à substância. Os animais que morrem durante o ensaio são autopsiados assim como os que sobrevivem até à sua conclusão. Este método é essencialmente destinado aos estudos em roedores.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. *Preparação*

Os animais são mantidos em condições de alojamento e alimentação adequadas à experiência, durante pelo menos os cinco dias que a antecedem. Antes de começar o ensaio, os jovens animais adultos e saudáveis são repartidos ao acaso entre os diferentes lotes da experiência. Se necessário, a substância a ensaiar é dissolvida ou posta em suspensão num veículo apropriado. Recomenda-se a utilização de soluções aquosas sempre que possível ou então pode utilizar-se uma solução em óleo vegetal e eventualmente uma solução com outros veículos bem como uma suspensão. No que diz respeito aos veículos não aquosos, a sua toxicidade deve ser conhecida ou determinada antes ou durante o ensaio. Normalmente, para os roedores, o volume não deve exceder 10 ml por quilograma do peso corporal, excepto no caso das soluções aquosas em que se pode utilizar 20 ml por quilograma. A variação do volume de ensaio deve ser minimizada pelo ajustamento da concentração, de modo a garantir um volume constante para todas as doses estudadas.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Salvo contra-indicação, a ratazana é a espécie preferida.

É necessário utilizar estirpes de laboratório correntes. Para cada sexo, a diferença de peso entre os animais utilizados para um ensaio não deve exceder ± 20 % do valor médio adequado.

1.6.2.2. Número e sexo

São utilizados pelo menos 10 roedores (5 fêmeas e 5 machos) por cada dose. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas.

1.6.2.3 Doses

As doses devem ser em número suficiente, pelo menos três, e espaçadas de modo adequado, para produzirem lotes que apresentem uma gama de efeitos tóxicos e de taxas de mortalidade. Os dados devem ser suficientes para permitirem traçar uma curva doses/respostas e, se possível, uma determinação válida de DL_{50}.

1.6.2.4. Ensaio limite

Obtém-se uma estimativa adequada do potencial de toxicidade oral aguda para a maior parte das utilizações, se não se observar mortalidade devida à substância, num lote tratado (5 animais de cada sexo), nos catorze dias que se seguem à administração duma dose de 5 000 mg/kg.

1.6.2.5. Período de observação

O período de observação deve no mínimo estender-se a 14 dias. No entanto a sua duração não deve ser fixada de forma rígida. Esse período deve ser determinado em função das reacções de toxicidade, velocidade da sua aparição e duração do período de recuperação; pode pois ser prolongado em caso de necessidade. O momento em que os sintomas de toxicidade aparecem e desaparecem, assim como o momento da morte, são importantes, sobretudo, se há tendência para a morte ser retardada.

1.6.3. *Técnica*

Os animais devem estar em jejum antes da administração da substância. No caso do rato, este deve ser privado de alimento durante a noite que precede a administração da substância; para os animais com metabolismo mais rápido, é conveniente encurtar o período de jejum; a água *não será limitada.*

No dia seguinte, os animais devem ser pesados antes que a substância de ensaio lhes seja administrada por intubação, à razão duma dose única por lote. Se a administração duma dose única não for possível, a substância pode ser administrada em fracções mais pequenas durante um período que não exceda 24 horas.

Após a administração da substância, os animais podem ainda ser privados de alimento durante três a quatro horas. Se a dose é administrada por fracções durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário fornecer alimentos e água aos animais em função da duração do tratamento. Uma vez a substância administrada, as observações são efectuadas e registadas de modo sistemático, estabelecendo-se, se possível, uma ficha individual para cada animal. No primeiro dia, as observações devem ser frequentes. Deve ser feito um exame clínico cuidadoso, pelo menos uma vez por cada dia de trabalho. Quaisquer outras observações devem ser feitas diariamente de modo a reduzir a perda de animais para o estudo, por exemplo, por autópsia ou refrigeração de animais encontrados mortos assim como o isolamento ou o sacrifício de animais fracos ou moribundos. A observação diária deve incidir, entre outras, sobre as alterações na pele e pêlos, olhos, mucosas, aparelho respiratório, sistema circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreias, letargia, sono e coma. O momento da morte deve ser registado com a maior precisão possível.

Os animais que morrem durante a experiência e os que sobrevivem no fim desta são autopsiados. Devem ser registadas todas as alterações patológicas macroscópicas. Se necessário, retirar tecidos para exame histopatológico.

2. **DADOS**

Os dados devem ser resumidos num quadro que indique, para cada lote de experiência, o número de animais no início do ensaio, o momento da morte de cada animal, o número de animais que apresentam outros sintomas de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. O peso de

cada animal deve ser determinado e registado pouco tempo antes da administração da substância de ensaio e depois, uma vez por semana e no momento da morte. As alterações dos pesos devem ser calculadas e registadas quando a sobrevivência ultrapassa um dia. O valor de DL_{50} determina-se por aplicação de um método reconhecido. A avaliação dos dados deve incluir a relação, caso exista, entre as exposições dos animais à substância e a incidência assim como a gravidade de todas as anomalias, incluindo as anomalias do comportamento e clínicas, as lesões macroscópicas, as alterações de peso corporal, a mortalidade e qualquer outro efeito tóxico.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório deve conter, se possível, as informações seguintes:

— espécie, estirpe, origem, ambiente, regime alimentar, etc.,

— condições experimentais,

— doses (com a indicação das concentrações e, se necessário, do veículo),

— quadro dos dados, resposta por sexo e por dose (número de animais que morrem, número de animais com sintomas de toxicidade, número de animais expostos),

— momento da morte após administração da dose,

— resultados das observações diárias;

— valor do DL_{50}, para cada sexo, determinado no décimo quarto dia (com indicação precisa do método de cálculo),

— intervalo de confiança de 95 % para DL_{50},

— curva dose/mortalidade e declive dessa curva (se o método de cálculo o permitir),

— resultados da autópsia,

— resultados histopatológicos,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.2. TOXICIDADE AGUDA — ADMINISTRAÇÃO POR INALAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

São expostos vários lotes de animais de experiência à substância de ensaio, em concentrações crescentes, durante um período determinado, sendo utilizada uma só concentração por lote. Observa-se em seguida os efeitos e a mortalidade devidos à substância. Os animais que morrem durante o ensaio são autopsiados assim como os que sobrevivem até à sua conclusão.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparação*

Os animais são mantidos em condições de alojamento e de alimentação adequadas à experiência, pelo menos durante os cinco dias que a antecedem. Antes do início do ensaio, os jovens animais adultos e saudáveis são repartidos ao acaso pelos diferentes lotes. Não é necessário submetê-los a exposição simulada, a menos que o dispositivo da exposição utilizado o exiga.

Se necessário pode adicionar-se à substância do ensaio um veículo adequado com o fim de se obter uma concentração adequada da substância do ensaio na atmosfera, e deve então ser utilizado um grupo testemunha para este veículo. Se um veículo ou outros aditivos são utilizados para facilitar a dosagem, estes devem ser considerados não tóxicos. Os dados já disponíveis podem ser utilizados, se necessário.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Salvo contra-indicação, a ratazana é a espécie preferida. Devem ser utilizadas estirpes correntes de laboratório. Para cada sexo a diferença de peso entre os animais utilizados para um dado ensaio não deve exceder ± 20 % do valor médio adequado.

1.6.2.2. Número e sexo

Pelo menos 10 roedores (5 fêmeas e 5 machos) são utilizados para cada nível de concentração. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas.

1.6.2.3. Concentrações da exposição

As concentrações devem ser em número suficiente, pelo menos três, e espaçadas de forma conveniente para se obterem lotes que apresentem uma gama de efeitos tóxicos e de taxa de mortalidade. Os dados devem ser suficientes para permitir traçar uma curva concentração/mortalidade e, se possível, uma determinação válida do CL_{50}.

1.6.2.4. Ensaio limite

Se uma exposição de 5 machos e 5 fêmeas a uma concentração de 20 mg/l de um gás ou 5 mg/l de um aerossol ou de partículas durante 4 horas ou, desde que tal não seja possível devido às propriedades químicas e físicas (isto é explosivas) da substância de ensaio, uma exposição à concentração máxima possível, não causar a morte de qualquer animal em 14 dias, pode considerar-se inútil prosseguir o ensaio.

1.6.2.5. Duração da exposição

A duração da exposição é de pelo menos 4 horas.

1.6.2.6. Dispositivo experimental

Os animais devem ser expostos à substância por meio de um dispositivo de inalação que produza uma corrente de ar que assegure pelo menos 12 renovações do ar por hora, um teor suficiente em oxigénio e uma distribuição uniforme do produto do ensaio no ar. Se se utilizar uma câmara, esta deve ser concebida de forma a evitar, tanto quanto possível, que os animais fiquem amontoados, e que lhes assegure uma exposição máxima, por inalação, à substância de ensaio. Regra geral, para assegurar a estabilidade da atmosfera de uma câmara, o «volume» total dos animais da experiência não deve exceder 5 % do volume da câmara. Pode também recorrer-se a um sistema de exposição oro-nasal, somente da cabeça ou de todo o corpo em câmara individual; os dois primeiros tipos de exposição evitam a absorção da substância do ensaio por outras vias.

1.6.2.7. Período de observação

O período de observação deve estender-se, pelo menos, por catorze dias. No entanto, esta duração não deve ser fixada de forma rígida, devendo ser determinada em função das reacções de toxicidade, da rapidez da sua aparição e da duração do período de recuperação; esta pode pois ser prolongada se necessário. O momento em que os sintomas de toxicidade aparecem e desaparecem assim como o momento da morte são importantes, sobretudo se há tendência para a morte ser retardada.

1.6.3. *Técnica*

Pouco tempo antes da exposição, os animais são pesados e depois expostos na câmara de exposição à concentração de ensaio, durante pelo menos 4 horas, após a estabilização da concentração. Esta deve ser rápida. A temperatura à qual se efectua o ensaio deve ser mantida a 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 e 70 %, mas, em certos casos (por exemplo aerossóis), isto pode não ser possível. Os animais devem ser privados de alimento e de água durante a exposição. É conveniente utilizar um sistema de inalação que funcione em condições dinâmicas e que seja munido dum dispositivo para controlo analítico da concentração.

Para determinar as concentrações de exposição adequadas, recomenda-se um ensaio preliminar. O sistema deve permitir criar condições de exposição estáveis tão rapidamente quanto possível. O débito do ar deve ser regulado de modo a assegurar condições uniformes em toda a câmara de exposição.

É conveniente medir ou manter sob vigilância:

a) O débito do ar (permanentemente);

b) A concentração real da substância de ensaio na zona de respiração. Durante o período de exposição, a concentração não deve variar mais do que ± 15 % em relação ao valor médio. No entanto, no caso de poeiras ou de certos aerossóis, este grau de controlo pode não ser obtido e é então aceitável um desvio maior. As substâncias em partículas e os aerossóis devem ser analisados tão frequentemente quanto seja necessário para determinar (pelo menos uma vez) a distribuição dos tamanhos das partículas;

c) A temperatura e a humidade;

d) As observações realizam-se durante e após a exposição e são registadas sistematicamente; deve ser estabelecida uma ficha individual para cada animal. No primeiro dia as observações devem ser frequentes. Deve ser efectuado um exame clínico cuidadoso pelo menos uma vez em cada dia de trabalho. Outras observações complementares devem ser feitas diariamente, e a fim de se reduzir em cada estudo o número de animais perdidos, devem ser tomadas medidas adequadas, como por exemplo, autópsia ou refrigeração dos animais encontrados mortos, assim como o isolamento ou sacrifício dos animais fracos ou moribundos.

A observação diária deve incidir, entre outras, sobre as alterações na pele, pêlos, olhos, mucosas, aparelho respiratório, sistema circulatório, sistema nervoso autónomo e central assim como da actividade somatomotora e do comportamento. Devem ser observados com atenção particular a respiração, tremores, convulsões, salivação, diarreias, letargia, sono e comas. Deve ser registado o momento da morte com tanta precisão quanto possível. O peso de cada animal deve ser determinado todas as semanas após a exposição assim como no momento da morte. Os animais que morrem durante a experiência e os que sobrevivem no final desta são submetidos a uma autópsia que incide, em particular, sobre todas as alterações nas vias respiratórias superiores e inferiores. Devem ser registadas todas as alterações. Se necessário, retirar tecidos para exame histopatológico.

2. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro que indique, para cada lote de experiência, o número de animais no início do ensaio, o momento da morte de cada animal, o número de animais que apresentam outros sintomas de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. As alterações de peso devem ser calculadas e registadas desde que a sobrevivência ultrapasse um dia. O valor do CL_{50} deve ser determinado por um método reconhecido. A avaliação dos dados deve, nomeadamente, pôr em evidência, caso exista, a relação entre a exposição dos animais à substância do ensaio e a incidência assim como a gravidade de todas as anomalias, incluindo as alterações do comportamento, as anomalias clínicas, as lesões macroscópicas, as alterações do peso corporal, a mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

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

— espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.;

— condições experimentais:

descrição do dispositivo de exposição incluindo: concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e de aerossóis, método de condicionamento do ar e, se for caso disso, modalidades da estadia dos animais na câmara de ensaio.

Devem ser descritos os dispositivos utilizados para a medição da temperatura e da humidade, assim como da concentração e do tamanho das partículas e dos aerossóis.

Dados relativos à exposição:

Devem ser apresentados sob a forma de um quadro que indique os valores médios assim como uma medição da variabilidade (por exemplo: desvio-padrão); devem incluir:

a) Débito de ar através do dispositivo de inalação;

b) Temperatura e humidade do ar;

c) Concentrações nominais (quantidade total da substância do ensaio introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume de ar);

d) Se for caso disso, natureza do veículo;

e) Concentrações reais na zona de respiração;

f) Dimensões médias das partículas;

g) Duração da estabilização;

h) Duração da exposição;

— quadro indicando as reacções, por sexo e por nível de exposição (número de animais que morrem, número de animais que apresentam sinais de toxicidade, número de animais expostos),

— momento da morte durante ou após a exposição,

— resultados das observações diárias,

— valor de CL_{50} para cada sexo determinado no fim do período de observação (com indicação precisa do método de cálculo utilizado),

— intervalo de confiança de 95 % para o CL_{50},

— curva de concentração/mortalidade e declive dessa curva (se o método de cálculo o permitir),

— resultados da autópsia,

— quaisquer resultados histopatológicos,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.3. TOXICIDADE AGUDA-ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

São administradas doses crescentes da substância de ensaio, por aplicação cutânea a vários lotes de animais de experiência, usando uma única dose por cada lote. Observar em seguida os efeitos e a mortalidade causada pela substância. Os animais que morrem durante o ensaio são autopsiados, assim como os que sobrevivem até à sua conclusão.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

Os animais são mantidos em condições de alojamento e de alimentação adequadas à experiência, pelo menos durante os dias que a antecedem. Antes do ensaio, os jovens animais adultos e saudáveis são repartidos ao acaso pelos diferentes lotes. Cerca de 24 horas antes do ensaio, cortam-se ou rapam-se os pêlos da região dorsal do tronco dos animais, evitando qualquer lesão da pele susceptível de alterar a sua permeabilidade.

A superfície preparada para aplicação da substância não deve ser inferior a 10 % da superfície corporal. Quando o ensaio é realizado com substâncias sólidas, que podem ser pulverizadas se necessário, a substância a ensaiar deve ser humedecida com água ou, se necessário, com um veículo adequado, de forma a garantir um bom contacto com a pele. Se se utilizar um veículo, a sua influência sobre a penetração da substância na pele deve ser tida em consideração. As substâncias líquidas são geralmente aplicadas sem diluição.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Podem utilizar-se ratazanas ou coelhos adultos. Podem igualmente utilizar-se outras espécies, mas neste caso, justificando a sua utilização. Devem ser utilizadas estirpes de laboratório correntes. Para cada sexo, a diferença de peso entre os animais utilizados para um ensaio não deve exceder ± 20 % do valor médio adequado.

1.6.2.2. Número e sexo

Pelo menos 10 animais (5 fêmeas e 5 machos) com pele sã e intacta, por cada dose. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. A utilização de um maior número de animais pode justificar-se, sobretudo se se tratar de coelhos.

1.6.2.3. Doses

As doses devem ser em número suficiente, pelo menos três, e espaçadas de modo a produzirem lotes apresentando uma gama de efeitos tóxicos e de taxas de mortalidade. Deve ser tomado em consideração qualquer efeito irritante ou corrosivo, aquando da escolha das doses. Os dados devem ser suficientes para permitir traçar uma curva doses/respostas e, se possível, permitir uma determinação válida do DL_{50}.

1.6.2.4. Ensaio limite

Se, aquando de um ensaio preliminar, a aplicação da substância, em dose igual ou superior a 2 000 mg/kg sobre a pele intacta de pelo menos cinco animais por sexo, não provocar qualquer efeito letal devido à substância durante catorze dias, pode considerar-se inútil prosseguir o ensaio com outras doses.

1.6.2.5. Período de observação

O período de observação deve pelo menos estender-se por 14 dias. No entanto, a sua duração não deve ser fixada de forma rígida. Deve ser determinada em função das reacções de toxicidade, da rapidez da sua aparição e duração do período de cura; a duração pode pois ser prolongada se necessário. O momento em que os sintomas de toxicidade aparecem e desaparecem, a sua duração e o momento da morte são importantes, sobretudo se há tendência para a morte ser retardada.

1.6.3. *Técnica*

Os animais devem ser colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio deve ser aplicada uniformemente sobre uma superfície aproximadamente igual a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície tratada pode ser menor, mas a substância de ensaio deve ser aplicada de modo a formar uma camada tão delgada e uniforme quanto possível.

As substâncias de ensaio são mantidas em contacto com a pele por meio de um penso de gaze porosa, ou de um esparadrapo não irritante durante 24 horas. A parte tratada deve, além disso, ser convenientemente coberta de modo a manter o penso de gaze e a substância de ensaio no lugar e a evitar que os animais possam ingerir esta última. Podem utilizar-se aparelhos de contenção para impedir a ingestão de substância pelos animais mas não é recomendável uma imobilização completa.

No final do período de exposição, a substância do ensaio residual deve ser removida, se possível com água ou por meio de um outro processo de limpeza da pele.

As observações devem ser registadas sistematicamente à medida que são efectuadas, estabelecendo-se uma ficha individual para cada animal. Os animais devem ser observados frequentemente durante o primeiro dia. Deve ser efectuado um exame clínico cuidadoso pelo menos uma vez em cada dia de trabalho. Quaisquer outras observações devem ser feitas diariamente e devem ser tomadas medidas adequadas para reduzir a perda de animais no estudo, por exemplo pela autópsia ou refrigeração dos animais encontrados mortos, assim como o isolamento ou sacrifício dos animais fracos e moribundos. A observação diária deve incidir, entre outras, sobre as alterações nos pêlos, da pele tratada, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. São observados com atenção particular: tremores, convulsões, salivação, diarreias, letargia, sono e comas. O momento da morte deve ser registado com a maior precisão possível. Os animais que morrem durante a experiência e os que sobrevivem no final desta são autopsiados. Devem ser registadas todas as alterações patológicas macroscópicas. Se necessário, retirar tecidos para exame histopatológico.

2. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro que indique para cada lote, o número de animais no início do teste, o momento da morte de cada animal, o número de animais que apresentam outros sintomas de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. O peso de cada animal deve ser determinado e registado pouco tempo antes da aplicação da substância e depois uma vez por semana e no momento da morte; as alterações de peso devem ser calculadas e registadas quando a sobrevivência excede um dia. O valor de DL_{50} deve ser determinado por aplicação de um método reconhecido. A avaliação dos dados inclui as relações, caso existam, entre a exposição dos animais à substância e a incidência assim como a gravidade de todas as anomalias, incluindo as alterações de comportamento e as anomalias clínicas, lesões macroscópicas, alterações no peso corporal, efeitos sobre a mortalidade e qualquer outro efeito tóxico.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório deve conter, se possível, as informações seguintes:

— espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.,

— condições experimentais (incluindo o processo de limpeza de pele),

— doses (com indicação das concentrações e, se for caso disso, do veículo),

— quadro dos dados, respostas por sexo e por dose (número de animais que morrem, número de animais que apresentam sintomas de toxicidade, número de animais expostos),

— momento da morte após a administração da dose,

— resultados e observações diárias,

— o valor de DL_{50} para cada sexo, determinado no décimo quarto dia, com indicação precisa do método de cálculo,

— intervalo de confiança de 95 % para o DL_{50} (quando determinável),

— curva dose/mortalidade e declive dessa curva, se o método de cálculo o permitir,

— resultados da autópsia,

— resultados histopatológicos,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.4. TOXICIDADE AGUDA

IRRITAÇÃO DA PELE

1. MÉTODO

1.1. **Introdução**

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. **Definição**

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. **Substâncias de referência**

Nenhuma.

1.4. **Princípio do método**

A substância de ensaio é aplicada numa dose única sobre a pele de vários animais de experiência, constituindo cada um de entre eles a sua própria testemunha. O grau da reacção de irritação é observado e avaliado após um lapso de tempo determinado; será objecto de uma descrição minuciosa, a fim de fornecer uma avaliação completa dos efeitos. O período de observação deve ser suficientemente longo para poder avaliar completamente o carácter reversível dos efeitos observados.

1.5. **Critério de qualidade**

Nenhum.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Preparações*

Vinte e quatro horas antes do ensaio, cortam-se ou rapam-se os pêlos da região dorsal do animal.

Nesta operação, evitar escoriar a pele. Só devem ser utilizados animais que apresentem uma pele sã e intacta.

Se se submeterem a ensaio substâncias sólidas (que, se necessário, podem ser pulverizadas), a substância de ensaio deve ser suficientemente humedecida com água ou, se necessário, com um veículo adequado para garantir um bom contacto com a pele. Neste último caso, deve ter-se em conta a influência do veículo sobre a reacção de irritação cutânea provocada pela substância de ensaio. As substâncias líquidas são em geral aplicadas sem diluição.

Não é necessário submeter as substâncias fortemente ácidas ou alcalinas a um teste de irritação primário da pele, devido ao carácter previsível das suas propriedades corrosivas. É inútil ensaiar as substâncias que se revelarem muito tóxicas por via cutânea.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Apesar de poderem ser utilizadas várias espécies de mamíferos, o coelho albino é a espécie preferida.

1.6.2.2. Número de animais

Utilizam-se pelo menos 3 animais adultos e sãos. A utilização de um número maior pode revelar-se necessária para esclarecer respostas equívocas.

1.6.2.3. Doses

Salvo contra-indicações, um volume de 0,5 ml de substância líquida ou 0,5 g de substância sólida ou semi-sólida é aplicado no local escolhido. Não é necessário um lote testemunha. Servem de testemunha as zonas adjacentes de pele não tratada de cada animal.

1.6.2.4. Período de observação

A duração do período de observação não deve ser fixada de um modo rígido, deve ser suficientemente longa para avaliar completamente o carácter reversível ou irreversível dos efeitos observados, mas não deve normalmente exceder catorze dias.

1.6.3. *Técnica*

Os animais devem ser colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio deve ser colocada sobre uma pequena superfície cutânea (cerca de 6 cm^2) e coberta com um pequeno quadrado de gaze mantido no local por um esparadrapo não irritante. Se se trata de líquidos ou de certas pastas, pode ser necessário estender primeiro a substância sobre o quadrado de gaze e depois aplicar este sobre a pele. O quadrado de gaze deve ser mantido em contacto com a pele por meio dum penso semi-oclusivo adequado, durante todo o período de exposição. A utilização de um penso oclusivo pode, no entanto, ser necessário em certos casos. É necessário impedir que o animal tenha acesso ao quadrado de gaze com consequente ingestão/inalação da substância de ensaio.

A duração da exposição é de 4 horas. Se se suspeitar que a substância pode produzir uma reacção cutânea grave (por exemplo, ser corrosiva), a duração da exposição deve ser reduzida (por exemplo a 1 hora ou a 3 minutos).

Quando se utilizar um período de exposição inferior a 4 horas e se observar uma reacção cutânea grave, não é necessário repetir a experiência utilizando um período de exposição de 4 horas. Podem ser indicadas exposições mais longas sob certas condições, por exemplo modos de utilização e de exposição previstos para o homem. No final do período de exposição, a substância de ensaio deve ser eliminada, se possível, com água ou um solvente adequado, tendo-se o cuidado de não alterar nem a resposta existente nem a integridade da epiderme.

1.6.3.1. Observação e classificação

A observação das manifestações eritematosas e edematosas, assim como a sua classificação serão efectuadas aos 30 e aos 60 minutos e, depois, às 24, 48 e 72 horas após a remoção do penso. As reacções de irritação são classificadas e registadas de acordo com a escala que consta do quadro em apêndice. Podem ser necessárias outras observações para determinar o carácter reversível das reacções. Além destas observações relativas à irritação, qualquer lesão grave como a corrosão (destruição irreversível do tecido da pele) e qualquer outro efeito tóxico, devem ser descritos integralmente.

2. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro que indique, para cada animal, as classificações para o eritema e edema durante todo o período da observação. Deve registar-se qualquer lesão grave, a descrição da intensidade e da natureza da irritação, da corrosão, a sua reversibilidade assim como qualquer outro efeito tóxico observado.

3. RESULTADOS

3.1. **Relatório do ensaio**

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

— espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.,

— condições experimentais (incluindo propriedades físico-químicas importantes, modo de preparação e limpeza da pele),

— quadro dos dados relativos à reacção de irritação em cada animal e em cada observação (por exemplo 1, 24, 48 e 72 horas após tirar o penso),

— descrição de qualquer lesão grave observada, incluindo a corrosão,

— descrição da intensidade e da natureza da irritação observadas e quaisquer resultados histopatológicos,

— descrição de qualquer efeito tóxico além da irritação da pele,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

Apêndice

QUADRO: CLASSIFICAÇÃO DA REACÇÃO CUTÂNEA

Eritema e formação de escaras

	Valor
Sem eritema	0
Eritema muito leve (apenas perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (cor vermelha-violácea) com leve escarificação (lesão em profundidade)	4

Formação de edema

Sem edema	0
Edema muito leve (apenas perceptível)	1
Edema ligeiro (contorno da zona edematosa bem definido por uma tumefacção nítida)	2
Edema moderado (tumefacção de cerca de 1 mm)	3
Edema grave (tumefacção superior a 1 mm estendendo-se para além da região exposta)	4

B.5. TOXICIDADE AGUDA

IRRITAÇÃO DOS OLHOS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

A substância de ensaio é aplicada sob a forma de uma dose única, num dos olhos de cada animal da experiência. O olho não tratado é utilizado como testemunha. O grau de irritação é avaliado e classificado em intervalos determinados, e é em seguida objecto duma descrição que permite obter uma estimativa completa dos efeitos. O período de observação deve ser suficientemente longo para o carácter reversível ou irreversível dos efeitos observados poder ser avaliado completamente.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

Os dois olhos de cada animal da experiência, provisoriamente seleccionado para o ensaio, serão examinados no decurso das 24 horas que precedem a experiência. Os animais que apresentem uma irritação dos olhos, defeitos oculares ou uma lesão da córnea não devem ser utilizados.

Não é necessário submeter ao ensaio de irritação de olhos as substâncias fortemente alcalinas ou ácidas que tenham revelado uma nítida actividade corrosiva num estudo de irritação da pele ou em outros testes.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Apesar de terem sido utilizados diferentes animais de experiência, recomenda-se a realização do ensaio em coelhos albinos adultos e sãos.

1.6.2.2. Número de animais

Devem ser utilizados pelos menos 3 animais. A utilização de um número maior pode revelar-se necessária para esclarecer respostas equívocas.

1.6.2.3. Doses

Se a substância a testar é líquida, utiliza-se um volume de 0,1 ml. Para as substâncias sólidas, as pastas e as substâncias em partículas, a quantidade utilizada deve ter um volume de 0,1 ml ou pesar cerca de 0,1 g (anota-se sempre o peso). Se a substância de ensaio é sólida ou granulosa, deve ser moída para se obter uma poeira fina. A medição do volume das substâncias em partículas deve ser precedida de uma compressão ligeira, por exemplo, por pancadinhas no recipiente de medição.

1.6.2.4. Período de observação

A duração do período de observação não deve ser fixada rigidamente. Deve ser suficientemente longa para avaliar o carácter reversível ou irreversível dos efeitos observados, não devendo exceder normalmente 21 dias a contar da instilação.

1.6.3. *Técnica*

Os animais são colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio é instilada no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, após ter sido afastada delicadamente a pálpebra inferior do globo ocular. Em seguida, mantém-se suavemente as pálpebras juntas durante cerca de 1 segundo, para evitar o derrame da substância. O olho não tratado servirá de testemunha.

Os olhos dos animais de experiência não devem ser lavados durante as 24 horas que se seguem à instilação da substância a ensaiar. Se necessário pode-se fazer uma lavagem no final da vigésima quarta hora. Para as substâncias cujo carácter irritante é posto em evidência por este ensaio, o valor da irrigação do olho como meio de diminuir o efeito irritante ou outros efeitos nocivos, pode ser examinado. Neste caso é recomendada a utilização de 6 coelhos. Em 3 deles a lavagem será feita 4 segundos após a instilação da substância de ensaio e nos outros 3, 30 segundos depois. Nos 2 lotes, a lavagem durará 5 minutos e será efectuada utilizando um volume e uma velocidade de circulação que não criem alterações.

1.6.3.1. Observação e classificação

Os olhos devem ser examinados após 1, 24, 48 e 72 horas. Se não se manifestar qualquer irritação após 72 horas, o ensaio pode ser terminado.

Pode revelar-se necessária uma observação prolongada em caso de lesão persistente na córnea ou qualquer outra irritação ocular, a fim de determinar a evolução das lesões e o seu carácter reversível ou irreversível. Além das observações relativas à córnea, à íris e à conjuntiva serão registadas e descritas todas as outras lesões observadas. A classificação da reacção ocular (ver quadro) deve ser registada aquando de cada exame. A classificação das respostas oculares pode dar lugar a diversas interpretações. A fim de ajudar os laboratórios de pesquisa e as pessoas encarregadas de efectuar ou de interpretar as observações, pode ser utilizado um guia ilustrado com as irritações oculares.

Para facilitar o exame das reacções, pode utilizar-se uma lupa binocular, uma lâmpada, um biomicroscópio ou qualquer outro aparelho adequado. Após o registo das observações efectuadas na vigésima quarta hora, o exame dos olhos de alguns ou de todos os coelhos pode ser prosseguido utilizando a fluoresceína.

2. DADOS

Os dados devem ser resumidos sob a forma de um quadro que indique, para cada animal, os indíces de irritação no momento da observação indicada, uma descrição do grau e da natureza da irritação, a presença de lesões graves e qualquer efeito não ocular observado.

3. RESULTADOS

3.1. **Relatório do ensaio**

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

— dados relativos aos animais (espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.),

— condições experimentais (incluindo as propriedades físico-químicas importantes da substância),

— quadro com os efeitos irritantes/corrosivos assinalados em cada animal no momento de cada observação (por exemplo, 1, 24, 48 e 72 horas),

— descrições de qualquer lesão grave observada,

— descrição do grau e da natureza da irritação ou da corrosão observadas, incluindo a sua reversibilidade,

— descrição do método utilizado para avaliar a irritação após 1, 24, 48 e 72 horas (por exemplo lâmpada de fenda portátil, biomocroscópio, fluoresceína),

— descrição de qualquer efeito local, não ocular, observado,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

Apêndice

QUADRO: CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES OCULARES

Córnea

Opacidade: grau de densidade (as observações incidirão sobre as zonas mais densas)	
Sem ulceração nem opacidade	0
Zonas de opacidade (para além de um ligeiro embaciamento do brilho normal) dispersas ou difusas, pormenores da íris claramente vísiveis	1
Zona translúcida facilmente discernível, pormenores da íris ligeiramente encobertos	2
Zona nacarada, detalhes da íris completamente invísiveis, dimensões da pupila apenas perceptíveis	3
Córnea opaca, íris perceptível através da opacidade	4

Íris

Normal	0
Pregas nitidamente mais profundas, congestão, hiperémia moderada ao redor da córnea ou conjuntiva injectada, qualquer destes sintomas ou combinações entre eles, continuando a íris a reagir à luz (uma reacção lenta é positiva)	1
Ausência de reacção à luz, hemorragia, destruição acentuada (cada um dos sintomas ou o conjunto)	2

Conjuntiva

Vermelhidão (aplica-se às conjuntivas palpebrais e ocular, à córnea e íris)	
Vasos sanguíneos normais	0
Clara hiperémia de certos vasos sanguíneos (olhos injectados)	1
Coloração púrpura difusa, vasos sanguíneos individuais dificilmente discerníveis	2
Coloração vermelha mantida difusa	3
Quemose: pálpebras e/ou membranas pestanejantes (nictitantes)	
Sem tumefacção	0
Qualquer tumefacção superior à normal	1
Qualquer tumefacção evidente com reviramento parcial das pálpebras	2
Tumefacção evidente com as pálpebras quase meio fechadas	3
Tumefacção com as pálpebras mais que meio fechadas	4

B. 6. TOXICIDADE AGUDA

SENSIBILIZAÇÃO DA PELE

1. MÉTODO

1.1. **Introdução**

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. **Definição**

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. **Substâncias de referência**

Nenhuma.

1.4. **Princípio do método de ensaio/método de maximização na cobaia**

Após exposição inicial à substância de ensaio (período de indução) os animais são submetidos, 2 semanas após a última exposição de indução, a uma exposição desencadeante efectuada com esta mesma substância a fim de estabelecer se foi induzido um estado de hipersensibilidade. A sensibilização é determinada por um exame da resposta cutânea à exposição desencadeante.

1.5. **Critério de qualidade**

Nenhum.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Preparações*

Jovens animais saudáveis (idade inferior a um ano) são repartidos ao acaso por lotes tratados e lotes testemunhas. Antes de administrar a substância, corta-se ou rapa-se o pêlo da região do ombro, evitando escarificar a pele.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Utilizam-se as cobaias albinas.

1.6.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais machos ou fêmeas. Se se utilizarem as fêmeas, estas devem ser nulíparas e não grávidas. São utilizados 20 animais para o lote tratado e pelo menos 10 para o lote testemunha. Deve ser justificada a utilização de um número de animais mais pequeno.

1.6.2.3. Dose

A concentração da substância de ensaio é fixada em função da concentração máxima que pode ser perfeitamente tolerada aquando de cada fase de indução.

A dose desencadeante não deve induzir qualquer irritação cutânea nos animais não sensibiliza los. Estas doses são determinadas num estudo preliminar reduzido (2 ou 3 animais).

1.6.2.4. Períodos de observação

Durante o período de indução, vigia-se a pele, para controlo de eventuais efeitos tóxicos. Depois da exposição desencadeante, as reacções cutâneas são registadas às 48 e às 72 horas.

1.6.3. *Técnica*

Os animais são pesados antes da fase de indução, assim como no fim do ensaio. Os pêlos da região do ombro são rapados. O processo compreende duas fases.

1.6.3.1. Indução

Dia 0 — grupo tratado

As injecções intradérmicas a seguir indicadas são administradas aos pares, na região do ombro, de modo que uma injecção de cada par se situe dum lado e do outro da linha média:

1. 0,1 ml de Adjuvante Completo de Freund (ACF);

2. 0,1 ml de substância de ensaio, se for caso disso, num veículo;

3. 0,1 ml de substância de ensaio em ACF.

As injecções 1 e 2 são administradas na proximidade uma da outra e o mais próximo possível da cabeça, enquanto que a injecção 3 se situa próximo da porção caudal da superfície submetida ao ensaio.

Dia 0 — grupo testemunha

As injecções intradérmicas a seguir indicadas são dadas aos pares, nos mesmos locais que as anteriores:

1. 0,1 ml de ACF;

2. 0,1 ml só de veículo;

3. 0,1 de veículo em ACF.

7º dia — grupo tratado

São de novo rapados os pêlos da zona de ensaio. Com um veículo adequado, a substância de ensaio (se necessário os líquidos podem ser aplicados directamente) é espalhada sobre um papel de filtro que é aplicado na superfície do ensaio e mantido em contacto com a pele por meio de um penso adequado durante 48 horas.

7º dia — grupo testemunha

A zona de ensaio é de novo rapada. O veículo é aplicado isoladamente, segundo o mesmo método, sobre a superfície, e é mantido em contacto com a pele por meio de um penso adequado, durante 48 horas.

1.6.3.2. Desencadeamento

21º dia

Rapam-se os pêlos dos flancos dos animais tratados e dos animais testemunhas. Um penso contendo a substância de ensaio é aplicado sobre o flanco esquerdo dos animais tratados, enquanto que um penso unicamente com veículo é colocado no flanco direito. Os pequenos quadrados de tela são mantidos em contacto com a pele com a ajuda dum penso adequado durante 24 horas.

O grupo testemunha é exposto de modo idêntico.

23º e 24º dias

— 21 horas após ter sido retirado o pequeno quadrado de tela, a superfície exposta ao ensaio é limpa e rapada, se necessário,

— 3 horas mais tarde (i.e., 48 horas após o início da aplicação desencadeante), observa-se e regista-se a reacção cutânea,

— 24 horas após esta observação, procede-se a uma segunda observação (72 horas) que é registada.

Para determinar os resultados obtidos na primeira fase desencadeante, pode prevêr-se uma segunda fase desencadeante, se necessária, com um novo grupo testemunha para o veículo, cerca de uma semana após o primeiro ensaio.

1.6.3.3. Observações e classificação

Todas as reacções cutâneas e todas as observações não habituais resultantes de fases de indução e de desecadeamento devem ser registadas e assinaladas no relatório.

2. DADOS

Os dados são resumidos no quadro que indica, para cada animal, as reacções cutâneas assinaladas em cada observação.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório

O relatório deve conter as informações seguintes:

— estirpe da cobaia,

— condições experimentais,

— número, idade e sexo dos animais,

— peso de cada animal no início e no final do ensaio,

— cada uma das observações individuais, incluindo se necessário o sistema de classificação,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e intepretação

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

Observações

O ensaio de maximização com a cobaia (GPMT) é um ensaio do tipo adjuvante largamente utilizado. Embora possam ser utilizados vários outros métodos, indicados em apêndice, que são úteis para revelar a capacidade de uma substância poder provocar uma reacção de sensibilização da pele, o GMPT é considerado como o método (de referência) preferido.

A sensibilidade deste método e a sua capacidade para revelar eventuais sensibilizadores da pele humana são considerados importantes no estabelecimento de um sistema de classificação da toxicidade aplicável à saúde pública.

A escolha de qualquer outro método será regida por critérios que garantam a sua validade. Entre esses critérios figura uma resposta previsível a alergenos-padrão, tais como o 2,4-dinitroclorobenzeno ou a p-fenilenediamina, ou qualquer outro sensibilizador potencial escolhido em função da classe da substância testada.

Não existe um método de ensaio único que permita identificar de modo adequado todas as substâncias que tenham um potencial de sensibilização da pele humana e que convenha a todas as substâncias.

Certos factores, como as características físicas duma substância, incluindo a sua aptidão para a penetração na pele e as suas formas de contacto com os indivíduos susceptíveis de ficarem expostos, devem ser tomados em consideração, quando se escolhe um ensaio. Os ensaios que utilizam as cobaias podem ser subdivididos em ensaios de tipo adjuvante, nas quais qualquer estado alérgico é potencializado pela dissolução ou pela suspensão da substância a submeter a ensaio no Adjuvante Completo de Freund e, em ensaio do tipo não adjuvante. Em certos casos, pode ser escolhido um ensaio que implique uma aplicação local em vez de uma injecção intradérmica, utilizada na prova de maximização com a cobaia. Nestes casos, convém igualmente ter em consideração as características físicas da substância do ensaio e as condições de uma possível exposição humana.

Independentemente do método utilizado, a sensibilidade da estirpe de cobaias utilizadas para o ensaio de sensibilização cutânea deve ser verificada em intervalos regulares (6 meses) por meio de sensibilizantes poderosos e moderados, conhecidos, e que conduzam a um número satisfatório de respostas positivas.

Apêndice

Prova	Draize	Adjuvante completo de Freund (ACF)	Optimização Mauer	Buehler	Prova epicutânea ao ar livre	Adjuvante fraccionado
Espécie	Cobaia	Cobaia	Cobaia	Cobaia	Cobaia	Cobaia
Via de administração	intradérmica (id)	intradérmica (id)	intradérmica (id)	epicutânea (ec)	epicutânea (ec)	id e ec
Número de animais no lote de experiência	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Número de lotes de experiência	1	1	1	1	1 a 6	1
Número de animais no lote testemunha	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Exposição de indução - via	id	id	id	dérmica	dérmica	id e dérmica
Número de exposições	10	5	9	3	20 ou 21	4
Período de exposição	—	—	24 h	6 h de cada vez	contínua	48 h de cada vez
Tipo de penso	—	—	—	fechado	ao ar livre	fechado
Lote de experiência	SE (1)	SE em ACF	SE em ACF	SE	SE	SE
Lote testemunha	nenhum	só ACF	nenhum	nenhum	Veículo (v) só	nenhum
Zona submetida à prova	flanco esquerdo	fanco direito	dorso	flanco esquerdo	flanco direito	ombro
Frequência	de 2 em 2 dias	de 2 em 2 dias	de 2 em 2 dias	de 7 em 7 dias	diariamente	dias 0, 2, 4, 7
Duração	0—18 dias	0—8 dias	0—21 dias	0—14 dias	0—20 dias	0—7 dias
Concentração	2—10 duas vezes a da primeira	a mesma em toda a zona	0,1 ml de 0,1 %	a mesma em toda a zona	a mesma no interior de cada lote, diferente de um lote para outro	a mesma em toda a zona
Exposição de desencadeamento - via	id	dérmica	id	dérmica	dérmica	dérmica
Número de exposições	1	2	2	1	2	1
Dias	35	22 e 35	14 e 28	28	21 e 35	20
Período de exposição	—	—	24 h	6 h	—	24 h
Tipo de penso	—	ao ar livre	—	fechado	ao ar livre	fechado
Grupo(s) de experiência	SE	SE	SE	SE	SE	SE
Grupo testemunha	SE	SE	SE	SE	SE	SE
Superfície submetida à prova	flanco direito	flanco esquerdo	dorso, nova zona	flanco direito	flanco esquerdo	ombro
Concentração	a mesma que a primeira	4 diferentes	0,1 ml de 0,1 %	a mesma que para indução	4 diferentes	metade da utilizada para a indução
Avaliação (número de horas após a exposição de desencadeamento)	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 e/ou 72	24, 48

(1) SE = substância de ensaio.

B.7. TOXICIDADE SUBAGUDA — ADMINISTRAÇÃO ORAL

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

A substância de ensaio é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes a vários lotes de animais de experiência, à razão de uma dose por lote durante um período de 28 dias. Durante o período de administração, os animais são observados todos os dias, a fim de serem verificados os efeitos tóxicos. Os animais que morrem durante o ensaio são autopsiados assim como os que sobrevivem até à sua conclusão.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. *Preparações*

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação adequados para a experiência durante pelo menos os cinco dias que a precedem. Antes de começar o ensaio, os animais jovens saudáveis são repartidos ao acaso pelos lotes de tratamento. As substâncias de ensaio podem ser administradas nos alimentos, por intubação, em capsúlas ou na água para bebida. As doses devem ser administradas aos animais do mesmo modo durante todo o período do ensaio. Se, para facilitar a administração, se utilizar um veículo ou outros aditivos, estes devem ser conhecidos como não produzindo efeitos tóxicos. Os dados publicados podem, se necesssário, ser utilizados.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Salvo contra-indicações, a espécie preferida é o rato. Devem utilizar-se animais jovens, saudáveis, de uma estirpe corrente de laboratório; nas condições ideais, a substância deve ser administrada antes das ratazanas que atingiram a idade de 6 semanas, não podendo em caso algum ter mais de 8 semanas de idade. No início do ensaio, a variação do peso dos animais utilizados não deve exceder em ± 20 % o valor médio.

1.6.2.2. Número e sexo

Devem utilizar-se pelo menos 10 animais (5 fêmeas e 5 machos) para cada dose. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. Se se planear o sacrifício de certo número de animais durante a experiência, o número de animais deve ser acrescido do número de animais que se prevê vir a ser sacrificado antes do estudo ficar completo. Além disso, um lote satélite de 10 animais (5 de cada sexo) pode ser tratado com a dose mais elevada durante 28 dias e ser objecto de uma observação quanto à reversibilidade, à persistência ou ao aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante os 14 dias que se seguem ao tratamento.

1.6.2.3. Doses

Devem ser utilizadas no mínimo três doses e uma testemunha. Com excepção da substância de ensaio, os animais do lote testemunha devem ser tratados do mesmo modo que os dos lotes da experiência. Se se utilizar um veículo para facilitar a administraçâo, deve ser administrado às testemunhas do mesmo modo que aos lotes tratados e o volume recebido corresponderá ao administrado ao lote tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada deve produzir efeitos tóxicos que não conduzam (ou raramente) à morte. A dose mais fraca não deve fazer aparecer qualquer efeito tóxico. Quando se disponha de informações relativas à exposição humana, a dose mais fraca deve ser superior a este valor.

Em condições ideais, a dose média deve produzir efeitos tóxicos mínimos observáveis. Se se utilizarem várias doses intermédias, estas devem ser suficientemente espaçadas de forma a dar origem a uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos lotes a que correspondem as doses fracas e intermédias, assim como no lote testemunha, a incidência de mortalidade deve ser fraca a fim de permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Quando a substância de ensaio é administrada no alimento, pode utilizar-se, quer uma concentração alimentar constante (ppm ou mg/kg), quer uma dose constante, em relação com o peso corporal dos animais; deve ser indicado o método escolhido. No caso de uma substância administrada por intubação, as doses devem ser administradas todos os dias à mesma hora. As doses devem ser adaptadas (semanalmente ou bisemanalmente) a fim de se manter um nível da dose constante, em relação com o peso corporal do animal.

1.6.2.4. Ensaio limite

Se uma experiência de 28 dias efectuada de acordo com o método descrito anteriormente, com uma dose de 1 000 mg/kg do peso corporal por dia ou com um nível de dose mais elevado, em função de uma possível exposição humana (se conhecida) não revelar qualquer efeito tóxico, pode considerar-se inútil o prosseguimento da experiência. Quando se trata de substâncias com baixa toxicidade, administradas com o regime alimentar, interessa assegurar que a sua quantidade e as suas propriedades não interferem com as exigências nutricionais normais.

1.6.2.5. Período de observação

Todos os animais devem ser observados diariamente; devem ser registados os sintomas de toxicidade assim como o momento da sua aparição, a sua intensidade e a sua duração. Devem ser registados o momento da morte e o momento em que aparecem e desaparecem os sintomas de toxicidade.

1.6.3. *Técnica*

As doses de substâncias de ensaio são administradas aos animais, idealmente, sete dias por semana, durante 28 dias. Os animais dos lotes satélites, previstos para observações complementares, devem ser mantidos por mais 14 dias ainda, sem tratamento, com o fim de revelar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos.

A observação diária deve incidir, entre outras, sobre as alterações nos pêlos, pele, olhos, mucosas, aparelho respiratório, sistema circulatóro, sistema nervoso autónomo e central, assim como a actividade sómatomotora e o comportamento. O consumo de alimentos (e o consumo da água, quando a substância a ensaiar é administrada na água de beber), e ainda o peso dos animais, devem ser determinados semanalmente.

É necessária uma observação regular dos animais de forma a evitar que, na medida do possível, eles sejam perdidos para a experiência por razões tais como canibalismo, autólise dos tecidos ou por erro na condução da experiência. Todos os animais sobreviventes que pertençam aos lotes tratados, não satélites, são autopsiados. Os animais moribundos são imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames a seguir serão efectuados no final do período do ensaio em todos os animais (incluindo os testemunhas):

1. Exame hematológico compreendendo pelo menos o hematócrito, a concentração de hemoglobina, o número de eritrocitos e de leucócitos, a fórmula leucocitária e ainda um estudo da coagulação;

2. Determinações bioquímicas clínicas do sangue, incluindo pelo menos um critério relativo à exploração das funções hepática e renal: alanina aminotransferase (antigamente conhecida por glutamato-piruvato-transaminase) e aspartato aminotransferase (antigamente conhecido por glutamato-oxalacetato-trausaminase) do soro, azoto da ureia, albumina, creatinina plasmática, bilirrubina total e proteínas séricas totais.

As outras determinações, eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada, dizem respeito ao cálcio, fósforo, coloretos, sódio, potássio, glucose em jejum, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, metaemoglobina e actividade colinesterásica.

Podem ser realizadas outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados.

1.6.3.1. Autópsia

Todos os animais submetidos ao ensaio devem ser objecto de uma autópsia geral. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos são pesados no estado húmido o mais rápidamente possível após a dissecação, para se evitar a sua secagem. O fígado, rins, pâncreas, glândulas supra-renais e coração, assim como qualquer outro órgão que apresente lesões microcóspicas ou alterações volumétricas, devem ser conservados em meio adequado para eventuais exames histopatológicos ulteriores.

1.6.3.2. Exame histopatológico

Para o lote exposto à dose mais elevada e para o lote testemunha, é preciso fazer um exame histopatológico dos órgãos e dos tecidos conservados.

Os órgãos e os tecidos que apresentam lesões induzidas pela substância a ensaiar, ao nível da dose mais elevada, devem ser examinados em todos os lotes que foram expostos às doses mais fracas. Os animais de qualquer lote satélite, devem ser submetidos a um exame histopatológico, incidindo particularmente sobre os órgãos e tecidos em relação aos quais foram detectadas lesões nos outros lotes tratados.

2. **DADOS**

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando-se, para cada lote de experiência, o número de animais do início do ensaio e o número de animais que apresentam cada tipo de lesão.

Todos os resultados observados são avaliados por um método estatístico adequado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RESULTADOS

3.1. **Relatório do ensaio**

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

— espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.,

— condições experimentais,

— doses (incluindo veículos, se for caso disso) e suas concentrações,

— resposta tóxica por sexo e por dose,

— nível sem qualquer efeito, se possível,

— momento da morte durante a experiência ou a indicação que os animais sobreviveram à experiência,

— efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer sintoma anormal e sua evolução,

— quantidade de alimentos e pesos corporais,

— exames hematológicos efectuados e resultados completos,

— provas bioquímicas clínicas efectuadas e resultados completos,

— resultados da autópsia,

— descrição detalhada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se aquele se revelar possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B. 8 TOXICIDADE SUBAGUDA — ADMINISTRAÇÃO POR INALAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A)

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B)

1.3. Substância de referência

Nenhuma

1.4. Princípios do método

Vários grupos de animais são expostos, diariamente, durante um período determinado, à substância de ensaio, em concentrações crescentes, à razão de uma concentração para cada lote, durante um período de 28 dias. Quando se utiliza um veículo para se obter uma concentração adequada da substância de ensaio na atmosfera, deve utilizar-se um lote testemunha para o veículo. Durante o período de administração, os animais são observados diariamente a fim de detectar os sintomas de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados, acontecendo o mesmo aos que estejam ainda vivos no final do ensaio.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

Os animais são mantidos em condições de alojamento e de alimentação adequadas à experiência durante pelo menos os cinco dias que a precedem. Antes de se começar o ensaio, os jovens animais saudáveis, são repartidos ao acaso pelo número de lotes necessários. Quando for necessário, pode adicionar-se um veículo adequado à substância para se obter uma concentração adequada na atmosfera. Se forem utilizados veículos ou outros aditivos para facilitar a dosagem, terão de ser conhecidos como não tóxicos. Os dados publicados podem, se necessário, ser utilizados.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Salvo contra-indicação, a ratazana é a espécie preferida. Devem utilizar-se animais jovens, saudáveis e de uma estirpe corrente de laboratório. No início da experiência, a variação do peso dos animais utilizados não deve exceder em ± 20 % o valor médio adequado.

1.6.2.2. Número e sexo

São utilizados pelo menos 10 animais (5 fêmeas e 5 machos) para cada grupo de ensaio. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. Se se planear sacrificar certo número de animais ao longo do ensaio, deve acrescentar-se o número de animais que se prevê vir a sacrificar. Além disso, um grupo satélite de 10

animais (5 animais de cada sexo), pode ser tratado com a dose mais elevada durante 28 dias, sendo observado quanto à reversibilidade, à persistência ou ao aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante os 14 dias que se seguem ao tratamento.

1.6.2.3. Concentrações da exposição

São necessárias pelo menos três concentrações assim como um lote testemunha ou,se for caso disso, um lote testemunha para o veículo (correspondendo à concentração do veículo no nível de exposição mais elevado. Com excepção da inalação da substância de ensaio, os animais do grupo testemunha devem ser tratados do mesmo modo que os animais do grupo de experiência. A dose mais elevada deve produzir efeitos tóxicos, que não devem ocasionar, ou só raramente, a morte. A dose mais fraca não deve fazer aparecer qualquer efeito tóxico. Quando se dispõe de informação relativa à exposição humana, a concentração mais fraca deve ser superior a esse valor. Em condições ideais, a concentração intermédia deve produzir efeitos tóxicos observáveis mínimos. Se se utilizarem várias concentrações intermédias, as concentrações devem ser suficientemente espaçadas para produzir uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos lotes com concentrações fracas e intermédias, bem como nos lotes testemunha, a incidência da mortalidade deve ser fraca a fim de permitir uma avaliação significativa dos resultados.

1.6.2.4. Período de exposição

A exposição diária deve ser de 6 horas, podendo no entanto ser necessárias diferentes durações, para dar resposta a certas exigências específicas.

1.6.2.5. Equipamento

Os animais devem ser expostos à substância a ensaiar, por meio de um dispositivo de inalação concebido de modo a assegurar um fluxo de ar contínuo ou pelo menos com 12 renovações de ar por hora, que garantam um teor em oxigénio adequado e uma distribuição uniforme do produto a ensaiar no ar. Se se utilizar uma câmara, esta deve ser concebida de modo a reduzir o empilhamento dos animais e a assegurar-lhes uma exposição máxima à substância, por inalação. Regra geral, assegura-se a estabilidade da atmosfera duma câmara, tendo em atenção que «o volume» total dos animais não exceda 5 % do volume da câmara. Pode também recorrer-se a um sistema de exposição oro-nasal, só da cabeça ou do corpo inteiro, em câmara individual; os dois primeiros tipos de exposição citados permitem reduzir a penetração por outras vias.

1.6.2.6. Período de observação

Os animais deverão ser observados diariamente, com o fim de se verificar os sintomas de toxicidade, durante todo o período de tratamento e de recuperação. O momento da morte e o momento em que os sintomas de toxicidade aparecem e desaparecem devem ser registados.

1.6.3. *Técnica*

Os animais são diariamente expostos à substância de ensaio à razão de 5 ou 7 dias por semana, durante um período de 28 dias. Os animais de qualquer grupo satélite destinados a observações complementares são mantidos vivos, durante ainda mais 14 dias, sem tratamento, a fim de investigar a cura ou a persistência dos efeitos tóxicos. A temperatura à qual se efectua a prova é mantida a 22°C ± 3°C. Em condições óptimas, a humidade relativa deve ser mantida entre 30 e 70 % mas,em certos casos, isso pode ser impossível (por exemplo nos ensaios com aerossóis). Durante a exposição, os animais não devem receber nem alimento nem água.

Deve ser utilizado um sistema de inalação que funcione em condições dinâmicas incluindo um dispositivo de controlo analítico da concentração. Para determinar as concentrações de exposição convenientes, recomenda-se a realização de um ensaio preliminar. O débito deve ser ajustado para assegurar concentrações homogéneas em toda a câmara. O sistema deve permitir obter condições de exposição estáveis tão rápidamente quanto possível.

É conveniente medir e controlar:

a) O débito do ar (permanentemente);

b) A concentração real da substância medida na zona de respiração. Durante o período de exposição diária, a concentração não deve variar mais do que ± 15 % em relação ao valor médio. No entanto, no caso de poeiras e aerossóis, este grau de controlo pode não ser atingido e portanto um desvio maior pode então ser aceite. Durante toda a experiência, é preciso manter as concentrações diárias tão constantes quanto possível. Para partículas e aerossóis, a fim de avaliar a estabilidade da distribuição do tamanho das partículas, deve fazer-se uma medição destas últimas tantas vezes quantas as necessárias;

c) Temperatura e humidade;

d) Durante e após a exposição são realizadas observações que são sistematicamente registadas; devem ser conservados os registos individuais para cada animal. Todos os animais devem ser observados diáriamente e devem ser registados os sintomas de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e duração. As observações diárias devem incidir, entre outras, sobre as alterações da pele e dos pêlos, dos olhos e mucosas, aparelho respiratório, sistema circulatório, sistema nervoso autónomo e central assim como da actividade somatomotora e do comportamento. Os pesos dos animais devem ser determinados todas as semanas. E igualmente recomendado medir o consumo alimentar semanal. É necessário vigiar os animais com regularidade a fim de não haver perdas por razões de canibalismo, autólise dos tecidos ou erro na condução da experiência. No final da experiência, todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites são autopsiados. Os animais moribundos devem ser imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que se sequem serão efectuados no final do ensaio em todos os animais (incluindo os animais testemunha):

i) Exame hematológico incluindo pelo menos: hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e de leucócitos, fórmula leucocitária, assim como um estudo da coagulação;

ii) Determinações bioquímicas clínicas do sangue, incluindo pelo menos um critério relativo à exploração das funções hepática e renal: alamina aminotransferase (antigamente conhecida como glutamato-piruvato-transaminase) e aspartato aminotransferase (antigamente conhecido por glutamato-oxalacetato-transaminase) do soro, azoto da ureia, albumina, creatinina plasmática, bilirrubina total e proteínas séricas totais. Outras determinações eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem: cálcio;, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glucose, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, metaemoglobina, actividade colinesterásica, etc. Podem ser necessárias outras análises bioquímicas clínicas para aprofundar o estudo dos efeitos tóxicos observados.

1.6.3.1. Autópsia

Todos os animais de experiência devem ser submetidos a uma autópsia geral. O fígado, rins, glândulas supra-renais e os testículos serão pesados, no estado húmido, o mais rápidamente possível após a dissecação, a fim de evitar a sua secagem. Os órgãos e os tecidos devem ser conservados num meio adequado que permita eventuais exames histopatológicos posteriores: vias respiratórias, fígado, rins, baço, glândulas supra-renais, coração, assim como quaisquer outros órgãos que apresentem lesões importantes ou alterações volumétricas. A rinofaringe e os pulmões devem ser retirados inteiros, pesados e tratados por meio de um fixador adequado que permita a conservação da estrutura pulmonar. Uma perfusão adicionada de fixador é considerada um método eficaz.

1.6.3.2. Exame histopatológico

Para o lote exposto à concentração mais elevada, e para o(s) lote(s) testemunha(s), faz-se um exame histológico dos órgãos e tecidos conservados. Os órgãos e os tecidos que apresentem lesões induzidas pela substância a ensaiar às concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos que foram expostos às concentrações mais baixas. Os animais de todos os grupos satélites devem ser objecto dum exame histológico particularmente incidente sobre os órgãos e os tecidos que revelarem lesões nos outros lotes tratados.

2. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro que indique para cada lote da experiência, o número de animais no início do ensaio e o número de animais que apresenta cada um dos tipos de lesão.

Todos os resultados observados devem ser avaliados por meio de um método estatístico adequado. Qualquer método estatístico reconhecido pode ser utilizado.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

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

— espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.,

— condições experimentais:

Descrição do aparelho de exposição, incluindo a concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de condicionamento do ar, tratamento do ar expirado e, se for caso disso, modalidades de permanência dos animais na câmara de ensaio. Deve ser descrito o equipamento utilizado para medição da temperatura e, se necessário, da estabilidade das concentrações dos aerossóis ou do tamanho das partículas.

Dados relativos à exposição:

Devem ser apresentados sob a forma de um quadro que indique os valores médios, assim como uma medição da variabilidade (por exemplo desvio padrão); devem incluir:

a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;

b) A temperatura e humidade do ar;

c) As concentrações nominais (quantidade total da substância de ensaio introduzida no dispositivo de inalação, dividida pelo volume do ar);

d) Se for caso disso, natureza do veículo;

e) Concentrações reais na zona de respiração;

f) Dimensões médias das partículas (se necessário).

— resposta tóxica por sexo e concentração,

— momento da morte durante a experiência ou a indicação de que os animais sobreviveram à experiência,

— efeitos tóxicos ou outros, nível sem qualquer efeito,

— momento da observação de qualquer sintoma anormal e sua evolução;

— quantidade de alimento e peso corporal,

— exames hematológicos efectuados e seus resultados completos,

— provas bioquímicas clínicas efectuadas e seus resultados completos,

— resultados das autópsias,

— descrição eventual de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.9. TOXICIDADE SUBAGUDA — ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA

1. MÉTODO

1.1 Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

A substância de ensaio é aplicada diariamente por via cutánea, em doses crescentes a vários lotes de ensaio, à razão de uma dose por lote, durante um período de 28 dias. Durante o período de aplicação os animais são observados todos os dias a fim de se verificarem os sintomas de toxicidade. São autopsiados os animais que morrem durante a experiência, assim como os que sobrevivem à sua conclusão.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

Os animais são mantidos em condições de alojamento e de alimentação adequadas para a experiência, durante pelo menos os 5 dias que a precedem. Antes de começar o ensaio, os jovens animais saudáveis são repartidos ao acaso em lotes tratados e lotes testemunhas. Pouco tempo antes do ensaio, corta-se o pêlo da região dorsal dos animais. Pode-se rapar o pêlo, mas neste caso a operação deve ser feita 24 horas antes da prova. Durante o corte ou a rapagem deve procurar-se evitar qualquer lesão na pele. A superfície corporal a preparar para a aplicação da subtância a ensaiar não deve ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal deve ser considerado para decidir sobre a zona a preparar e sobre as dimensões da superfície a tratar. Quando o ensaio se efectuar com substâncias sólidas que, se for caso disso, podem ser pulverizadas, aquelas devem ser humedecidas com água ou, se necessário, com um veículo adequado de modo a assegurar um bom contacto com a pele. As substâncias líquidas são geralmente utilizadas não diluídas. Procede-se a uma aplicação diária à razão de 5 a 7 dias em cada semana.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Pode utilizar-se o rato, o coelho ou a cobaia adultos. Podem também utilizar-se outras espécies mas a sua utilização necessita de justificação. No início da experiência, a variação de pesos entre os animais não deve exceder ± 20 % do valor médio.

1.6.2.2. Número e sexo

Pelo menos 10 animais (5 fêmeas e 5 machos), com pele sã, devem ser utilizados para cada dose. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. Se se planear sacrificar certo número de animais ao longo do ensaio, deve acrescentar-se o número de animais que se prevê vir a sacrificar antes do final da experiência. Além disso, um grupo satélite de 10 animais (5 animais para cada sexo) pode ser tratado com o nível da dose mais elevada durante 28 dias e ser observado quanto à reversibilidade, à persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante os 14 dias que se seguem ao tratamento.

1.6.2.3. Doses

Utilizam-se pelo menos 3 doses, assim como um lote testemunha e, se for caso disso, um lote testemunha para o veículo. O período de exposição será no mínimo de 6 horas por dia. A substância de ensaio deve ser aplicada todos os dias à mesma hora e as doses devem ser adaptadas semanalmente ou bissemanalmente a fim de conservar um nível de dose constante em relação com o peso corporal dos animais. Com excepção das substâncias de ensaio, os animais do lote testemunha devem ser tratados do mesmo modo que os dos lotes de experiência. Se for utilizado um veículo para facilitar a dosagem, este deve ser administrado ao lote testemunha nas mesmas condições que para os lotes tratados e a dose recebida corresponderá à recebida pelo grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada deve produzir efeitos tóxicos que não ocasionem (ou raramente) a morte. A dose mais fraca não deve produzir o aparecimento de qualquer efeito tóxico. Desde que se disponham de informações relativas à exposição humana, a dose mais fraca não deve exceder este valor. Em condições ideais, a dose intermédia deve produzir efeitos tóxicos mínimos observáveis. Se se utilizam várias doses intermédias, estas devem ser suficientemente espaçadas para originar uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos lotes correspondentes às doses fracas e intermédias, assim como nos lotes testemunhas, a incidência de mortalidade deve ser fraca, a fim de permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Se a aplicação da substância de ensaio provocar uma grave irritação cutânea, as concentrações devem ser reduzidas; isto pode levar a uma diminuição, mesmo um desaparecimento, dos outros efeitos tóxicos com a dose mais elevada. Além disso, se as lesões cutâneas forem muito graves, pode tornar-se necessário interromper a experiência e recomeçá-la com concentrações mais fracas.

1.6.2.4. Ensaio limite

Se uma experiência preliminar realizada com uma dose de 1 000 miligramas/quilograma ou com uma dose mais elevada em função da possível exposição humana, quando esta seja conhecida, não provocar qualquer efeito tóxico, pode considerar-se inútil prosseguir a experiência.

1.6.2.5. Período de observação

Os animais da experiência devem ser objecto de uma observação diária a fim de se descobrir sintomas de toxicidade. Devem ser indicados o momento da morte assim como o momento no qual aparecem e desaparecem os sintomas de toxicidade.

1.6.3. *Técnica*

Os animais devem ser colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio é administrada aos animais, sete dias por semana, durante um período de 28 dias. Os animais de todos os grupos satélites destinados às observações complementares devem ser mantidos vivos por mais 14 dias, sem tratamento, a fim de se verificar a cura ou a persistência dos efeitos tóxicos. A duração diária da exposição é no mínimo de 6 horas por dia. A substância de ensaio deve ser aplicada uniformemente sobre uma superfície, que represente cerca de 10 % da superfície total do corpo. Quando se trata de substâncias altamente tóxicas, a superfície coberta pode ser menor, mas a camada deve ser tão fina e tão uniforme quanto possível.

Durante a exposição, a substância de ensaio é mantida em contacto com a pele por meio de um quadrado de gaze e de um esparadrapo não irritante. A superfície tratada deve, além disso, ser convenientemente coberta de modo a manter no lugar o penso de gaze e a substância de ensaio e a evitar que os animais

possam ingerir esta última. Podem ser utilizados os aparelhos de contenção para impedir a ingestão da substância não sendo no entanto recomendada a imobilização completa dos animais.

No fim do período de exposição, deve-se, se possível, eliminar qualquer resíduo da substância com água ou por qualquer outro processo adequado de limpeza da pele.

Todos os animais devem ser observados diariamente e devem ser registados os sintomas de toxicidade, assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração. As observações diárias incidirão, entre outras, sobre as alterações na pele e no pêlo, nos olhos e mucosas, no aparelho respiratório, no sistema circulatório, no sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. O peso dos animais deve ser determinado semanalmente. É igualmente recomendado medir o consumo alimentar semanal. E necessário observar regularmente os animais a fim de assegurar que estes não sejam perdidos para o estudo, por razões tais como o canibalismo, autólise dos tecidos ou erro na condução da experiência. No final da experiência, todos os animais sobreviventes dos lotes não satélites são autopsiados. Os animais moribundos são imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que se seguem serão efectuados no final da experiência, em todos os animais (incluindo os do lote testemunha):

1. Exame hematológico, incluindo pelo menos hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e de leucócitos, fórmula leucocitária e ainda um estudo da coagulação;

2. Determinações bioquímicas clínicas do sangue incluindo pelo menos um critério relativo à exploração das funções hepática e renal: alanina aminotransferase (antigamente conhecida como glutamato-piruvato-transaminase) e aspartato aminotransferase (antigamente conhecida por glutamato-oxalacetato-transaminase) do soro, azoto da ureia, albumina, creatinina plasmática, bilirrubina total e proteínas séricas totais.

Outras determinações eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem: cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glucose, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, metaemoglobina e actividade colinesterásica.

Outras análises bioquímicas clínicas podem, se necessário, ser efectuadas para aprofundar o estudo dos efeitos observados.

1.6.4. *Autópsia*

Todos os animais submetidos ao ensaio devem ser objecto de uma autópsia geral. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos devem ser pesados no estado húmido e o mais rapidamente possível após a dissecação, a fim de evitar a sua secagem. Os órgãos e os tecidos (isto é, a pele normal e tratada), o fígado, os rins e os órgãos atingidos (isto é, os que apresentam lesões importantes ou alterações volumétricas) devem ser conservados num meio adequado para eventuais exames histopatológicos posteriores.

1.6.5. *Exame histopatológico*

Deve fazer-se um exame histológico dos tecidos e órgãos conservados, do lote exposto à dose mais elevada e do lote testemunha. Os órgãos e tecidos que apresentam lesões induzidas pela substância de ensaio ao nível da dose mais elevada, devem ser examinados em todos os lotes que tenham sido expostos a doses mais fracas. Os animais do lote satélite devem ser objecto de exame histológico incidindo particularmente sobre os órgãos e tecidos nos quais foram verificadas lesões nos outros lotes tratados.

2. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada lote de experiência, o número de animais no início do ensaio e o número de animais que apresentam cada tipo de lesão.

Todos os resultados observados devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RESULTADOS

3.1. **Relatório do ensaio**

O relatório deve conter, se possível, as seguintes informações:

— dados relativos aos animais (espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar, etc.),

— condições experimentais,

— doses (incluindo veículos, se for caso disso) e concentrações,

— nível sem qualquer efeito, se possível,

— respostas tóxicas por sexo e por dose,

— momento da morte durante a experiência ou a indicação de que os animais sobreviveram à experiência,

— efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer sintoma anormal e sua evolução,

— quantidade de alimento e peso corporal,

— exames hematológicos efectuados e seus resultados completos;

— provas bioquímicas clínicas efectuadas e seus resultados completos,

— resultados das autópsias,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.10. OUTROS EFEITOS: MUTAGÉNESE

PROVA CITOGENÉTICA *IN VITRO* EM MAMÍFERO

1. Método

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípios do método

A prova citogenética *in vitro* é um ensaio de mutagenicidade a curto prazo, para a pesquisa de aberrações cromossómicas estruturais nas células de cultura dos mamíferos. Podem ser utilizadas culturas de linhagens celulares já estabelecidas e também culturas de células primárias. Após exposição às substâncias de ensaio, com e sem uma mistura de activação de enzimas hepáticos (fracção pós-mitocôndrica suplementada com cofactores), as culturas celulares são tratadas com um inibidor do fuso mitótico, tal como a colchicina, com o fim de acumular as células numa fase de mitose do tipo metafásico (c-metafase). As células são recolhidas em momentos adequados e efectuam-se então preparações cromossómicas. As preparações são coradas e as células em metafase são analisadas para pesquisa de aberrações cromossómicas.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

As substâncias do ensaio são preparadas em meio de cultura ou dissolvidas em veículos adequados antes do tratamento das células. Utilizam-se linhagens celulares estabelecidas ou culturas de células primárias, por exemplo células de cricetos chineses e linfócitos humanos.

1.6.2. *Condições experimentais*

Número de culturas:

São utilizadas pelo menos duas culturas para cada ponto experimental.

Utilização de testemunhas positivas e negativas:

O solvente (desde que este não seja o meio de cultura ou água), a mistura de activação de enzimas hepáticos, a mistura de activação de enzimas hepáticos com o solvente assim como as testemunhas não tratadas são utilizados como testemunhas negativas.

É incluída em cada experiência uma testemunha positiva; quando a mistura de activação de enzimas hepáticas é utilizada para activar a substância a testar, é necessário utilizar, como testemunha positiva, uma substância que necessite de uma activação metabólica.

Utilizam-se pelo menos 3 doses da substância a testar, num intervalo de pelo menos uma variação de dose de 1 logaritmo, sendo a dose mais elevada capaz de reduzir a actividade mitótica em cerca de 50 %.

Condições de cultura:

São utilizados um meio de cultura e condições de incubação adequadas (por exemplo temperatura, recipientes de cultura, concentrações em CO_2 e humidade).

1.6.3. *Técnica*

1.6.3.1. Preparação das culturas

Linhagens celulares estabelecidas: as células são obtidas a partir de culturas-mãe (por exemplo por tripsinização ou por isolamento selectivo por agitação vigorosa), inoculadas em recipientes de cultura com uma densidade conveniente e incubadas a 37 °C.

Linfócitos humanos: sangue heparinado é adicionado ao meio de cultura, contendo fitoemaglutina, soro de feto de vitela assim como antibióticos, e incubado a 37 °C.

1.6.3.2. Tratamento das culturas com a substância do ensaio

i) Tratamento sem mistura de activação de enzimas hepáticas

Todos os tratamentos devem cobrir o tempo de um ciclo celular completo e os esquemas de fixação devem garantir a análise das primeiras mitoses posteriores ao tratamento das células tratadas nos diferentes estádios do seu ciclo. Quando o tratamento não cubra um ciclo celular completo, escolhem-se tempos de fixação múltiplos a fim de se retirarem amostras de células que se encontrem em diferentes estádios do ciclo celular durante o tratamento, isto é, G_1, S e G_2.

A substância de ensaio é adicionada às culturas de linhagens celulares estabelecidas, quando estas se encontrem na sua fase de crescimento esponencial. As culturas de linfócitos humanos são tratadas enquanto estão ainda em estado semi-síncrono. Se a substância de ensaio alterar a duração do ciclo celular, então o intervalo de fixação terá de ser mudado em conformidade.

ii) A mistura de activação de enzimas hepáticos utilizados para o tratamento da substância de ensaio deve estar presente tanto tempo quanto possível, sem exercer no entanto um efeito tóxico sobre as células. Se, por razões de toxicidade, este tratamento não cobrir a duração de um ciclo celular completo, escolhem-se tempos de fixação múltiplos, a fim de se retirarem amostras de células que se encontrem em estádios diferentes do ciclo celular no momento do tratamento, isto é, G_1, S e G_2.

Colheita de células

As culturas celulares são tratadas com um inibidor do fuso mitótico, 1 a 2 horas antes da sua colheita. Cada cultura é colhida e tratada separadamente para a preparação dos cromossomas.

1.6.2.3. Preparação dos cromossomas

Esta preparação compreende um tratamento hipotónico das células, a fixação, a montagem sobre as lâminas e a coloração.

Análises

São analisadas no mínimo 100 metafases bem espalhadas por cultura, para pesquisa de aberrações cromossómicas. As lâminas são codificadas antes da análise.

Para os linfócitos humanos, somente são analisadas as metafases que contêm 46 centrómetros. Nas linhagens celulares estabelecidas, só são analisadas as metafases que contêm ± 2 centrómetros do número modal.

2. DADOS

Os dados são apresentados sob a forma de quadros. As aberrações do tipo cromatidiano (lacunas, fracturas, trocas mútuas), as do tipo cromossómico (lacunas, fracturas, cromossomas minúsculos, anéis, dicêntricos, policêntricos) e o número de metafases anormais (lacunas incluídas e excluídas) são registados separadamente, para todas as culturas tratadas, assim como para as culturas testemunhas.

Os dados são avaliados por métodos estatísticos adequados.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

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

— células utilizadas,

— condições experimentais: composição do meio de cultura, concentração em CO_2, temperatura de incubação, duração da incubação, doses, momento do tratamento, duração do tratamento com o inibidor de fuso mitótico e concentração daquele, tipo de mistura de activação de enzimas hepáticos utilizado, testemunhas positivas e negativas,

— número de culturas celulares,

— número de metafases analisadas (dados indicados separadamente para cada cultura),

— índice mitótico,

— tipo e número de aberrações indicadas separadamente para cada cultura tratada e cada testemunha, número modal de cromossomas nas linhagens celulares estabelecidas utilizadas,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.11. OUTROS EFEITOS: MUTAGÉNESE

PROVA CITOGENÉTICA *IN VIVO* EM MEDULA ÓSSEA DE MAMÍFERO, ANÁLISE CROMOSSÓMICA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definições

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

A prova citogenética *in vivo* é um ensaio de mutagenicidade a curto prazo, destinada a pesquisar aberrações cromossómicas estruturais.

Estas são geralmente avaliadas no decorrer da primeira mitose consecutiva ao tratamento. Com os mutagéneos químicos, a maioria das aberrações induzidas são do tipo cromatídico.

Neste método, utiliza-se a medula óssea de mamíferos expostos, pelas vias adequadas, às substâncias de ensaio e sacrificados em intervalos sucessivos. Antes de serem sacrificados, os animais são tratados por meio de substâncias tais como a cochicina, que impedem a formação do fuso, com o fim de acumular as células em fase de mitose do tipo metafásico (c-metafase). São efectuadas preparações de cromossomas a partir de células secas ao ar e depois coradas; as metafases são em seguida analisadas ao microscópio a fim de se pesquisarem aberrações cromossómicas.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

As substâncias de ensaio são dissolvidas numa solução fisiológica. Quando se trata de substâncias insolúveis, estas são dissolvidas ou postas em suspensão em veículos adequados.

São utilizadas soluções da substância de ensaio preparadas recentemente.

Se é utilizado um veículo para facilitar a dosagem, este não deve interferir com a substância de ensaio nem produzir efeitos tóxicos.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Utilizam-se os roedores: ratazana, rato ou criceto chinês. Os jovens animais adultos e saudáveis são repartidos ao acaso em lotes tratados e lotes testemunhas.

1.6.2.2. Número e sexo

São utilizados pelo menos 5 fêmeas e 5 machos em cada lote experimental e em cada lote testemunha. Dez animais serão pois sacrificados por período e por grupo, caso o programa experimental inclua vários momentos de observação após o tratamento.

1.6.2.3. Via de administração

Em geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas uma só vez. Em função das informações toxicológicas de que se dispõe, pode ser utilizado um programa de administração repetida. No entanto, isso só pode acontecer, caso a substância que deve ser submetida ao ensaio não tenha um efeito citotóxico sobre a medula óssea. A administração faz-se geralmente por via oral ou por injecção intraperitoneal. Podem, no entanto, ser usadas outras vias de administração adequadas.

1.6.2.4. Utilização de testemunhas positivas e negativas

Uma substância, à qual se atribui a produção de aberrações cromossómicas *in vivo*, é utilizada como testemunha positiva, sendo igualmente incluído no plano de cada experiência um lote testemunha negativa (solvente).

1.6.2.5. Doses

Para o processo de base, utiliza-se uma dose de substância de ensaio, que é a dose máxima tolerada ou a que faz aparecer certos sinais de citotoxicidade, por exemplo, uma inibição parcial da mitose.

Podem ser utilizadas doses adicionais, quando sejam indicadas por razões de ordem científica.

Se o ensaio servir de método de verificação, devem utilizar-se pelo menos duas doses suplementares.

1.6.3. *Técnica*

O ensaio pode ser utilizado de dois modos:

i) A substância de ensaio é administrada uma vez aos animais, na dose máxima tolerada. Após o tratamento, são colhidas amostras três vezes. A colheita do meio é feita às 24 horas. Como a cinética do ciclo celular pode ser influenciada pela substância de ensaio, são realizadas uma colheita anterior e uma colheita posterior com intervalos adequados, no intervalo das 6 a 48 horas que se seguem à administração da substância. Quando forem utilizadas doses suplementares, convém colher as amostras no período de sensibilidade máxima ou, se esta não for conhecida, 24 horas após o tratamento

ii) Se os dados fármaco-cinéticos e metabólicos indicarem um programa de tratamento repetido, pode ser utilizada uma dosagem repetida e as amostras devem ser colhidas 6 e 24 horas após o último tratamento.

Preparação da medula óssea

Antes de se sacrificarem os animais, injecta-se-lhes, por via peritoneal, uma dose adequada de inibidor do fuso mitótico, a fim de se obter um número de células adequadas em c-metafase. A medula óssea obtém-se dos dois fémures dos animais sacrificados recentemente, por lavagem com uma solução isotómica. Após um tratamento hipotónico adequado, as células são fixadas e depois montadas sobre as lâminas. Após secagem ao ar, as lâminas são coradas.

Análise

As lâminas são codificadas antes de serem analisadas ao microscópio. No mínimo 50 metafases bem espalhadas e com o número completo de centrómeros são analisadas por animal para pesquisa das aberrações cromossómicas estruturais. Os índices mitóticos podem, por outro lado, ser estabelecidos para cada animal.

2. DADOS

Os dados são apresentados sob a forma de quadros. As aberrações do tipo cromatídico e isocromatídico (lacunas, fracturas, re-arranjos) e o número de metafases anormais (com e sem lacunas), assim como os índices mitóticos (se estabelecidos), são registados separadamente para todos os animais tratados e também para os animais testemunhas. Os valores médio e os desvios-padrão obtidos para cada lote tratado assim como para cada lote testemunha são igualmente registados. Os dados são avaliados por métodos estatísticos adequados.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve conter as seguintes informações:

— espécie, estirpe e idade dos animais utilizados

— número de animais de cada sexo dos lotes tratados e dos testemunha,

— condições experimentais: descrição pormenorizada dos programas de tratamento e de colheitas, doses, duração do tratamento com inibidor de fuso miótico e a concentração destas substâncias,

— número de metafases analisadas por animal,

— índices mitóticos (se estabelecidos),

— tipo e número de aberrações, indicadas separadamente para cada animal tratado e para cada animal testemunha,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.12. OUTROS EFEITOS: MUTAGÉNESE

PROVA DO MICRONÚCLEO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

A prova do micronúcleo é um ensaio *in vivo* a curto prazo em mamíferos, destinado a pesquisar as lesões cromossómicas ou as do aparelho mitótico induzidas por substâncias químicas. Este ensaio é baseado no aumento do número de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos dos animais tratados em relação aos animais testemunhas.

Os micronúcleos são formados de fragmentos de cromossomas ou de cromossomas inteiros, abandonados aquando da mitose. Quando os eritoblastos se transformam em eritrócitos, o núcleo principal é expulso, enquanto que o micronúcleo é conservado no citoplasma. Para este ensaio utilizam-se jovens eritrócitos policromáticos provenientes da medula óssea de mamíferos de laboratório, que foram expostos, pelas vias adequadas, às substâncias de ensaio. Após a extracção da medula óssea, os esfregaços são preparados e corados. Contam-se ao microscópio o número de micronúcleos presentes nos eritrócitos policromáticos e estabelece-se uma relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

As substâncias a testar são dissolvidas numa solução isotómica. Se se tratar de substâncias insolúveis, elas são dissolvidas ou postas em suspensão em veículos adequados. Se for utilizado um veículo, ele não deve interferir com a substância do ensaio, nem produzir efeitos tóxicos. Normalmente, utilizam-se soluções da substância a testar, preparadas recentemente.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Animais de experiência

Recomenda-se a utilização de ratos, mas também podem ser utilizados outros mamíferos. Animais adultos jovens saudáveis são repartidos ao acaso em lotes tratados e em lotes testemunhas.

1.6.2.2. Número e sexo

Utilizam-se 5 fêmeas e 5 machos por lote tratado e por lote testemunha.

São sacrificados 10 animais por período e por lote, se o programa experimental incluir vários momentos de observação apos o tratamento.

1.6.2.3. Via de administração

Em geral, as substâncias devem ser administradas uma só vez. Em função das informações toxicológicas de que se dispõe, pode ser aplicado um programa de tratamento repetido. No entanto, o esquema de tratamento repetido só pode ser aplicado se a substância a testar não tiver efeito citotóxico sobre a medula óssea.

A administração faz-se geralmente por via oral ou por injecção intraperitoneal. No entanto, podem ser adequadas outras vias de administração.

1.6.2.4. Utilização de testemunhas negativas e positivas

Podem ser utilizadas testemunhas positivas assim como negativas (solvente) para cada experiência.

1.6.2.5. Doses

Para o processo de base, utiliza-se uma dose da substância de ensaio, que é a dose máxima tolerada ou a que faz aparecer certos sinais de citotoxicidade, por exemplo, uma alteração da relação eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos.

Podem ser utilizadas doses adicionais, quando sejam justificadas por razões de ordem científica.

Se o ensaio serve de método de verificação, deve utilizar-se pelo menos 2 doses suplementares.

1.6.3. *Técnica*

O ensaio pode ser realizado de dois modos:

i) A substância é administrada uma só vez aos animais, na dose máxima tolerada. As colheitas das amostras devem ser efectuadas no momento que corresponde à sensibilidade máxima do ensaio, que varia de acordo com a substância de ensaio. É por isso que, quando se utiliza a dose máxima, se devem colher as amostras da medula óssea pelo menos por 3 vezes, no início do tratamento, e depois com intervalos adequados, sem no entanto ultrapassar as 72 horas.

   Quando se utilizam doses suplementares, convém colher as amostras no período de sensibilidade máxima ou, se esta não é conhecida, 24 horas após o tratamento.

ii) Se os dados fármaco-cinéticos e metabólicos indicam um programa de tratamento repetido, pode ser utilizada uma dosagem repetida e as amostras devem ser colhidas pelo menos por 3 vezes, o mais tardar 12 horas após o último tratamento e depois em intervalos adequados sem no entanto ir além das 72 horas.

Preparação da medula óssea

A medula óssea obtém-se por lavagem dos dois fémures dos animais sacrificados recentemente com soro de feto de vitelo. As células são sedimentadas por centrifugação e a parte sobrenadante é eliminada. Algumas gotas da suspensão celular homogénea são depositadas e espalhadas em esfregaços sobre lâminas. Após secagem ao ar, as lâminas são coradas.

Análise

As lâminas são codificadas antes de serem analisadas ao microscópio. Pesquisa-se a presença de micronúcleos em pelo menos 1 000 eritrócitos policromáticos por animal.

A relação entre os eritrócitos normocromáticos e policromáticos é determinada, para cada animal, numa base de 1 000 eritrócitos.

2. DADOS

Os dados são apresentados sob a forma de quadros. O número de eritrócitos policromáticos, o número de eritrócitos policromáticos compreendendo os micronúcleos assim como a percentagem de células micronucleadas, são registados separadamente para cada animal tratado e para cada animal testemunha, do mesmo modo que a relação entre os eritrócitos normocromáticos e policromáticos. As médias e os desvios padrão são igualmente registados para cada lote tratado e para cada lote testemunha. Os dados são avaliados por métodos estatísticos adequados.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

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

— espécie e estirpe dos animais utilizados e sua idade,

— número dos animais de cada sexo dos lotes tratados e dos testemunhas,

— condições experimentais: descrição pormenorizada dos programas de tratamento e de colheitas, doses, dados relativos à toxicidade, testemunhas negativas e positivas,

— critério de contagem dos micronúcleos

— relação dose-efeito, se possível,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver introdução geral, parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.13. OUTROS EFEITOS: MUTAGÉNESE

ENSAIOS DE MUTAÇÃO REVERSA NA *ESCHERICHIA COLI*

1. **Método**

1.1. **Introdução**

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. **Definição**

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. **Substância de referência**

Nenhuma.

1.4. **Princípio do método**

O sistema de reversão ao triptofano da *E. coli* (trp) é um ensaio microbiano que permite medir a reversão $trp^- \rightarrow trp^+$, devido às substâncias químicas responsáveis pela substituição de base ao nível do genoma do organismo.

As bactérias são expostas às substâncias do ensaio com e sem activação metabólica. Após um período de incubação adequado num meio mínimo, contam-se as colónias revertantes e compara-se o número obtido com o das revertantes espontâneas observadas numa cultura testemunha não tratada e/ou em presença de solvente.

1.5. **Critério de qualidade**

Nenhum.

1.6. **Descrição do método**

O ensaio pode ser realizado pelos métodos seguintes:

i) Método da pré-incubação

ii) Método de incorporação directa, onde as bactérias e a substância de ensaio são misturadas na gelose de recobrimento e depois vertidas na superfície duma caixa de gelose selectiva.

1.6.1. *Preparações*

1.6.1.1. Bactérias

As bactérias são cultivadas a 37 °C até ao final da fase exponencial ou até ao início da fase estacionária de crescimento. A densidade celular aproximada deve ser de 10^8 — 10^9 células por mililitro.

1.6.1.2. Activação metabólica

As bactérias devem ser expostas à substância de ensaio com ou sem uma mistura de activação adequada de enzimas hepáticos de mamíferos (fracção pós-mitocôndrica suplementada de co-factores), preparada a partir de cobaias ou ratos pré-tratados com indutores enzimáticos.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Estirpes da experiência

São utilizadas as três estirpes seguintes: WP2, WP2 uvr A e WP2 uvr ApKM 101. É conveniente a utilização de métodos reconhecidos para a preparação e a conservação das culturas. As exigências do crescimento e da identificação genética das estirpes, a sua sensibilidade aos raios UV ou à mitomicina C, assim como a resistência à ampicilina para a estirpe WP2 uvr ApKM 101, devem ser verificadas. As estirpes devem igualmente produzir revertantes espontâneos nas gamas de frequência antecipadas.

1.6.2.2. Meio de cultura

Utiliza-se um meio adequado à expressão e à selecção dos mutantes, assim como uma gelose de recobrimento adequada.

1.6.2.3. Utilização de testemunhas negativas e positivas

Devem utilizar-se em paralelo ensaios com testemunhas não tratadas e com testemunhas em presença de solventes. As testemunhas positivas devem igualmente ser realizadas com os dois fins seguintes:

i) Confirmar a sensibilidade das estirpes bacterianas. Podem ser utilizadas como testemunhas positivas, para os ensaios sem activação metabólica, o sulfonato de metilmetano, o óxido de 4-nitroquinoleína ou a etilnitrosoureia;

ii) Garantir a actividade do sistema metabolisante adequado. O 2-aminoantraceno constitui uma testemunha positiva da actividade de um (do) sistema metabolisante para todas as estirpes. É conveniente, se possível, utilizar uma testemunha positiva que pertença à mesma classe química que a substância submetida ao ensaio.

1.6.2.4. Quantidade de substância a ensaiar por placa

Pelo menos 5 quantidades diferentes da substância de ensaio devem ser ensaiadas com variações semilogarítmicas entre as caixas. As substâncias são sujeitas ao ensaio até que os limites de solubilidade ou de toxicidade sejam atingidos. A toxicidade é posta em evidência por uma redução do número de revertantes espontâneos, um clareamento do fundo, ou pela taxa de sobrevivência das culturas tratadas. As substâncias químicas não tóxicas devem ser ensaiadas até 5 mg por caixa, antes que se possa considerar a substância de ensaio como negativa.

1.6.2.5. Condições de incubação

As caixas são incubadas de 48 a 72 horas a 37 °C.

1.6.3. *Técnica*

No método de incorporação directa em caixa, sem activação enzimática, junta-se a substância de ensaio e 0,1 ml de cultura bacteriana recente, a 2,0 ml de gelose de recobrimento. Para os ensaios com activação metabólica, junta-se à gelose 0,5 ml da mistura de activação de enzimas hepáticos, contendo uma quantidade adequada da fracção pós-mitocôndrica, após adição da substância de ensaio e das bactérias. O conteúdo de cada tubo é misturado e vertido na superfície duma caixa de gelose selectiva. A gelose de recobrimento solidifica e as caixas são incubadas a 37 °C, durante 48 a 72 horas. No final do período de incubação, contam-se as colónias revertantes por caixa.

Para o método de pré-incubação, uma mistura contendo a substância, 0,1 ml de cultura bacteriana fresca e uma quantidade adequada de mistura de activação de enzimas hepáticos, ou a mesma quantidade de solução tampão, pré-incubada antes da adição de 2,0 ml de gelose de recobrimento. O resto do modo operatório é idêntico ao utilizado para o método de incorporação directa em caixa.

Todas as caixas preparadas para estes 2 métodos são em triplicado.

2. DADOS

O número de colónias revertantes por caixa é indicado para as séries testemunhas e para as séries tratadas. As contagens por caixa, o número médio de colónias revertantes por caixa e os desvios-padrão devem ser indicados para a substância ensaiada e para as testemunhas.

Todos os resultados são confirmados durante uma experiência independente.

Os dados devem ser avaliados por métodos estatísticos convenientes.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

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

— bactérias e estirpe utilizadas,

— condições experimentais: doses, toxicidade, composição do meio, métodos de tratamento (pré-incubação, incubação), mistura de activação de enzimas hepáticos, substância de referência, testemunhas negativas,

— contagem por caixa, número médio de colónias revertantes por caixa, desvio-padrão, relação dose/ /efeito, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

B.14. OUTROS EFEITOS: MUTAGÉNESE

ENSAIOS DE MUTAÇÃO REVERSA EM *SALMONELLA THYPHIMURIUM*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver introdução geral, Parte B (ponto A).

1.2. Definição

Ver introdução geral, Parte B (ponto B).

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método

O sistema de reversão à histidina (his) da *Salmonella typhimurium* é um ensaio microbiano, que permite medir a reversão $his^- \rightarrow his^+$ induzida por substâncias químicas responsáveis por substituições de base ou por mutações deslocando o quadro de leitura ao nível do genoma do organismo.

As bactérias são expostas à substância de ensaio com ou sem activação metabólica e vertidas numa superfície mínima de um meio. Após um período de incubação conveniente, conta-se o número de colónias revertantes e compara-se com o número de revertantes espontâneas observadas numa cultura testemunha não tratada e/ou em presença do solvente.

1.5. Critério de qualidade

Nenhum.

1.6. Descrição do método

1.6.1. *Preparações*

1.6.1.1. Bactérias

São feitas crescer a 37 °C culturas recentes de bactérias, até final da fase exponencial ou até ao início da fase estacionária de crescimento. A densidade celular aproximada deve ser de 10^8 — 10^9 células por mililitro.

1.6.1.2. Activação metabólica

As bactérias devem ser expostas à substância de ensaio com e sem uma mistura de activação de enzimas hepáticas de mamíferos (fracção pós-mitocôndrica sem co-factores) preparada a partir de ratos ou de ratazanas pré-tratados com indutores enzimáticos.

1.6.2. *Condições experimentais*

1.6.2.1. Estirpes da experiência

Devem ser utilizadas, pelo menos, as quatro estirpes seguintes: TA 1535, TA 1537, TA 98 e TA 100; podem ser usadas como suplemento outras estirpes, tais como, TA 1538.

Convém utilizar métodos reconhecidos para a preparação e a conservação das culturas. As exigências de crescimento e da identificação genética das estirpes, a sua sensibilidade aos raios UV e ao cristal violeta, assim como a sua resistência à ampicilina devem ser verificadas. As estirpes devem igualmente produzir revertantes nas gamas de frequência antecipadas.

1.6.2.2. Meio

É utilizado um meio selectivo adequado, assim como uma gelé e de recobrimento adequada.

1.6.2.3. Utilização de testemunhas negativas e positivas

Devem utilizar-se em paralelo testemunhas não tratadas e testemunhas em presença de solventes.

Devem igualmente ser utilizadas testemunhas positivas, com os 2 fins seguintes:

i) Confirmar a sensibilidade das estirpes bacterianas.

Os compostos seguintes podem ser utilizados para os ensaios sem activação metabólica:

Com	*Estirpe de reversão*
TA 1535, TA 100	Azida de sódio
TA 1538, TA 98	2-nitrofluoreno
TA 1537	9-amidoacridina

ii) Garantir a actividade do sistema metabólico adequado. Uma testemunha positiva de actividade dum sistema metabolizante é o 2-aminoantraceno para todas as estirpes. Se possível, utilizar uma testemunha positiva que pertença à mesma classe química que a substância de ensaio.

1.6.2.4. Quantidade de substância de ensaio por caixa

Pelo menos 5 quantidades diferentes de substâncias devem ser submetidas ao ensaio com variações semilogarítmicas entre as caixas. As substâncias são submetidas ao ensaio até que sejam atingidos os limites de solubilidade ou de toxicidade. A toxicidade é posta em evidência pela redução do número de revertantes espontâneos, um clareamento do fundo, ou pela taxa de sobrevivência das culturas tratadas. As substâncias químicas não tóxicas devem ser submetidas ao ensaio até 5 mg por caixa, antes que possa considerar a substância de ensaio como negativa.

1.6.2.5. Condições de incubação

As caixas são incubadas durante 48 a 72 horas, a 37 °C.

1.6.3. *Técnica*

Para o método de incorporação directa em caixa sem activação enzimática, adiciona-se a substância de ensaio e 0,1 ml de cultura bacteriana recente a 0,2 ml de gelose de recobrimento. Para os ensaios com activação metabólica, junta-se à gelose 0,5 ml da mistura de activação de enzimas hepáticas contendo uma quantidade adequada de fracção pós-mitocóndrica, após a adição da substância de ensaio e das bactérias. Os conteúdos de cada tubo são misturados e vertidos na superfície duma caixa de gelose selectiva. A gelose deve solidificar e as caixas são incubadas a 37 °C, durante 48 a 72 horas. No final do período de incubação, contam-se as colónias revertantes por caixa.

Para o método de pré-incubação, uma mistura contendo a substância de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana recente e uma quantidade adequada de mistura de activação de enzimas hepáticas ou a mesma quantidade de solução tampão, são pré-incubadas antes da adição de 2,0 ml de gelose de recobrimento. O resto da técnica é idêntica à utilizada para o método de incorporação directa em caixa.

Todas as caixas preparadas para estes dois métodos são no mínimo em triplicado.

2. DADOS

O número de colónias revertantes por caixa é indicado para as séries testemunhas e para as séries tratadas. As contagens por caixa, o número médio de colónias revertantes por caixa e os desvios padrão devem ser indicados para a substância de ensaio e para as testemunhas. Todos os resultados são confirmados durante uma experiência independente. Os dados devem ser avaliados por métodos estatísticos adequados.

3. RESULTADOS

3.1. **Relatório do ensaio**

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

— bactérias, estirpe utilizada,

— condições experimentais: doses, toxicidade, composição do meio, método de tratamento (pré-incubação e incubação), mistura de activação de enzimas hepáticas, substâncias de referência, testemunhas negativas,

— contagem por caixa, número médio de colónias revertantes por caixa, desvio padrão, relação dose/efeito, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver introdução geral, Parte B (ponto C).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ver introdução geral, Parte B (ponto D).

PARTE C: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

C.1. TOXICIDADE AGUDA PARA OS PEIXES

1. Introdução

É aconselhável dispor, na medida do possível, de informações sobre a hidrossolubilidade, a pressão de vapor, a estabilidade química, as constantes de dissociação e a biodegradabilidade da substância de ensaio, a fim de ser escolhido o método de ensaio mais adequado (com corrente de passagem estática, semi-estática ou dinâmica), para permitir assegurar concentrações constantes satisfatórias da substância de ensaio durante o período de ensaio.

As outras informações necessárias, por exemplo fórmula estrutural, o grau de pureza, a natureza e a percentagem das impurezas significativas, a presença e quantidade de aditivos e ainda o coeficiente de separação n-octanol/água, devem ser tidas em consideração, para o planeamento do ensaio e a interpretação dos resultados.

1.2. Definição e unidades

A toxicidade aguda é o efeito desfavorável visível, induzido num organismo durante uma curta exposição (dias) a uma dada substância.

No presente ensaio, a toxicidade aguda é expressa como a concentração letal média (CL_{50}), quer dizer, a concentração que na água é a responsável pela morte de 50 % de um lote de peixes submetidos aos ensaios, durante um período de exposição contínua a indicar. As concentrações da substância de ensaio são indicadas em peso por volume (mg/l) e igualmente em peso por peso (partes por milhão).

1.3. Substâncias de referência

Pode submeter-se aos ensaios uma substância de referência, a fim de se demonstrar que, nas condições de ensaio de laboratório, a resposta da espécie submetida ao ensaio não variou de forma significativa.

Nenhuma substância de referência é indicada para este ensaio.

1.4. Princípio do método de ensaio

Os peixes sao expostos à(s) substância(s) de ensaio adicionada(s) à água, com uma dada variação de concentrações, durante um período mínimo de 48 horas, mas de preferência 96 horas. As mortalidades são registadas pelo menos todas as 24 horas e as concentrações responsáveis pela morte de 50 % dos peixes (CL_{50}), são calculadas, se possível, em cada observação.

1.5. Critérios de qualidade

As mortalidade das testemunhas não deve ultrapassar 10 % no final do ensaio.

A concentração em oxigénio deve ser superior a 60 % da saturação durante todo o ensaio.

A análise, as propriedades químicas ou o sistema de ensaio utilizado devem evidenciar que a concentração da substância submetida a ensaio é mantida de modo satisfatório (por exemplo, nos limites de 80 % da concentração inicial durante todo o ensaio).

1.6. **Descrição do método de ensaio**

Podem ser utilizados 3 tipos de sistemas.

Ensaio estático:

Ensaio de toxicidade efectuado em organismos aquáticos, durante o qual não intervém qualquer renovação da solução de ensaio (as soluções permanecem sem alteração durante todo o ensaio).

Ensaio semi-estático:

Ensaio sem renovação contínua da solução, mas com uma renovação periódica quando o período de ensaio se prolonga (por exemplo, cada 24 horas).

Ensaio dinâmico:

Ensaio de toxicidade durante o qual a água é constantemente renovada nos recipientes de ensaio, sendo o produto químico submetido a ensaio transportado pela água que renova o meio da prova.

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Soluções da substância de ensaio

As soluções-padrão com as concentrações exigidas são preparadas por dissolução da substância em água desionizada, ou na água, de acordo com o ponto 1.6.1.2.

As soluções-padrão de substâncias com baixa solubilidade na água podem ser preparadas por dispersão ultrassónica ou, se necessário, recorrendo a solventes orgânicos, emulsionantes ou dispersantes. Sempre que se utiliza este tipo de produtos auxiliares, os peixes testemunhas devem ser expostos a uma concentração de produto auxiliar igual à que se apresenta na concentração máxima da substância de ensaio. A concentração destes produtos auxiliares não deve exceder 0,1 g/l.

As concentrações escolhidas para o ensaio são preparadas por diluição da solução-mãe. Se se realiza um ensaio com concentrações elevadas, a substância pode ser diluída directamente na água de diluição.

O ensaio deve ser efectuado sem ajustamento do pH. Quando surge uma alteração significativa do pH, é aconselhável repetir o ensaio ajustando o pH e registando tal facto nos resultados. Neste caso, o valor do pH da solução-mãe deve ser ajustado ao valor do pH da água de diluição, a menos que haja razões especiais que se lhe oponham. São preferidos o HCl e NaOH. Este ajustamento deve ser efectuado de modo que a concentração da substância de ensaio na solução-mãe, não seja significativamente alterada. Se o ajustamento provocar uma reacção química ou uma precipitação da substância de ensaio, aquando do ensaio seguinte, essa observação deve ser referida.

1.6.1.2. Águas para a criação e a diluição

Pode utilizar-se a água potável (não contaminada por concentrações perigosas de cloro, metais pesados, ou outras substâncias), a água natural de boa qualidade ou a água reconstituída (ver apêndice 1). Preferem-se as águas cuja dureza total está compreendida entre 50 e 250 mg/l (em $CaCO_3$), com um pH de 6,0 — 8,5.

1.6.2. *Aparelhagem*

A aparelhagem deve ser constituída por material químico inerte:

— sistema de diluição automática (para o ensaio dinâmico),

— dispositivo de medição do oxigénio,

— equipamento para a determinação da dureza da água,

— equipamento próprio para o controlo da temperatura,

— aparelho para medir o pH.

1.6.3. *Peixes submetidos a ensaio*

Utiliza-se uma ou várias espécies, sendo a escolha deixada ao critério do laboratório que efectua o ensaio.

Recomenda-se que a espécie utilizada seja escolhida com base em critérios práticos determinantes, tais como: disponibilidade imediata durante todo o ano, facilidade de manutenção, aptidão para o ensaio, sensibilidade relativa, e um conjunto de factores significativos económicos, biológicos ou ecológicos. O peixe deve estar de boa saúde e isento de malformações aparentes.

São indicadas no apêndice 2, as espécies de peixes recomendadas para o ensaio.

1.6.3.1. Criação

Os peixes submetidos ao ensaio devem provir, de preferência, de um só lote, cujos espécimes tenham o mesmo comprimento e a mesma idade. Devem ser conservados durante pelo menos 12 dias nas seguintes condições:

— recipientes:

São recomendados volumes de 300 l, no mínimo, para os peixes de água fria e de 100 l, no mínimo, para os peixes de água quente;

— carga:

variável segundo o sistema utilizado (recirculação ou dinâmica) e a espécie de peixe;

— água:

ver ponto 1.6.1.2;

— iluminação:

fotoperíodos de 12 a 16 horas por dia;

— concentração em oxigénio dissolvido:

no mínimo 80 % da saturação;

— alimentação:

diária ou 3 vezes por semana, com paragem 24 horas antes do início do ensaio.

1.6.3.2. Mortalidade

Após um período de adaptação de 48 horas, registar as mortalidades. Avaliar a qualidade do lote de acordo com os critérios seguintes:

— mortalidade em 7 dias superior a 10 % da população: rejeição de todo o lote,

— mortalidade em 7 dias compreendida entre 5 e 10 % da população: prolongar o período de observação por outros 7 dias. Se não se verificar qualquer outro caso de mortalidade, o lote é aceitável, caso contrário ele deve ser rejeitado,

— mortalidade em 7 dias inferior a 5 %: aceitação do lote.

1.6.4. *Adaptação*

Os peixes devem ser mantidos durante pelo menos 7 dias, antes da sua utilização, nas condições do ensaio (água e temperatura).

1.6.5. *Técnica*

Antes do ensaio definitivo, pode proceder-se a um ensaio tendo como finalidade determinar o intervalo de concentrações eficazes. Este ensaio fornecerá informações sobre o intervalo de concentrações a utilizar aquando do ensaio definitivo.

Proceder a um ensaio testemunha, quer dizer sem substância de ensaio, utilizando, se for caso disso, o produto auxiliar. Este ensaio testemunha, junta-se à série dos ensaios propriamente ditos.

As concentrações não devem diminuir mais de 20 % durante o período do ensaio. Em função das propriedades físicas e químicas da substância, escolher-se-á o método estático, semi-estático ou dinâmico.

O peixe é exposto à substância de ensaio nas condições seguintes:

— duração:

no mínimo 48 horas, de preferência 96 horas;

— número de organismos:

no mínimo 10 por concentração;

— recipientes:

com capacidade adequada em função da carga recomendada;

— carga biológica:

carga máxima recomendada para o ensaio estático ou semi-estático: 1,0 g/l; para os ensaios dinâmicos, pode ser aceitável uma carga mais elevada;

— concentração do ensaio:

uma testemunha, pelo menos 5 concentrações, diferindo num factor constante que não exceda 1,8 e compreendidas no intervalo de mortalidade de 0 % a 100 %;

— água:

ver ponto 1.6.1.2.;

— iluminação:

fotoperíodos diários, de 12 a 16 horas;

— temperatura:

a conveniente para a espécie escolhida (ver seguidamente), com cerca de ± 1 °C, qualquer que seja o sistema do ensaio;

— concentração em oxigénio dissolvido:

pelo menos 60 % da saturação;

— alimentação:

nenhuma.

Os peixes são examinados nas 2 a 4 primeiras horas e pelo menos com intervalos de 24 horas. São considerados como mortos, se o toque no pedúnculo caudal não produzir qualquer reacção e se não for visível qualquer movimento respiratório. Os peixes mortos são eliminados em cada observação e as mortalidades são registadas.

As anomalias visíveis (por exemplo perda de equilíbrio, alterações na natação, tensão respiratória, pigmentação, etc.) serão registadas.

As medições do pH, do oxigénio dissolvido e da temperatura são efectuadas directamente.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

Indicar, em papel log-probit, as percentagens de mortalidade para cada período de exposição recomendada, em função das concentrações. Unir os pontos obtidos e anotar a concentração correspondente a 50 % da resposta (ver figura no apêndice 3).

Obtém-se assim o valor da CL_{50}, para o período de exposição adequado.

Se os dados são adequados, a concentração letal média (CL_{50}) e os seus limites de confiança ($p = 0,05$) podem ser avaliados utilizando um método clássico.

O valor da CL_{50} deve ser arredondado para um ou no máximo dois algarismos significativos.

Nos casos em que o declive da curva de resposta concentração/percentagem é demasiadamente acentuada para permitir o cálculo da CL_{50}, será suficiente proceder a uma estimativa gráfica deste valor.

Quando duas concentrações consecutivas numa relação de 1,8 derem apenas 0 ou 100 % de mortalidade, estes dois valores são suficientes para indicar o intervalo em que se situa a CL_{50}.

Se se verificar que a estabilidade ou a homogeneidade da substância de ensaio não pode ser mantida, esta observação deve ser mencionada, e interpretar-se-ão os resultados com certa prudência.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

O relatório conterá, se possível:

— informações sobre o organismo submetido ao ensaio (nome científico, estirpe, fornecedor, pré-tratamento eventual, tamanho e número utilizados por cada concentração do ensaio),

— lista das concentrações utilizadas e todas as informações disponíveis sobre a estabilidade da substância de ensaio em soluções com essas concentrações,

— descrição do equipamento de ensaio,

— os métodos utilizados e os resultados obtidos, se se realizarem análises químicas,

— origem da água de diluição e suas principais características (pH, dureza, temperatura),

— eventualmente, as concentrações dos produtos auxiliares,

— no caso das substâncias com baixa solubilidade na água, o método de preparação da solução-mãe e da solução do ensaio,

— razões da escolha e os pormenores do método de ensaio utilizado (por exemplo: duração do ensaio, sistema estático, semi-estático, dinâmico, taxa de renovação, arejamento ou não, carga em peixe, etc.),

— informações sobre a iluminação,

— concentração máxima testada que não provocou mortalidade durante o ensaio,

— concentração mínima testada que causou 100 % de mortalidade durante o ensaio,

— mortalidade cumulativa por cada concentração e para o ensaio testemunha (controlo com a ajuda de produto auxiliar, se necessário) nos tempos de observação recomendados,

— valores da CL_{50} em cada um dos tempos de observação recomendados (com limites de confiança a 95 %, se possível),

— métodos estatísticos utilizados para a determinação dos valores de CL_{50},

— representação gráfica das percentagens de mortalidade em função das concentrações no fim do ensaio,

— declive da curva de resposta concentração/percentagem e os seus limites de confiança de 95 %,

— concentração do oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura das soluções de ensaio, cada 24 horas,

— se uma substância de referência é utilizada, o seu nome e os resultados obtidos,

— prova de que os critérios de qualidade foram respeitados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE, Paris, 1981. *Test Guidelines 203*, Decision of the Council C (81) 30, Final.

Apêndice I

Água reconstituída

Exemplos de água de diluição adequada

Os produtos químicos devem ser de qualidade analítica.

A água deve ser uma água destilada de boa qualidade, ou água desionizada com uma condutividade inferior a 5 μScm^{-1}.

Soluções-padrão

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (cloreto de cálcio diidrato): **11,76 g**

dissolver em água e completar o volume para 1 litro.

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (sulfato de magnésio heptaidrato): **4,93 g**

dissolver em água e completar o volume para 1 litro.

$NaHCO_3$ (hidrogenocarbonato de sódio): **2,59 g**

dissolver em água e completar o volume para 1 litro.

KCl (cloreto de potássio): **0,23 g**

dissolver em água e completar o volume para 1 litro.

Água de diluição reconstituída

Misturar 25 ml de cada uma das quatro soluções-mãe e completar o volume para 1 litro com água.

Arejar até saturação em oxigénio dissolvido.

O pH deve ser de 7,9 ± 0,3.

Se necessário, ajustá-lo com NaOH (hidróxido de sódio) ou HCl (ácido clorídrico).

A água de diluição assim preparada é deixada em repouso cerca de 12 horas e não deve ser arejada posteriormente.

A soma dos iões Ca/Mg nesta solução é igual a 2,5 mmol/l. A relação entre os iões Ca:Mg é de 4:1, e entre os iões Na:K é de 10:1. A alcalinidade total desta solução é igual a 0,8 mmol/l.

Os desvios eventuais na preparação da água de diluição não devem alterar a composição ou as propriedades desta água.

Apêndice 2

Espécies de peixes recomendadas para o ensaio

Espécie recomendada	Intervalo das temperaturas de ensaio recomendado (°C)	Comprimento total récomendado do animal submetido ao ensaio (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Peixe Zebra	20 à 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	20 à 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Carpa comum	20 à 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Killifish	20 à 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulate (Teleostei, Poeciliidae) (Peeters 1859) Gambúsia	20 à 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Linneaus 1758) Bluegill	20 à 24	5,0 ± 2,0
Salmo gairdneri (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Truta arco-íris	13 à 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Bordalo	20 à 24	6,0 ± 2,0

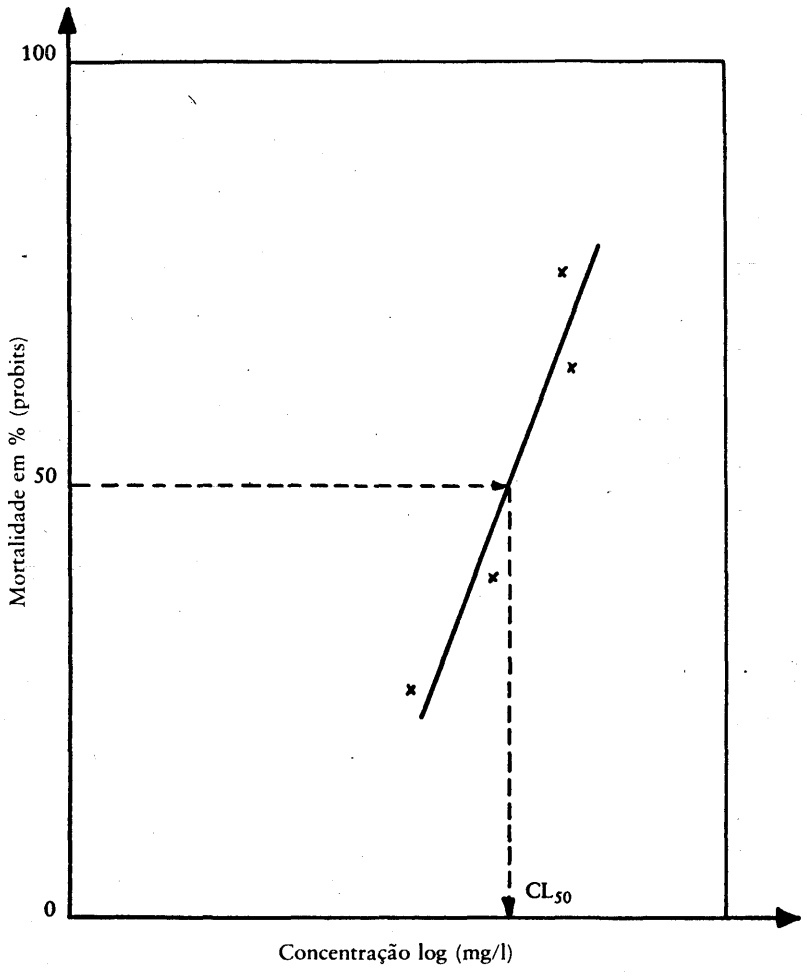
Aprovisionamento

Os peixes acima mencionados são fáceis de criar e/ou largamente disponíveis durante todo o ano. Podem reproduzir-se e desenvolver-se quer em explorações piscícolas, quer em laboratório, em condições sanitárias controladas. O animal submetido a ensaio deve ser são e de origem conhecida. Estes peixes encontram-se disponíveis quase por todo o mundo.

Apêndice 3

Exemplo de curva percentagem da mortalidade/concentração

Exemplo de determinação de CL_{50} em papel log-probit



Apêndice 4

Exemplos de métodos normalizados

(1) OECD, Paris, 1981, test guideline 203. Decision of the Council C (81) 30, Final.
(2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3 — Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method — Document 7346/I, II, III, 1980/06/15ISO/DP.
(3) Eidgenössiches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungs-methoden — Part II 1974.
(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen. 38 412 (L1) und L (15).
(5) AFNOR. Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de Brachydanio rerio. T90-303.
(6) JIS K 0102. Acute toxicity test for fish.
(7) Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment, Volume I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.
(8) Environmental Protection Agency 1975. Methods for the Acute Toxicity Test with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms. Ecological Research Series EPA-660-75-009.
(9) Environmental Protection Agency. January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4-78-012.
(10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, March 16 1979, Part IV.
(11) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th edition 1975 APHA-AWWA-WPCF.
(12) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.
(13) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for Evaluating dose Effects Experiments, J. Pharm. Exp. Therap., Vol. 96, 1949, p. 99.

C.2. TOXICIDADE AGUDA PARA AS DÁFNIAS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

É conveniente ter, na medida do possível, informações sobre a hidrossolubilidade, a pressão de vapor, a estabilidade química, as constantes de dissociação e a biodegradabilidade da substância, antes de ser iniciado o ensaio.

Informações suplementares (por exemplo: fórmula estrutural, pureza em percentagem, natureza e percentagem das impurezas, presença e número de aditivos e o coeficiente de separação em n-octanol/ /água), devem ser tomadas em consideração aquando do planeamento do ensaio e da interpretação dos resultados.

1.2. Definições e unidades

O que é exigido na directiva relativa ao valor de CL_{50} referente à dáfnia, é satisfeito pela determinação de CE_{50}, tal como é descrito no presente método de ensaio.

No presente ensaio, a toxicidade aguda é expressa pela concentração média eficaz (CE_{50}) de imobilização. Isso corresponde à concentração (em valor inicial) que inibe a mobilidade de 50 % das dáfnias de um lote submetido ao ensaio durante um período de 24 horas de exposição. O valor de CE_{50} para 48 horas, pode igualmente ser determinado, se possível. Todas as concentrações das substâncias de ensaio são expressas em peso por volume (mg/l) e igualmente em peso por peso (partes por milhão).

Imobilização:

Os organismos que são incapazes de se deslocar nos 15 segundos que se seguem a uma ligeira agitação do recipiente são considerados como imobilizados.

As concentrações da substância do ensaio são indicadas em peso por peso (partes por milhão).

1.3. Substância de referência

Uma substância de referência pode ser submetida a ensaio para demonstrar que, nas condições de ensaio em laboratório, a sensibilidade da estirpe utilizada para o ensaio não é sensivelmente alterada.

Não é indicada qualquer substância de referência para este ensaio.

1.4. Princípio do método de ensaio

As dáfnias são expostas durante 24 horas à substância de ensaio diluída em água em diferentes concentrações; se necessário, o tempo de exposição pode ser prolongado até 48 horas.

Em condições de ensaio idênticas, para uma gama de concentrações eficazes, concentrações diferentes de substância de ensaio exercem efeitos diferentes sobre a mobilidade das dáfnias. Consequentemente, no final do ensaio a cada concentração corresponde uma percentagem diferente de imobilização das dáfnias.

As concentrações que provocam de 0 a 100 % de imobilização são determinadas directamente pela observação, enquanto que o CE_{50} — 24 horas (tal como o CE_{50} — 48 horas) é determinado se possível por cálculo.

Para este método, utiliza-se um sistema estático, sem renovação das soluções de ensaio, durante o período de exposição.

1.5. Critérios de qualidade

A imobilização das testemunhas não deve exceder 10 % no final do ensaio.

A concentração em oxigénio não deve ser inferior a 2 mg/l no final do ensaio.

As dáfnias submetidas ao ensaio não devem ser arrastadas para a superfície da água, pelo menos no lote testemunha.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Soluções de substância de ensaio

As soluções-mãe, com as concentrações exigidas, são preparadas dissolvendo a substância em água desionizada ou em água que corresponda às condições fixadas no ponto 1.6.1.2.

Para as substâncias com baixa solubilidade na água, as soluções-padrão podem ser preparadas por dispersão ultrassónica ou, se necessário, utilizando solventes orgânicos, emulsionantes ou dispersantes. Se se recorrer a estas substâncias, as dáfnias testemunhas devem ser expostas a uma concentração de produtos auxiliar, igual à presente na concentração máxima da substância de ensaio. A concentração destes produtos auxiliares não deve exceder 0,1 g/l.

As concentrações escolhidas para o ensaio são preparadas por diluição da solução-mãe. Se os ensaios incidirem sobre concentrações elevadas, a substância pode ser dissolvida directamente na água de diluição.

O ensaio deve ser efectuado sem ajustamento do pH. Nos casos de alterações significativas do pH, é conveniente repetir o ensaio ajustando o pH e registando os resultados. Neste caso, o valor do pH da solução-mãe deve ser adaptado ao valor do pH da água de diluição, salvo se houver razões particulares para não agir deste modo. É preferível utilizar para este efeito HCl ou NaOH. Este ajustamento do pH deve ser efectuado de modo a não alterar sensivelmente a concentração da substância de ensaio na solução. Se o ajustamento provocar uma reacção química ou uma precipitação da substância de ensaio, este ensaio não deve prosseguir sem o registo destas observações no relatório.

1.6.1.2. Águas de criação e da diluição

Qualquer água natural ou reconstituída conveniente para a criação das dáfnias (ver apêndice), pode ser utilizada para este ensaio.

A fim de evitar a necessidade de proceder a adaptações antes do ensaio, recomenda-se a utilização de uma água de criação idêntica à utilizada para o ensaio.

1.6.2. *Aparelhagem*

Utiliza-se o material corrente de laboratório. O material destinado a estar em contacto com as soluções de ensaio, deve de preferência ser de vidro:

— aparelho para medição do oxigénio (com microeléctrodo ou qualquer outro equipamento adequado para medição do oxigénio em amostras de pequeno volume),

— aparelho adequado para a medição de temperatura,

— aparelho para a medição do pH,

— aparelho para a medição da dureza da água.

1.6.3. *Organismo submetido ao ensaio*

«*Daphnia magna*» ou «*Daphnia pulex*», com mais de 6 horas de idade e com menos de 24 horas no início do ensaio, criada em laboratório, isenta de doenças e de origem conhecida (criação — pré-tratamentos eventuais, etc).

1.6.4. *Técnica*

Um ensaio preliminar pode preceder o ensaio definitivo, que fornece informações sobre a gama de concentrações a utilizar para o ensaio definitivo. Um ensaio testemunha, realizado com os produtos auxiliares, mas na ausência da substância de ensaio, deve ser efectuado para além das séries de ensaio.

As dáfnias são expostas à substância de ensaio, nas seguintes condições:

— duração:

minímo 24h;

— número de organismos:

pelo menos 20 organismos por concentração do ensaio, repartidos de preferência em 4 lotes de 5 ou em 2 lotes de 10,

— carga biológica:

um mínimo de 2 ml de solução de ensaio deve ser fornecido a cada organismo,

— concentração do ensaio:

a solução do ensaio deve ser preparada imediatamente antes da introdução das dáfnias, de preferência sem utilizar qualquer solvente que não seja a água. Ao mesmo tempo que a testemunha, devem submeter-se aos ensaios concentrações que formem uma série geométrica com relação 1,8, que permitam obter 0 e 100 % de imobilizações após 24 h e uma série de imobilizações intermédias que permitam o cálculo de CE_{50} — 24 horas,

— água:

ver ponto 1.6.1.2.,

— iluminação:

é facultativo um ciclo luz escuridão; a obscuridade completa é aceitável,

— temperatura:

a temperatura de ensaio deve situar-se entre 18 e 22 °C, mas deve, para cada ensaio, ser constante com ± 1,0 °C de variação,

— arejamento:

as soluções do ensaio não devem ser arejadas por agitação,

— alimento:

nenhum.

O pH e a concentração em oxigénio das testemunhas e de todas as concentrações do ensaio devem ser medidos no final do ensaio; o pH das soluções de ensaio não deve ser alterado.

As substâncias voláteis devem ser submetidas ao ensaio em recipientes cheios e hermeticamente fechados, suficientemente grandes para evitar qualquer falta de oxigénio.

As dáfnias são examinadas pelo menos após 24 horas de exposição e de novo após 48 horas, se o ensaio tiver sido prolongado.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

Indicar em papel *log-probit* as percentagens das imobilizações cumulativas em função das concentrações, após uma exposição de pelo menos 24 horas. Unir os pontos obtidos e anotar a concentração correspondente a 50 % de imobilização.

Se os dados forem adequados, a concentração média CE_{50} e os seus limites de confiança ($p = 0,05$) podem ser avaliados utilizando um método clássico.

O valor de CE_{50} deve ser arredondado para um ou, no máximo, dois algarismos significativos.

Nos casos em que o declive da curva de resposta concentração/percentagem é demasiadamente acentuado para que se possa calcular o CE_{50}, é suficiente fazer uma estimativa gráfica deste valor.

Quando duas concentrações, numa relação de 1,8, derem apenas 0 ou 100 % de imobilização, estes dois valores são suficientes para indicar dentro de que limites se situa o CE_{50}.

Se se verificar que a estabilidade ou a homogeneidade da substância de ensaio não pode ser mantida, convirá interpretar os resultados com prudência, e referir o facto no relatório.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

O relatório do ensaio conterá, se possível:

— as informações sobre o organismo submetido ao ensaio (nome científico, espécie, fornecedor ou origem, pré-tratamento eventual, método de criação, incluindo a fonte, natureza, quantidade e frequência da alimentação),

— número de dáfnias utilizadas em cada concentração de ensaio,

— concentrações utilizadas e qualquer informação disponível sobre a estabilidade da substância de ensaio a estas concentrações, na solução do ensaio,

— descrição dos recipientes utilizados: volume da solução contida em cada um deles, número de organismos,

— métodos utilizados e resultados, caso sejam efectuadas análises químicas,

— origem da água de diluição e suas características principais,

— método de preparação das soluções-padrão e das soluções de ensaio,

— concentração de quaisquer produtos auxiliares utilizados (solventes orgânicos, dispersantes, etc.),

— informações sobre a iluminação,

— concentração mais elevada do ensaio, que não provocou qualquer imobilização durante o ensaio,

— concentração mais fraca do ensaio, que provocou 100 % de imobilização durante o ensaio,

— percentagens de imobilizações cumulativas no ensaio testemunha, no ensaio testemunha com o produto auxiliar e em cada concentracção do ensaio, para os períodos de observação recomendados (24h ou 24 e 48 horas),

— valores de CE_{50} por cada período de observação recomendado (com limites de confiança a 95 %, se possível),

— representação gráfica das percentagens de imobilização em função das concentrações no final do ensaio,

— métodos estatísticos utilizados para determinar os valores de CE_{50},

— declive da curva de resposta concentração/percentagem ao fim de 24 horas e seus limites de confiança de 95 %,

— concentração do oxigénio dissolvido, os valores do pH e da temperatura das soluções de ensaio,

— se for utilizada uma substância de referência, o seu nome e os resultados obtidos,

— prova de que os critérios de qualidade foram respeitados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C (81) 30, Final.

(2) ISO Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus *(Cladocera — crustacea)* ISO/6341.

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus *(Cladocera — crustacea)* NFT 90 301.

(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

Apêndice

Água preparada

Exemplo de água de diluição adequada

Os produtos químicos devem ser de qualidade pró-análise.

A água deve ser uma água destilada de boa qualidade, ou água desionizada com uma condutividade inferior a 5v s cm^{-1}.

Soluções-mãe

$CaCL_2.2\ H_2O$ (cloreto de cálcio diidratado): 11,76 g
dissolver e completar o volume para 1 litro, em água.

$MgSO_4.7\ H_2O$ (sulfato de magnésio heptaidratado): 4,93 g
dissolver e completar o volume para 1 litro, em água.

$NaHCO_3$ (hidrogenocarbonato de sódio): 2,59 g
dissolver e completar o volume para 1 litro, em água.

KCl (cloreto de potássio): 0,23 g
dissolver e completar o volume de um litro, em água.

Água de diluição preparada

Misturar 25 ml de cada uma das quatro soluções-mãe e completar o volume para 1 litro, com água.

Arejar até saturação em oxigénio dissolvido.

O ph deve ser de 7,9 ± 0,3. Se nececcário, ajustá-lo com NaOH (hidróxido de sódio) ou HCl (ácido clorídrico).

A água de diluição assim preparada é deixada em repouso cerca de 12 horas e não deve ser arejada posteriormente.

A soma dos iões Ca/Mg nesta solução é igual a 2,5 mmol/l. A relação entre os iões Ca:Mg é de 4:1, e entre os iões Na:K é de 10:1.

A alcalinidade total desta solução é igual a 0,8 mmol/l.

Os desvios eventuais na preparação da água de diluiçao não devem alterar a composição ou as propriedades desta água.

C.3. DEGRADAÇÃO BIÓTICA:

ENSAIO DE SCREENING OCDE ALTERADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo do método é a medição da biodegradabilidade de compostos orgânicos não voláteis e solúveis na água, em meio aquoso, aeróbico e com uma concentração inicial de 5 a 40 mg/l de carbono orgânico dissolvido por litro (COD/l). Se os limites de sensibilidade dos analisadores de carbono orgânico forem melhorados, pode ser vantajoso nomeadamente para os compostos tóxicos, utilizar concentrações mais baixas. Convém determinar o teor em carbono orgânico da substância de ensaio.

O método só é aplicável às substâncias orgânicas na concentração utilizada no ensaio (5 a 40 mg de COD/l):

— são solúveis na água,

— têm uma pressão de vapor que pode ser desprezada,

— não têm efeito inibidor face às bactérias,

— não são objecto de absorção importante nas superfícies de vidro.

É útil conhecer as proporções relativas dos principais elementos constitutivos da substância de ensaio para interpretar os resultados obtidos, nomeadamente se estes forem pouco elevados.

O conhecimento do limiar de toxicidade da substância face aos microrganismos pode ter interesse para interpretar os resultados pouco elevados ou para escolher as concentrações de ensaio adequadas.

1.2. Definições e unidades

A degradação é expressa como a percentagem do desaparecimento do COD em relação ao seu valor inicial.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

D_t = degradação em percentagem do desaparecimento de COD, no tempo t

C_O = concentração inicial em COD do meio de cultura (mg de COD/l)

C_t = concentração em COD do meio de cultura no tempo t (mg de COD/l)

$C_{bl(O)}$ = concentração inicial em COD da testemunha (mg de COD/l)

$C_{bl(t)}$ = concentração em COD da testemunha, no tempo t (mg de COD/l).

1.3. Substâncias de referência

É conveniente utilizar substâncias de referência adequadas para determinar a actividade do inóculo. Para este fim, pode utilizar-se a anilina, o acetato de sódio ou o benzoato de sódio (por exemplo). A degradação destas substâncias deve ser superior ou igual a 70 % em 10 dias, a contar do dia em que a taxa de biodegradação observada é pela primeira vez superior a 10 %. Para que o ensaio seja válido, estes resultados devem ser obtidos no prazo de 28 dias. Caso contrário, deverá ser repetido utilizando um inóculo de origem diferente.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

Dissolve-se num meio mineral (solução de elementos nutritivos minerais, enriquecida com uma solução de oligo-elementos e com uma solução de vitaminas indispensáveis) uma quantidade definida de substância de modo a obter uma concentração correspondente de 5 a 40 mg COD/l. Em seguida, esta solução é inoculada com um pequeno número de microrganismos pertencentes a diferentes estirpes, é arejada de 20 a 25 °C e mantida na obscuridade ou sob luz difusa.

A degradação é seguida pela determinação do COD durante um período de 28 dias.

O método é controlado com a ajuda duma substância de referência.

«Ensaios em branco» não contendo nem substância de ensaio nem substância de referência, serão efectuados paralelamente para determinar as concentrações em COD no meio.

1.5. **Critérios de qualidade**

A reprodutibilidade do método foi estabelecida aquando de ensaios de intercomparação da CEE e da OCDE.

A concentração mais baixa da substância de ensaio para a qual o método é aplicável, é determinada em grande medida pelo limite de detecção da análise do carbono orgânico (0,5 mgC/l, actualmente) e pela sua concentração na solução nutritiva.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Água

É geralmente utilizada como solvente a água desmineralizada ou a água destilada isentas de vestígios de substâncias tóxicas (em particular cobre). Só pode ser utilizada a água desmineralizada por destilação ou por permuta iónica.

A água destilada não deve conter mais de 10 % de carbono orgânico introduzido pela substância de ensaio.

É indispensável uma água de grande pureza para a análise do COD nas concentrações compreeendidas entre 0 e 40 mg/l. As contaminações provêm não somente das impurezas contidas na água, mas também das resinas de permuta iónica e de proliferações microbianas (bactérias ou algas que se desenvolvem sob a acção da luz, etc). Um mesmo lote deve ser utilizado para uma série de ensaios e a água deve ser controlada previamente por análise do COD. Se necessário, pode ser purificada pela radiação UV ou por outros meios.

1.6.1.2. Solução nutritiva

A solução nutritiva contém, por litro, 1 ml de cada uma das soluções a) a f) seguintes em água (1.6.1.1) (as iniciais PA significam «pureza analítica»).

a) KH_2PO_4 (diidrogenofosfato de potássio): PA 8,50 g
K_2HPO_4 (monoidrogenofosfato de potássio): PA 21,75 g
Na_2HPO_4 (monoidrogenofosfato de sódio): PA 33,40 g
NH_4Cl (cloreto de amónio): PA 20,00 g
dissolver e completar até 1 000 ml com água (1.6.1.1.)
O pH deve ter um valor de 7,2;

b) $MgSO_4.7H_2O$ (sulfato de magnésio heptaidratado): PA 22,50 g
dissolver e completar até 1 000 ml com água (1.6.1.1.);

c) $CaCl_2$ (cloreto de cálcio): PA 27,50 g
dissolver e completar até 1 000 ml com água (1.6.1.1.).
Esta solução deve ser preparada exactamente antes do ensaio;

d) $FeCl_3.6H_2O$ [cloreto de ferro (III) hexaidratado]: PA 0,25 g
dissolver e completar até 1 000 ml com água (1.6.1.1.);

e) Solução extemporânea de oligo-elementos
$MnSO_4.4H_2O$ [sulfato de manganésio (II) tetraidratado]
(= 0,23 mg $MnSO_4.H_2O$): PA 39,9 mg
H_3BO_3 (ácido bórico): PA 57,2 mg
$ZnSO_4.7H_2O$ (sulfato de zinco heptaidratado): PA 42,8 mg
(NH_4) Mo_7O_{24} [molibdato de amónio (IV)] = 36,85 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$: PA 34,7 mg
Quelato de ferro = ($FeCl_{33}$ EDTA) PA 100,0 mg
dissolver e completar até 1 000 ml com água (1.6.1.1.)
Esterilização da solução-mãe de oligoelementos a 120 °C, sob 2 atmosferas, durante 20 minutos;

f) Solução de vitaminas
Biotina: PA 0,2 mg
Ácido nicotínico: PA 2,0 mg
Tiamina: PA 1,0 mg
Ácido p-aminobenzóico: PA 1,0 mg
Ácido pantoténico: PA 1,0 mg
Piridoxamina: PA 5,0 mg
Cianocobalamina: PA 2,0 mg
Ácido fólico: PA 5,0 mg
dissolver e completar até 100 ml com água (ponto 1.6.1.1.).
A solução é filtrada por membrana estéril com 0,2 µm. Em vez da solução 1.6.1.2. (f), pode-se utilizar 15 mg de extracto de levedura dissolvido em 100 ml de água (ponto 1.6.1.1.).

1.6.1.3. Substâncias de referência

Anilina (destilado de fresco), acetato de sódio, benzoato de sódio.

1.6.1.4. Solução de cloreto mercúrico

1 % de $HgCl_2$ em água (ponto 1.6.1.1.).

1.6.2. *Aparelhagem*

1.6.2.1. Agitador podendo receber frascos Erlenmeyer de 2 litros, com regulação automática de temperatura ou colocado num recinto a 20-25 °C.

1.6.2.2. Frascos Erlenmeyer de 2 litros com colo estreito. Antes da utilização, estes devem ser cuidadosamente limpos com ácido clorídrico em solução alcoólica, enxaguados e secos para eliminação de todos os resíduos provenientes de ensaios anteriores. Mesmo se forem novos, devem ser limpos da mesma forma para suprimir qualquer risco de contaminação.

1.6.2.3. Dispositivo de filtração por membrana.

1.6.2.4. Membranas filtrantes de 0,2 µm.

1.6.2.5. Analisador de carbono.

1.6.3. *Preparação do inóculo*

Qualquer uma das quatro partes seguintes pode ser utilizada como inóculo desde que a sua validade seja verificada por meio de uma substância de referência (ponto 1.6.1.3).

1.6.3.1. Inóculo à base de efluente secundário

É conveniente a escolha de um efluente secundário de boa qualidade, proveniente de uma estação que trate em particular águas domésticas. Este efluente deve ser mantido em condições aeróbicas no período entre a colheita e a utilização, e é filtrado por filtro grosseiro, eliminando os primeiros 200 ml. O filtrado, convenientemente arejado, deve ser utilizado no próprio dia.

1.6.3.2. Inóculo à base de terra

100 g de terra (fértil, não estéril) são postos em suspensão em 1000 ml de água potável isenta de cloro (as terras com forte teor em argila, areia ou carbono orgânico não podem ser utilizadas). Após agitação, deixar respousar a suspensão durante 30 minutos.

A camada sobrenadante é então filtrada por papel de filtro grosseiro, rejeitando-se os primeiros 200 ml. O filtrado é arejado imediatamente e o arejamento é mantido até à sua utilização; o inóculo deve ser utilizado no dia da recolha.

1.6.3.3. Inóculo à base de água de superfície

Uma amostra de água de superfície é filtrada por papel de filtro grosseiro, rejeitando-se os primeiros 200 ml. O filtrado, convenientemente arejado até à sua utilização, é utilizado no próprio dia da recolha.

1.6.3.4. Inóculo misto

Misturam-se cuidadosamente volumes iguais dos 3 tipos de inóculos definidos anteriormente, de forma a obter o inóculo final.

A validade do inóculo é verificada por meio de uma substância de referência (1.6.1.3).

1.6.4. *Técnica*

As substâncias de ensaio assim como a substância de referência (ponto 1.6.1.3.) são submetidas respectivamente a ensaios em duplicado e a um ensaio em branco. Os ensaios em branco são realizados com inoculação, mas sem adição da substância de ensaio ou de referência.

Prepara-se uma solução-mãe da solução de ensaio em água (ponto 1.6.1.1.). Junta-se à solução nutritiva (ponto 1.6.1.2.) a quantidade desta solução-mãe que permite obter uma concentração de 5 a 40 mg de COD/l. A substância de referência (ponto 1.6.1.3.) deve ser submetida ao ensaio na concentração inicial correspondente a 20 mg COD/l.

Em cada um dos dois recipientes (ponto 1.6.2.2.), deitam-se 900 ml do meio nutritivo assim preparado e inocula-se com 0,5 ml do inóculo (ponto 1.6.3.). Tapam-se os recipientes com uma folha de alumínio (por exemplo) evitando assim perturbar as trocas gasosas entre o recipiente e a atmosfera ambiente (não se pode utilizar algodão por causa da análise do COD). Dispõem-se em seguida os recipientes num agitador mantido a uma temperatura constante de 20 a 25 °C durante o ensaio e ao abrigo da luz. O ar ambiente deve estar isento de poluentes e de substâncias tóxicas (solventes clorados, etc.).

Durante o ensaio de biodegração, as concentrações em COD são objecto de uma dupla determinação no primeiro dia e nos 27º e 28º dias. Devem ser efectuadas três análises suplementares pelo menos (nas proximidades do 7º, 14º e 21º dias), para se seguir a evolução da degradação.

Por cada determinação, retirar somente o volume estritamente necessário. A centrifugação ou a filtração por membrana, que precedem a determinação do carbono, exigem volumes diferentes, segundo os equipamentos. As perdas devido à evaporação do meio de cultura devem ser corrigidas por adição da quantidade de água necessária (ponto 1.6.1.1.).

Antes de cada colheita, o meio deve ser cuidadosamente agitado e as substâncias aderentes às paredes do recipiente devem ser dissolvidas ou postas em suspensão. As amostras filtradas ou centrifugadas devem

ser analisadas no próprio dia; caso contrário, é necessário juntar-lhes 0,05 ml de solução de $HgCl_2$ (ponto 1.6.1.4.) por cada 10 ml do meio ou então conservá-las entre 2 e 4 °C até 24 h, ou abaixo de -18 °C para períodos mais longos.

Se se observa um patamar antes do 28º dia, pode considerar-se o ensaio terminado. Se a degradação começar nitidamente antes do 28º dia sem atingir um patamar é aconselhável prolongar o ensaio por 1 ou 2 semanas.

Todas estas operações exigem muitos cuidados, e os recipientes, pipetas, etc., devem estar limpos (mas não estéreis).

1.6.5. *Determinação* do COD

São convenientes as membranas filtrantes se se provar que não libertam carbono e que não absorvem a substância de ensaio durante a filtração.

Se as amostras são centrifugadas, deve efectuar-se esta operação a 40.000 ms^{-2} (cerca de 4.000 g, por 15 minutos) de preferência numa centrifugadora refrigerada, em qualquer caso a menos de 40 °C.

Nota

Parece não ser satisfatória a diferenciação COT: COD por centrifugação em concentrações muito fracas, quer porque não são eliminadas todas as bactérias, quer porque o carbono que faz parte integrante do plasma bacteriano é redissolvido. Em concentrações mais altas ($\geqslant$ 10 mg/l), o erro de centrifugação parece comparativamente fraco para uma inoculação idêntica.

A amostra colhida (cerca de 30 ml) é imediatamente centrifugada ou filtrada por membrana por meio dum dispositivo de filtração (ponto 1.6.2.3.), utilizando membranas filtrantes tratadas como indicado no ponto 1.6.2.4. São desprezados os primeiros 20 ml.

A concentração em COD do filtrado restante (cerca de 10 ml) é determinada duas vezes, com o analisador de carbono (ponto 1.6.2.5.). Se o filtrado não puder ser analisado no próprio dia, deve ser então conservado como indicado no ponto 1.6.4.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

Os resultados das determinações são transcritos seguindo o modelo junto (apêndice 1) e os valores da biodegradação são calculados de acordo com 1.2.

As concentrações em COD são arredondadas ao décimo de miligrama por litro mais próximo e os valores médios do D_t à percentagem mais próxima.

O desenrolar do ensaio de degradação é representado graficamente num diagrama, como é indicado no modelo junto (apêndice 2).

Os resultados do ensaio de degradação são válidos, se na mesma série de ensaios a substância de referência mostrar uma percentagem de eliminação em COD $\geqslant$ 70 % em 10 dias, a contar do dia em que a taxa de biodegradação observada ultrapassar pela primeira vez 10 %. Este resultado deve ser obtido num prazo de 28 dias, ou seja a duração do ensaio, caso contrário toda a série é eliminada.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio conterá, se possível:

— os dados fornecidos (apêndice 1),

— o desenrolar do ensaio de degradação é representado num diagrama que indica a fase de latência, a fase de degradação, o declive da curva, o intervalo de tempo (o « intervalo de tempo » significa aqui um período de 10 dias iniciado no dia em que o nível de biodegradação observado excede pela primeira vez 10 %),

— as provas de validade do ensaio (diminuição em COD da substância de referência $\geqslant$ a 70 % em 10 dias, a contar do dia em que a degradação excede 10 %, devendo este resultado ser obtido no prazo de 28 dias, ou seja, a duração do ensaio).

3.2. **Interpretação dos resultados**

Sendo este teste muito rigoroso, um resultado pouco elevado não significa necessariamente que a substância submetida ao ensaio não é biodegradável nas condições ambientais, mas que serão necessários trabalhos complementares para estabelecer este facto.

As substâncias submetidas a ensaio para as quais foi obtida uma taxa de biodegradação elevada durante este ensaio serão consideradas como facilmente biodegradáveis, caso esta taxa seja atingida em 10 dias a contar do dia em que execeda pela primeira vez 10 %.

4. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301E. Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45-55

Apêndice 1

Degradação biótica: teste de screening OCDE alterado

Organismo responsável pelo ensaio: .....

Substância de ensaio: .....

Experiência nº: .....

Dados relativos ao ensaio

Concentração teórica: ..... mg/l COD

Determiações do carbono

	Frasco nº		Concentração de COD após × dias (mg/l)							
			0 (C_0)							
Ensaio: Solução nutritiva mineral com substância a ensaiar e com inoculação	1	a_1								
		a_2								
		$C_{at} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b_1								
		b_2								
		$C_{bt} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
Testemunha: Solução nutritiva mineral sem substância a ensaiar mas com inoculação	3	bl_1								
		bl_2								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Avaliação dos dados brutos

Frasco nº	Calculos dos resultados	% de perda de COD após × dias							
		0							
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{at} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0							
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{bt} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0							
Média (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) Não será estabelecida uma média entre D_1 e D_2 em caso de desvio importante.

Degradação biótica: teste de screening OCDE alterado (Boletim)

Organismo responsável pelo ensaio: .....

Director do estudo: .....

Data do início do ensaio: ..... Experiência nº .....

Substância do ensaio: .....

Estrutura química: .....

Solução-mãe:

	mg/l	mg/l COT (*)	mg/l COD (**)
Concentração da substância a testar			

(*) Um desvio entre os valores COD et COT indica uma solubilidade insuficiente da substância a ensaiar.

(**) Todos os valores COD são determinados após filtração por membrana ou centrifugação.

Analisador de carbono: .....

Inóculo: .....

Resultado do teste:

D_T = ... % de perda de COD após ..... dias.

Validação do resultado: .....

Substância de referência: .....

Resultado: ..... % da perda de COD após ..... dias.

Experiência de referência nº .....

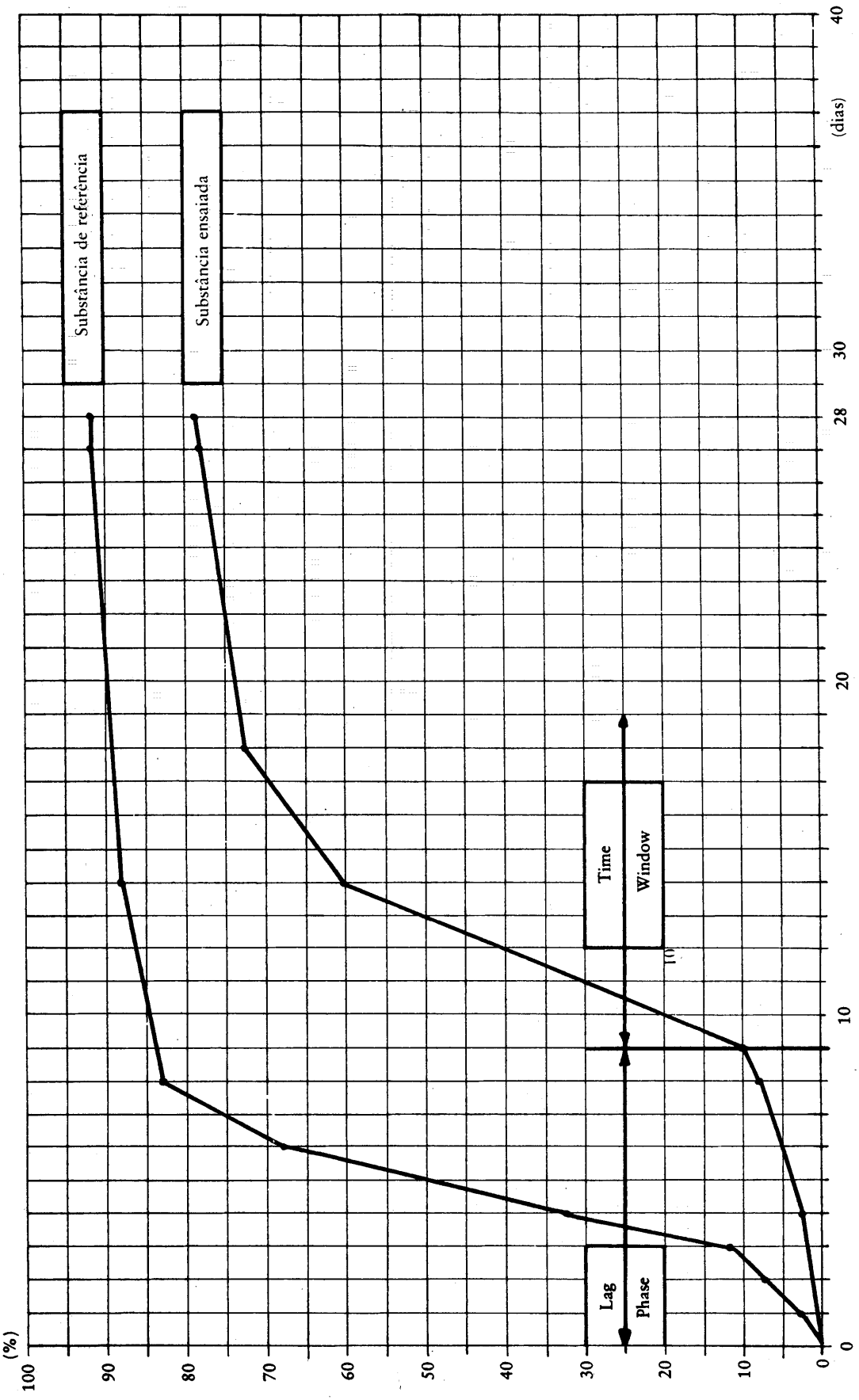
Notas:

....
(Data) (Assinatura)

Apêndice 2

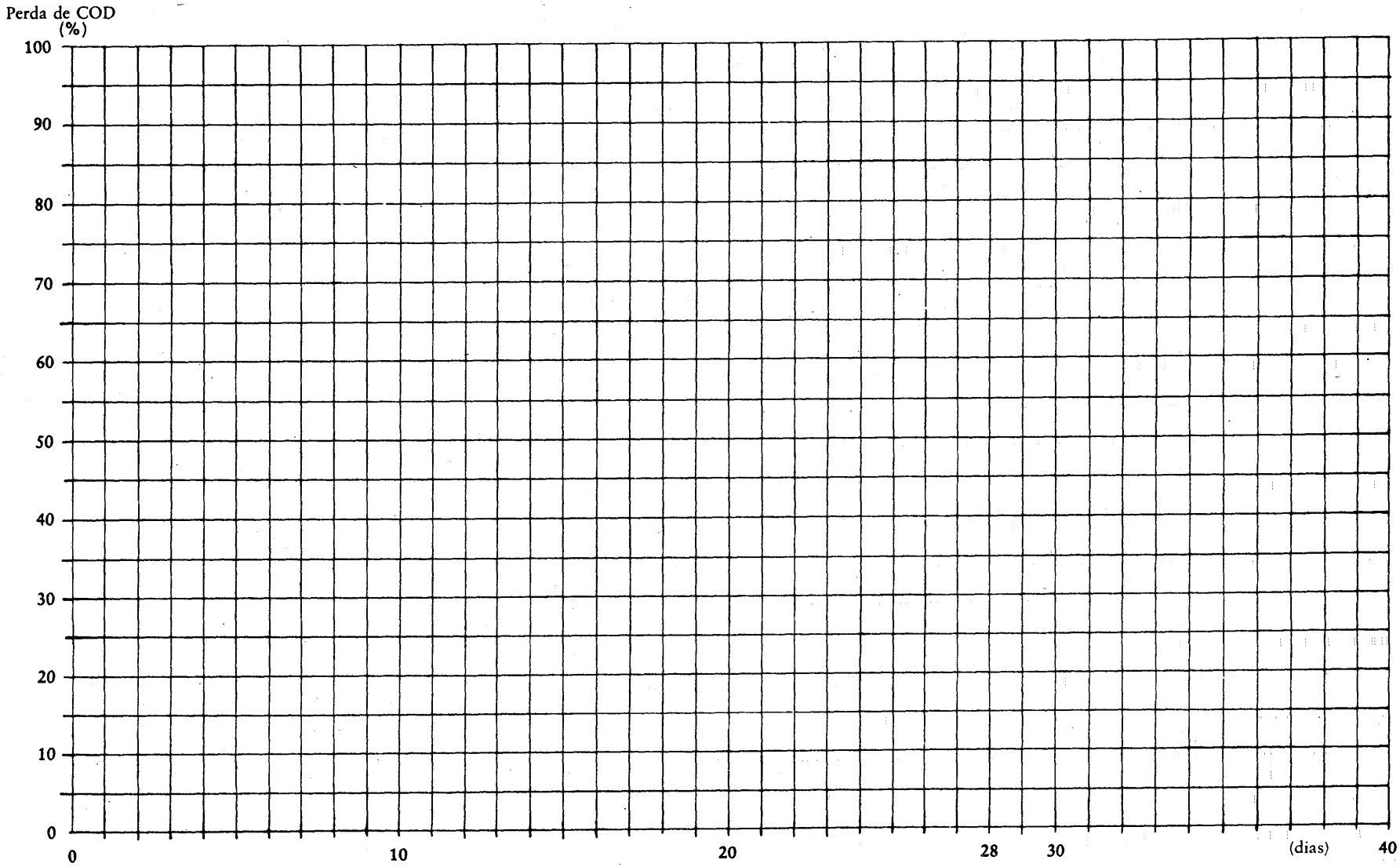
Teste de screening OCDE alterado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



Teste de screening OCDE alterado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



C.4. DEGRADAÇÃO

DEGRADAÇÃO BIÓTICA: ENSAIO AFNOR NF T 90/302 ALTERADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo do método é a medição da biodegrabilidade de compostos orgânicos não voláteis e solúveis na água, em meio aquoso aeróbico e com uma concentração de ensaio inicial correspondente a 40 mg de carbono orgânico dissolvido (COD) por litro. Se os limites de sensibilidade dos analisadores de carbono orgânico forem melhorados, pode ser vantajoso, nomeadamente para os compostos tóxicos, utilizar concentrações mais baixas.

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

O método só é aplicável às substâncias orgânicas, na concentração utilizada no ensaio (40 mg COD/l):

— são solúveis na água,

— têm uma pressão de vapor que pode ser desprezada,

— não têm efeitos inibidores face às bactérias,

— não são objecto de absorção importante nas superfícies de vidro.

É útil conhecer as proporções relativas dos principais elementos constitutivos da substância de ensaio, para interpretar os resultados obtidos, nomeadamente se estes forem pouco elevados.

As informações sobre o toxicidade da substância química face aos microrganismos podem ser vitais para a interpretação de resultados pouco elevados.

1.2. Definição e unidades

A degradação é expressa como a percentagem do desaparecimento do COD, em relação ao seu valor inicial:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

em que,

D_t = degradação em percentagem do desaparecimento de COD, no tempo T
C_o = concentração inicial em COD do meio de cultura (mg COD/l)
C_t = concentração em COD do meio de cultura no tempo T (mg COD/l).
$C_{bl(o)}$ = concentração inicial em COD da testemunha (mg COD/l)
$C_{bl(t)}$ = concentração em COD da testemunha, no tempo t (mg COD/l)

1.3. Substâncias de referência

É conveniente verificar o inóculo com a ajuda de substâncias químicas de referência adequadas.

Para este fim pode utilizar-se a anilina, o acetato de sódio ou o benzoato de sódio (por exemplo), que devem apresentar uma eliminação do teor em COD igual ou superior a 70 % em 28 dias; caso tal não se verifique, o ensaio é considerado nulo e deve ser recomeçado, usando um inóculo proveniente de outra origem.

Neste método de ensaio específico, é utilizada a glucose, nomeadamente para o ensaio de inibição e para avaliar a actividade do inóculo, o que pode também ser feito com a anilina, o acetato de sódio e o benzoato de sódio.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

As substâncias orgânicas dissolvidas na água são biodegradadas pelos microrganismos químico-organotropos, que as utilizam como únicas fontes de carbono e de energia. Estas substâncias são estudadas a uma concentração tal que o teor inicial em carbono orgânico seja igual a 40 mg/l. O carbono orgânico restante em solução é medido pelo menos após 3, 7, 14 e 28 dias. Simultaneamente, são estudados os efeitos eventuais da substância de ensaio face ao inóculo. O processo é controlado por meio de uma substância de referência.

1.5. **Critérios de qualidade**

A reprodutibilidade deste método foi estabelecida aquando de ensaios de intercomparação dos métodos CEE e OCDE.

A concentração mais baixa da substância de ensaio para a qual o método é aplicável, depende em larga medida do limite de sensibilidade da dosagem do carbono orgânico que é, actualmente de 0,5 mg de C por litro e da concentração de carbono orgânico dissolvido na solução nutritiva.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Reagentes*

Os produtos químicos devem ter uma pureza analítica reconhecida.

1.6.1.1. Água destilada

A água destilada não deve conter mais de 10 % do carbono orgânico introduzido pela substância de ensaio.

1.6.1.2. Solução nutritiva

Preparar o meio para o teste, como se indica a seguir e utilizando material estéril. Para 1 l de solução, dissolver na água destilada, o seguinte (PA = pureza analítica):

$(NH_4)_2\ SO_4$ (sulfato de amónio):	PA 0,300 g
$NH_4\ N0_3$ (nitrato de amónio):	PA 0,150 g
$KH_2\ PO_4$ (diidrogenofosfato de potássio):	PA 0,300 g
$Na_2\ HPO_4.12H_2O$ (monoidrogenofosfato de sódio, dodecaidratado):	PA 2,000 g
$MgSO_4.7H_2O$ (sulfato de magnésio, heptaidratado):	PA 0,050 g
$CaCl_2.2H_2O$ (cloreto de cálcio, diidratado):	PA 0,050 g
Extracto de levedura:	PA 0,005 g

O pH é de 7,5 ± 0,1.

Adicionar 1 ml da solução de oligoelementos com a composição seguinte:

$FeSO_4.7H_2O$ [sulfato de ferro(II), heptaidratado]:	PA 0,100 g
$MnSO_4.H_2O$ [sulfato de magnanésio (II), monoidratado]:	PA 0,100 g
K_2MoO_4 (molibdato de potássio):	PA 0,025 g
$Na_2B_4O_7.10H_2O$ (tetraborato de sódio, decaidratado):	PA 0,025 g

$CuCl_2.2H_2O$ [cloreto de cobre (II), diidratado]: PA 0,025 g
$Co(NO_3)_2.6H_20$ [nitrato de cobalto (II), hexaidratado]: PA 0,025 g
$ZnCl_2$ (cloreto de zinco): PA 0,025 g
NH_4VO_3 (vanadato de amónio): PA 0,010 g

Água destilada: 100 ml.

(Esta solução de oligoelementos pode ser conservada durante um mês a uma temperatura compreendida entre +1 e +4°C.)

Perfazer o volume (1 l) e homogenizar. O meio deve ser utilizado no prazo de 12 h.

1.6.1.3. Substâncias de referência

Anilina (recentemente destilada), acetato de sódio, benzoato de sódio e glucose.

1.6.2. *Aparelhagem*

Material corrente de laboratório e:

— aparelho para medida do carbono orgânico,

— espectrofotómetro,

— centrifugadora (4.000 g),

— dispositivo de agitação que permita arejamento e agitação,

— equipamento para medir o oxigénio dissolvido e o pH, frascos cónicos de 500 ml de boca larga, estéreis, equipamento para filtração estéril, (membrana com porosidade de 0,22 μm).

O material de vidro deve ser cuidadosamente lavado e estar totalmente isento de vestígios de matérias orgânicas ou tóxicas.

1.6.3. *Preparação do inóculo*

Retirar um volume suficiente de uma mistura de três amostras de águas de superfície poluídas e de efluentes de saída de estações de depuração urbanas, isentas de poluição específica importante. O teor em bactérias de cada amostra deve ser de pelo menos 10^5 bactérias/ml.

As amostras devem ser utilizadas para inoculações num prazo de 12 h, incluindo o transporte, e não devem ficar mais de 6 horas sem arejamento.

Filtrar sobre papel, para eliminar as partículas insolúveis mais grossas, recolher o filtrado e passá-lo por membrana com porosidade de 0,22 micrómetros.

Lavar com uma solução isotónica adequada. Transferir as bactérias que ficaram depositadas na membrana para um pequeno volume de qualquer solução isotónica. Misturar bem. Medir a absorção a 620 nm e daí deduzir a concentração das bactérias por referência a uma curva-padrão, estabelecida previamente por contagem em meio sólido, utilizando a estirpe *Pseudomonas fluorescens* ATCC 15433. Juntar o volume de solução necessária para estabelecer de novo uma concentração em bactérias de (5 ± 3) x 10^7/ml. Utilizar o inóculo na hora seguinte.

1.6.4. *Ensaio*

A incubação deve ser efectuada na ausência de qualquer luz intensa, numa incubadora mantida a uma temperatura de 20 a 25° C e isenta de vapores tóxicos.

Preparar as soluções seguintes:

1. Solução da substância de ensaio no meio de prova de forma a obter uma concentração em carbono orgânico de 40 mg/l.

2. Solução de glucose no meio de prova de forma a obter uma concentração em carbono orgânico de 40 mg/l.

3. Solução contendo no meio de prova as concentrações em substância de ensaio e em glucose, utilizadas.

4. Dispor igualmente dum volume suficiente do meio de prova.

Misturar separadamente as quatro soluções e esterilizar por filtração por membrana.

As membranas filtrantes são adequadas se não libertarem carbono nem absorverem a substância durante a filtração.

Todas as manipulações necessárias devem ser efectuadas em condições estéreis. Repartir as soluções pelos frascos de ensaio (previamente esterilizados), de acordo com o seguinte esquema:

Frasco nº 1 (ensaio):	150 ml de solução 1
Frasco nº 2 (ensaio):	150 ml de solução 1
Frasco nº 3 (ensaio):	150 ml de solução 1
Frasco nº 4 (testemunha-estéril):	150 ml de solução 1
Frasco nº 5 (testemunha de glucose):	150 ml de solução 2
Frasco nº 6 (testemunha de acção inibidora):	150 ml de solução 3
Frasco nº 7 (em branco)	150 ml de solução 4.

Inocular os frascos 1, 2, 3, 5, 6 e 7 com 1,5 ml de inóculo e misturar bem, por agitação manual.

Colher 3 a 5 ml de cada frasco.

Centrifugar as colheitas a 4 000 g durante 15 minutos, mantendo uma temperatura inferior a 26°C.

Recolher os sobrenadantes para as dosagens de carbono orgânico correspondentes ao tempo zero.

Colocar os frascos no agitador, deixando-os aí durante todo o ensaio: ao 3º dia, a concentração em oxigénio dissolvido deve ser pelo menos igual a 5 mg/l no frasco nº 5.

Do mesmo modo que para as dosagens de carbono orgânico no tempo zero, efectuar as mesmas dosagens para os frascos 1, 2, 3, 5, 6 e 7 após um período mínimo de 3, 7, 14 e 28 dias de incubação. No entanto, se o abaixamento do teor em carbono atingir 95 % do teor inicial nos frascos 1, 2 e 3, considerar o ensaio terminado.

O ensaio pode ser terminado antes do 28º dia, se se atingir um patamar antes desta data.

Se se manifesta uma degradação no 28º dia, sem no entanto atingir o patamar, então é conveniente prolongar o ensaio por mais 1 ou 2 semanas.

No final do ensaio, fazer uma dosagem do carbono orgânico no frasco nº 4, da mesma forma que no tempo zero e testar a esterilidade, por inoculação num tubo com um meio de cultura líquido e incubando-o a 25°C durante 5 dias.

Meio de cultura:

— extracto de levedura desidratada:	3 g
— peptona pancreática de caseína:	6 g
— água:	1 000 ml.

Dissolver os componentes do meio de cultura completamente desidratado em água fervente. Se necessário, ajustar o pH de modo a atingir, após esterilização, 7,2 ± 0,2 a 20°C.

Quando as dosagens do carbono orgânico são diferidas no tempo, conservar os sobrenadantes a 4° C, na obscuridade, em frascos de vidro hermeticamente fechados; a duração máxima de conservação aceitável

é de 24 h. Quando a análise não pode ser efectuada no espaço de 24 h, então congelar a uma temperatura inferior a − 18°C.

Para compensar as perdas de água devidas à evaporação, verificar antes de cada colheita de amostra, o volume do meio no frasco e adicionar, se necessário, água destilada esterilizada por filtração em membrana com porosidade de 0,22 micrómetros, para levar o volume ao seu valor medido após a colheita anterior.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

Os resultados das análises são transcritos segundo o modelo junto (apêndice 1) e os valores da biodegradação são calculados de acordo com 1.2.

Os resultados do ensaio de biodegradação são válidos, quando são preenchidas as seguintes condições:.

— a taxa de degradação da glucose no frasco nº 5 deve ser inferior a 80 % no 7º dia,

— no final do ensaio, o frasco nº 4 deve permanecer estéril,

— a concentração em oxigénio dissolvido no 3º dia no frasco nº 5 deve ser de pelo menos 5 mg/l.

No 7º dia a taxa de biodegradação da glucose no frasco nº 6 deve ser no mínimo igual a 75 % do valor observado no frasco nº 5. Se este limite não for atingido, pode supor-se que a substância submetida a ensaio apresenta um efeito inibidor face às bactérias presentes e que portanto o método não lhe é aplicável na concentração fixada.

Notas

A comparação das percentagens de eliminação do carbono nos frascos 1, 2 e 3 por um lado, e no frasco nº 4, por outro, permite diferenciar as causas da degradação observada:

— fenómenos físico-químicos no frasco nº 4,

— fenómenos físico-químicos e biológicos nos frascos 1, 2 e 3.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio conterá, se possível, uma transcrição de todos os resultados das experiências realizadas com a substância de ensaio, com a substância de referência e nos ensaios em branco.

Mencionará nomeadamente os seguintes pontos:

— taxa de desaparecimento do produto no frasco nº 4, no final do ensaio,

— fenómenos de inibição eventualmente observados,

— provas da validade do ensaio,

— o desenrolar do ensaio de degradação é representado num diagrama que indica a fase de latência, a fase de degradação, o declive da curva e o intervalo de tempo (o « intervalo de tempo » significa aqui um periodo de 10 dias com início no dia em que o nível de biodegradabilidade observado exceder pela primeira vez 10 %).

3.2. Interpretação dos resultados

Devido ao carácter rigoroso deste ensaio, um resultado pouco elevado não significa necessariamente que a substância submetida ao ensaio não seja biodegradável nas condições ambientais; indica simplesmente que serão necessários outros estudos para o provar. As substâncias químicas de ensaio para as quais se obtém uma perda importante de COD durante este ensaio, devem ser consideradas como facilmente biodegradáveis, quando esta perda seja atingida em 10 dias a contar do dia em que o nível de biodegradação observado exceder pela 1ª vez 10 %.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OECD, Paris, 1981, Test guideline 301A. Decision of the Council C(81) 30, Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, Nº 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fischer W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, Nº 1, 1981, p. 45-55.

(4) AFNOR: Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called « total » of organic products. T 90-302.

Apêndice 1

Ensaio AFNOR alterado NF T 90/302 (Boletim)

Experiência nº: .....

Data do início do ensaio: .....

Substância de ensaio de referência: .....

Conclusão teórica do ensaio: .....

Doseamento do carbono: .....

Doseamento do carbono

Meio de cultura	Frasco nº	Concentração de COD após x dias en mg/l				
		t = 0	3	7	14	28 dias
Ensaio	1	1_{C_0}	1_{C_3}	1_{C_7}	$1_{C_{14}}$	$1_{C_{28}}$
Ensaio	2	2_{C_0}	2_{C_3}	2_{C_7}	$2_{C_{14}}$	$2_{C_{28}}$
Ensaio	3	3_{C_0}	3_{C_3}	3_{C_7}	$3_{C_{14}}$	$3_{C_{28}}$
Média	1 — 3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Testemunha estéril	4	4_{C_0}				$4_{C_{28}}$
Testemunha glucose	5	5_{C_0}	5_{C_3}	5_{C_7}	$5_{C_{14}}$	$5_{C_{28}}$
Testemunha inibidora	6	6_{C_0}	6_{C_3}	6_{C_7}	$6_{C_{14}}$	$6_{C_{28}}$
Testemunha inóculo	7	$C_{bl(0)}$	$C_{bl(3)}$	$C_{bl(7)}$	$C_{bl(14)}$	$C_{bl(28)}$

Cálculo

	t = 0	3	7	24	28 dias
Ensaio $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Testemunha glucose $\left[1 - \frac{5C_t - C_{bl(t)}}{5C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Testemunha inibidora $\left[1 - \frac{6C_t - C_{bl(t)}}{6C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				

Validade:

— oxigénio dissolvido, frasco nº 5, terceiro dia: .....mg/l;

— percentagem de biodegradação, frasco nº 5, sétimo dia: .....%;

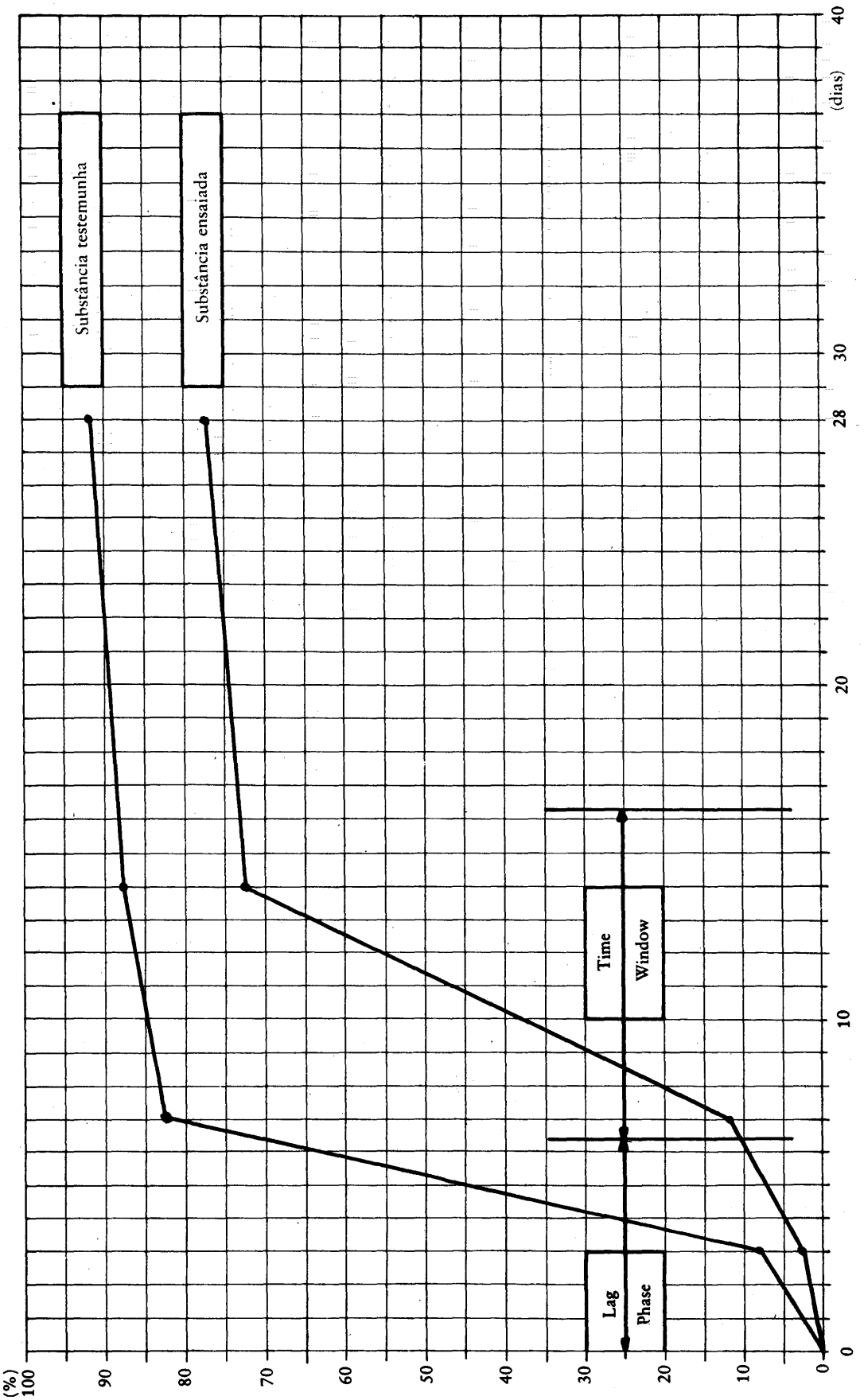
— percentagem de biodegradação, frasco nº 6, sétimo dia: .....%;

— esterilidade, frasco nº 4: .....

Apêndice 2

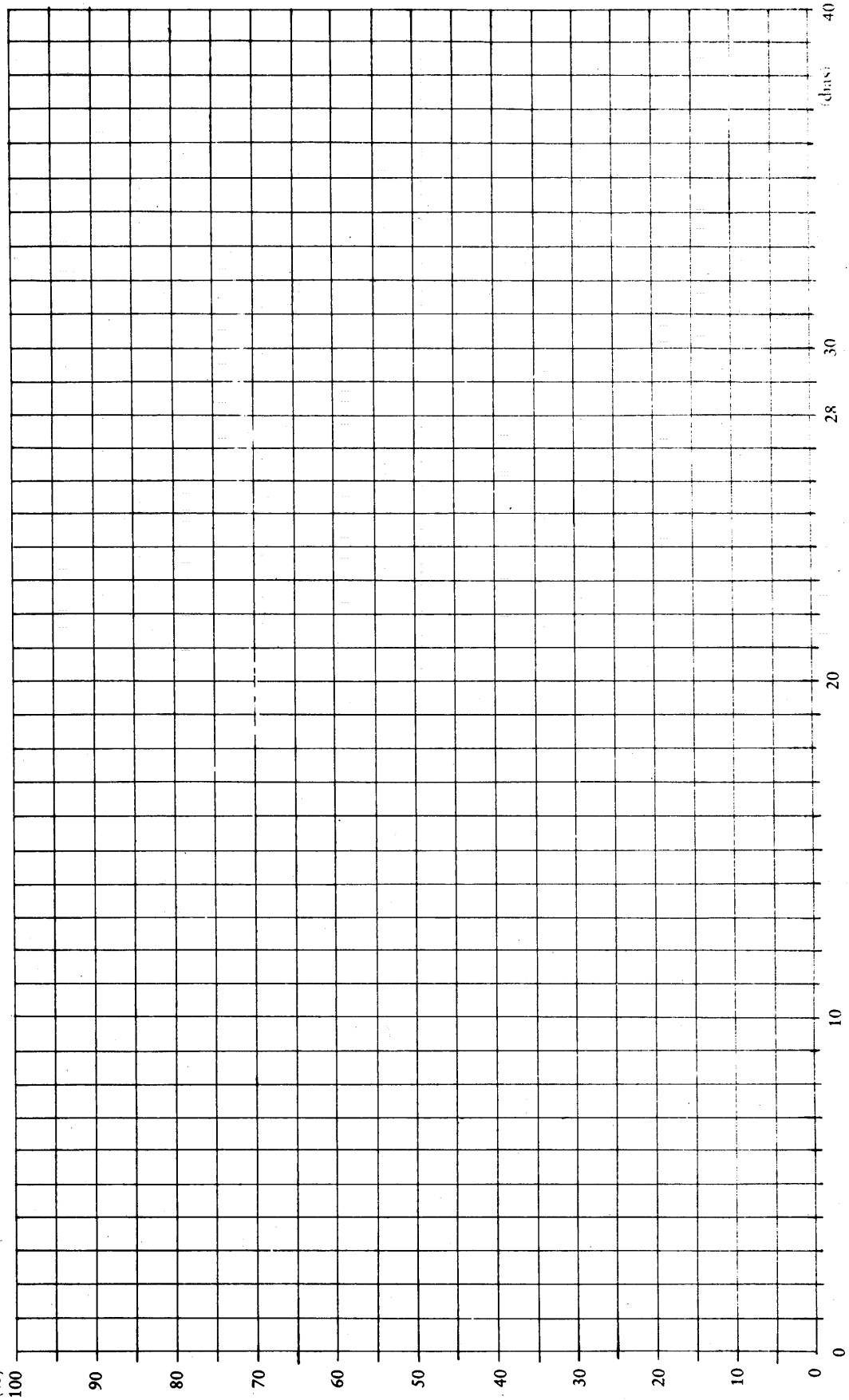
Ensaio AFNOR NF T 90/302 alterado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



Ensaio AFNOR NF T 90/302 alterado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



C.5. DEGRADAÇÃO BIÓTICA: ENSAIO STURM ALTERADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo do método é a medição da biodegradabilidade de substâncias orgânicas não voláteis em meio aquoso, aeróbico, para duas concentrações iniciais de 10 e 20 mg/l (concentrações base).

O teor em carbono orgânico do produto a examinar deve ser conhecido (análise do teor em carbono orgânico total ou sua estimativa através da fórmula empírica que permita o cálculo da produção teórica de CO_2).

O método só é aplicável às substâncias orgânicas que, para a concentração utilizada no ensaio:

— têm uma pressão de vapor que se pode desprezar.

— não exercem acção inibidora face às bactérias.

O método pode, pelo menos em princípio, ser aplicado às substâncias pouco solúveis nas concentrações do ensaio.

As informações sobre as proporções relativas dos principais componentes do material a ensaiar serão úteis para a interpretação dos resultados obtidos, em particular quando esses resultados são baixos.

As informações relativas à toxicidade da substância química face aos microrganismos podem ser úteis para a interpretação dos resultados baixos e para a escolha das concentrações adequadas.

1.2. Definição e unidades

A degradação é definida a partir da quantidade de CO_2 produzido pela substância, expressa em percentagem do valor teórico de CO_2 que ela deve ter produzido (« $ThCO_2$ »), valor calculado com base no teor em carbono orgânico da substância a examinar.

1.3. Substâncias de referência

Recomenda-se a utilização de uma substância de referência adequada para verificação da actividade do inóculo. Com esta finalidade pode utilizar-se, por exemplo, a anilina, o acetato de sódio ou o benzoato de sódio, que devem apresentar uma produção de $CO_2 \geqslant 60\%$ nos 28 dias, caso contrário, o resultado não deve ser considerado válido e o ensaio deve ser repetido com um inóculo proveniente de uma origem diferente.

1.4. Principio do método de ensaio

A substância de ensaio é adicionada a um meio líquido definido e inoculado com microrganismos contidos na água dos esgotos e arejada a 20-25°C. A temperatura é registada durante o período de ensaio.

O CO_2 libertado é captado sob a forma de $BaCO_3$ e a degradação é seguida pela análise do CO_2 durante um período de 28 dias. Tendo em conta os resultados dos ensaios testemunhas, a quantidade total de

CO_2 produzido pela substância de ensaio é determinada para o período do ensaio e expressa em percentagem em relação ao CO_2 total que a substância examinada teria produzido teoricamente, de acordo com o seu teor em carbono.

O processo é controlado por meio dum inóculo testemunha (ponto 1.6.1.3,).

1.5. **Critérios de qualidade**

A reprodutibilidade do método foi estabelecida aquando de um ensaio de intercomparação da CEE e da OCDE.

A produção endógena de CO_2 por inóculo, medida num frasco testemunha, constitui a razão principal pela qual a substância de ensaio a utilizar não deve ter uma concentração inferior a 5 mg/l. (Quando o ensaio é adaptado para a utilização de substâncias de referência marcadas com 14_C então a concentração pode ser claramente mais baixa).

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Água de « alta qualidade »

Água bidestilada, isenta de substâncias tóxicas (em particular de cobre), de fraco teor em carbono (< 2,0 mg/1 COT) e com uma resistividade ⩾ 18 megahoms/centímetro. A água destilada não deve conter mais de 10 % de carbono orgânico proveniente da substância de ensaio.

1.6.1.2. Solução nutritiva

a) Solução-mãe

$FeCl_3.6H_2O$ [cloreto de ferro (III), hexaidratado]: dissolver em 1000 ml de água (ponto 1.6.1.1).	0,25 g
$MgSO_47H_2O$ (sulfato de magnésio, heptaidratado): dissolver em 1000 ml de água (ponto 1.6.1.1).	22,50 g
$CaCl_2$ (cloreto de cálcio):	27,50 g
KH_2PO_4 (diidrogenofosfato de potássio): dissolver em 1000 ml de água (1.6.1.1).	8,50 g
K_2HPO_4 (monoidrogenofosfato de potássio):	21,75 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$ (monoidrogenofosfato de sódio, diidratado):	33,40 g
NH_4Cl (cloreto de amónio): dissolver em 1000 ml de água (ponto 1.6.1.1).	1,70 g
$(NH_4)_2SO_4$ (sulfato de amónio): dissolver em 1000 ml de água (ponto 1.6.1.1.);	40,00 g

b) Meio de ensaio

O meio de ensaio conterá, por litro, as quantidades das soluções seguintes:

— 4 ml de solução de cloreto férrico,
— 1 ml de solução de sulfato de magnésio,
— 1 ml de solução de cloreto de cálcio,
— 2 ml de solução de fosfato,
— 1 ml de solução de sulfato de amónio.

O valor do pH deve ser de 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Substâncias de referência

Anilina (recentemente destilada), acetato de sódio, benzoato de sódio.

1.6.1.4. Hidróxido de bário 0,025 N (0,0125 M)

Dissolver 4 gramas de $Ba(OH)_2.8H_2O$ por litro de água de alta qualidade. Filtrar por filtro de papel e selar a solução límpida para evitar absorção de CO_2 contido no ar. Aconselha-se a preparação de uma quantidade de solução superior a 5 litros para esta série de ensaios.

1.6.2. *Aparelhagem*

1.6.2.1. Aparelho de lavagem do CO_2

Para uma série de 12 frascos de ensaio (3 substâncias de ensaio) são necessários: (O frasco de ensaio é um recipiente de vidro escuro de capacidade de 4 a 5 litros. Nos casos de utilização de material de vidro não escuro, o ensaio deve ser realizado às escuras).

— 4 recipientes de matéria plástica, com capacidade de 1 litro, cheios com 700 ml de NaOH 10 N (10M),

— 1 frasco Erlenmeyer, com capacidade de 1 litro, cheio com 700 ml solução $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M);

— 1 frasco Erlenmeyer de 1 litro destinado a receber, eventualmente, o líquido excedente.

Estes recipientes são ligados em série, por meio de um tubo inerte, a uma fonte de ar comprimido e o ar é injectado nas soluções com um débito constante.

Para cada série de 4 frascos de ensaios suplementares, juntar um frasco em plástico com a capacidade de 1 litro, cheio com 700 ml de NaOH 10 N (10 M).

1.6.2.2. Aparelhagem de produção de CO_2

— 4 frascos de ensaio em vidro escuro, com uma capacidade de 4 a 5 litros, para cada substância de ensaio.

— rolhas e tubos flexíveis, em material plástico.

1.6.2.3. Frascos para absorver o CO_2

Frascos lavadores de 100 ml, contendo hidróxido de bário

1.6.3. *Preparação do inóculo*

Os organismos a utilizar nos ensaios provém de lamas activadas, colhidas recentemente numa estação de depuração municipal, que funcione normalmente. Esta estação não deve tratar efluentes industriais, ou tratá-los sòmente em pequena quantidade.

Desde a sua chegada ao laboratório, a lama activada é arejada durante 4 horas. São retirados 500 ml desta mistura e esta amostra é homogeneizada mecanicamente durante 2 minutos. A mistura é então deixada decantar durante 30 minutos.

Se o líquido sobrenadante contiver ainda uma quantidade importante de particulas sólidas após 30 minutos, pode prosseguir-se a decantação por mais 30 a 60 minutos, ou adaptar a lama às condições do laboratório para obter uma melhor decantação.

Deixar decantar o líquido sobrenadante de forma a obter um volume suficiente para assegurar um inóculo de 1% por frasco de ensaio, destinado à medição do CO_2 libertado. Evitar retirar um excesso de particulas sólidas da lama, o que poderia falsear a medição da produção do CO_2.

É conveniente a contagem de microrganismos no líquido sobrenadante. O inóculo deve conter de 10^6 a $20x10^6$ células/ml.

O inóculo deve ser utilizado no próprio dia da sua preparação.

1.6.4. *Técnica*

1.6.4.1. Solução-mãe

Preparar uma solução-mãe da substância de ensaio, em água de alta qualidade de modo a obter-se uma concentração de 1000 mg/l.

As soluções-mãe são preparadas tendo em conta o teor em carbono orgânico da substância de ensaio. Se este teor for desconhecido, levar as soluções-mãe à concentração exigida tendo em conta o peso das substâncias. Para obter uma amostra homogénea, misturar bem evitando a formação de espuma. No caso de amostras sólidas, pode ser necessário fundi-las e misturar o conteúdo dos recipientes antes de retirar uma parte aliquota. Este aspecto da técnica é extremamente importante, pois o cálculo da taxa de biodegradação só será rigoroso se o carbono orgânico adicionado ao sistema de ensaio tiver uma quantidade correcta.

Se se situar entre 3 a 10, o pH da solução-mãe não deve ser corrigido, sendo o seu valor determinado pelo tampão fosfato que entra na composição do meio de ensaio. Se o pH se situar fora dos limites indicados, ajustar uma parte aliquota da solução-mãe para um pH 7,0 (± 1,0) por meio de HCl ou NaOH 1N (1 M), tendo o cuidado de homogeneizar cuidadosamente a solução durante a adição de ácido ou de base.

Para confirmar a concentração nominal em carbono orgânico da substância de ensaio, a solução-mãe (ou uma parte aliquota neutralizada), pode ser submetida a uma análise do carbono orgânico total. Esta análise impõe-se igualmente para a solução-mãe da substância de referência.

Se a substância analisada não for solúvel na água, juntar a quantidade necessária desta substância, em peso ou em volume, directamente no frasco do ensaio.

Se a substância a examinar não for solúvel nas concentrações fixadas para o ensaio, podem ter que ser tomadas medidas especiais como, por exemplo, a utilização de um processo de dispersão por ultra-sons, para a obtenção de uma boa dispersão da substância a submeter ao ensaio.

1.6.4.2. Condições de ensaio

Devendo o inóculo ser utilizado a 1 %, é necessário proceder a diluições a meio do ensaio.

A forma mais cómoda de o fazer é a seguinte:

a) Juntar 2470 ml de água de alta qualidade (ponto 1.6.1.1) a cada um dos frascos de ensaio de 4 a 5 l;

b) Juntar a cada frasco de ensaio de 4 a 5 l, respectivamente 3 ml de solução-mãe de sulfato de amónio, de sulfato de magnésio e de cloreto de sódio e ainda 6 ml da solução tampão fosfato e 12 ml de solução de cloreto férrico;

c) Juntar 30 ml de inóculo proveniente das lamas activadas a cada frasco de ensaio de 4 a 5 l.

Eliminar o dióxido de carbono da mistura, fazendo borbulhar durante 24 h, ar isento de CO_2.

Após o período de arejamento, encher 3 frascos absorventes com 100 ml de $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M) e ligá-los em série à saída de cada frasco de ensaio.

1.6.4.3. Realização do ensaio

Juntar primeiramente a substância de ensaio a 2 dos 4 frascos de ensaio. Cada substância é submetida ao ensaio em 2 concentrações: 10 e 20 mg/l. Calcular a quantidade de solução-mãe necessária por frasco, pela fórmula seguinte:

$$\text{Quantidade de solução-mãe por frasco de ensaio, em ml: } \frac{B \times C}{A}$$

em que,

B = concentração da substância de ensaio no frasco de ensaio (mg/l)

A = concentração da substância de ensaio na solução-mãe (mg/l)

C = volume final do meio do ensaio no frasco do ensaio (ml).

Juntar nos frascos de ensaio adequados uma quantidade suficiente de solução-mãe para obter a concentração do ensaio, seguindo a fórmula anterior, e completar com água destilada até obter 473 ml (solução-mãe + H_2O de «alta qualidade»). Juntar no terceiro frasco de ensaio utilizado como testemunha e que não contém a substância de ensaio, 473 ml de água de «alta qualidade».

O volume final de cada frasco de ensaio é então de 3000 ml.

Juntar ao último dos 4 frascos de ensaio, uma substância de referência a uma concentração de 20 mg/l.

Começar o ensaio fazendo borbulhar ar isento de CO_2 na solução, a um débito de 50 a 100 ml por minuto e por frasco de ensaio (cerca de 1 a 2 bolhas por segundo).

No caso de substâncias de ensaio não solúveis na água, introduzidas no estado seco nos frascos de ensaio, melhorar a homogeneização por meio de um agitador magnético. Para os agentes que formam espuma, o borbulhar de ar isento de CO_2 pode ser substituído por um arejamento sobre a solução e agitação por dispositivo magnético.

O CO_2 produzido em cada frasco de ensaio reage com o hidróxido de bário e é precipitado sob a forma de carbonato de bário; a quantidade de CO_2 produzida é avaliada por titulação do $Ba(OH)_2$ residual, com HCl 0,05 N (0,05 M). Desligar periodicamente (todos os 2 ou 3 dias) o frasco lavador do CO_2 mais próximo do frasco de ensaio, para efectuar a titulação. Aproximar os dois frascos e introduzir no final da série um novo frasco lavador cheio com 100 ml de $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M) recentemente preparado.

Em caso de necessidade efectuar as titulações (antes do aparecimento de precipitados de $BaCO_3$ no segundo frasco) e aproximadamente de dois em dois dias durante os dez primeiros dias, e depois de cinco em cinco dias até ao 28º dia.

No 27º dia, medir de novo o pH das soluções contidas nos frascos de ensaio e depois juntar-lhes 1 ml de HCl concentrado por frasco para decompor os carbonatos. Arejar os frascos durante a noite e colher amostras de cada um deles para determinar o carbono orgânico dissolvido. Efectuar a titulação final no 28º dia.

Após se terem retirado os frascos lavadores mais próximos dos frascos de ensaio, titular 100 ml de solução de $Ba(OH)_2$. O $Ba(OH)_2$ titulado com HCl a 0,05 N (0,05 M) e utilizado como indicador a fenolftaleína.

Efectuar o ensaio à temperatura ambiente (20 a 25° C) e registar a temperatura durante o período de ensaio.

Se aparecer um patamar antes do 28º dia, o ensaio pode ser considerado como terminado.

Se a degradação tiver começado obviamente no 28º dia, sem no entanto atingir um patamar, considera-se conveniente prosseguir o ensaio durante mais uma ou duas semanas.

1.6.5. *Determinação do CO_2*

Podem ser considerados outros processos de medição da libertação do CO_2, para além da titulação de retorno do $Ba(OH)_2$ contido nos frascos lavadores. Tal alteração não afecta em nada o princípio do ensaio e pode mesmo permitir uma leitura contínua da taxa de biodegradação à medida que esta evolui.

O primeiro passo do cálculo da quantidade do CO_2 produzida deve fazer intervir um factor de correcção tendo em conta a produção endógena do CO_2 nos frascos da substância de ensaio. O frasco testemunha serve de «inóculo testemunha» permitindo uma correcção tendo em conta o CO_2 que é produzido pela respiração endógena das bactérias. A quantidade de CO_2 produzido pela substância de ensaio é determinada pela diferença (em ml do reagente da titulação) entre o frasco lavador correspondente ao ensaio e o frasco lavador correspondente à testemunha.

Quando se utiliza o HCL a 0,05 N (0,05 M) para a titulação do frasco lavador, cada ml de HCl titulado corresponde a 1,1 mg de CO_2 produzido.

2. AVALIACÃO DOS DADOS

Os resultados das análises são anotados no boletim junto a seguir (ver apêndice 1) e os valores de biodegradação são calculados de acordo com as indicações no ponto 1,2.

As concentrações de CO_2 são calculadas com aproximação a 0,1 mg/l. Os valores de biodegradação são arredondados para a unidade mais próxima.

O desenrolar do ensaio de degradação é representado graficamente num diagrama como o que se junta a título de exemplo (ver apêndice 2).

Os resultados do ensaio de degradação são válidos se forem preenchidas as seguintes condições:

— é necessário que, numa mesma série, a biodegradação da substância testemunha seja $\geqslant$ 60 % para 28 dias (se não for este o caso, toda a série deve ser rejeitada e o ensaio deve ser recomeçado com um inóculo proveniente de outra origem),

— é necessário que, durante o ensaio, não tenha sido produzida qualquer quantidade significativa de CO_2 nos frascos testemunhas (contaminação do meio, do vidro ou do ar). No final do ensaio, a produção total de CO_2 não deve exceder 50 mg de CO_2 por 3 litros do meio.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio conterá, se possível:

— os dados representados de acordo com o boletim (ver apêndice 1),

— o desenrolar do ensaio de degradação representado num diagrama indicando a fase de latência, a fase de degradação, o declive da curva e o intervalo de tempo (o « intervalo de tempo » significa um período de 10 dias com início no dia em que o nível de biodegradação observado excede, pela primeira vez, 10%),

— o processo de dispersão das substâncias não solúveis nas condições do ensaio,

— a data e o local da recolha dos organismos utilizados para o ensaio e o tratamento aplicado a esses organismos antes da inoculação;

— a gama de temperaturas registadas durante o ensaio,

— no caso de contagem de acordo com as indicações do ponto 1.6.2 (inoculação), o número de microrganismos que formam colónias por mililitro,

— as provas de validade do ensaio ($\geqslant$ 60 % da degradação em 28 dias nas substâncias de referência).

3.2. Interpretação dos resultados

Sendo este teste muito rigoroso, a obtenção dum resultado baixo para a substância estudada não implica necessariamente que a substância não seja biodegradável nas condições ambientes; esse resultado indica simplesmente serem necessários outros estudos para o comprovar.

As substâncias químicas de ensaio que apresentam uma taxa de biodegradação elevada devem ser consideradas como facilmente biodegradáveis, se esta taxa elevada for atingida nos 10 dias a contar do dia em que a taxa de biodegradação observada excedeu pela primeira vez 10 %.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301B.* Decision of the Council C(81) 30, Final.

(2) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests *Ecotoxicology and Environmental Safety,* Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* Vol. 5, No 1, 1985, p. 45-55.

(4) Larson, R.J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 38, 1979, p. 1159-1161.

Apêndice 1

Boletim a utilizar no ensaio Sturm alterado

Experiência nº: .....

Data do início do ensaio: .....

Substância de ensaio, de referência: .....

Concentração teórica do ensaio: .....

Análise do carbono: .....

$ThCO_2$ teórico: .....

Variação das temperaturas durante o ensaio: .....

Produção de CO_2:

Dias	CO_2 captado em mg	Quantidade cumulativa de CO_2	% de CO_2 teórico
28			

Validade: .....

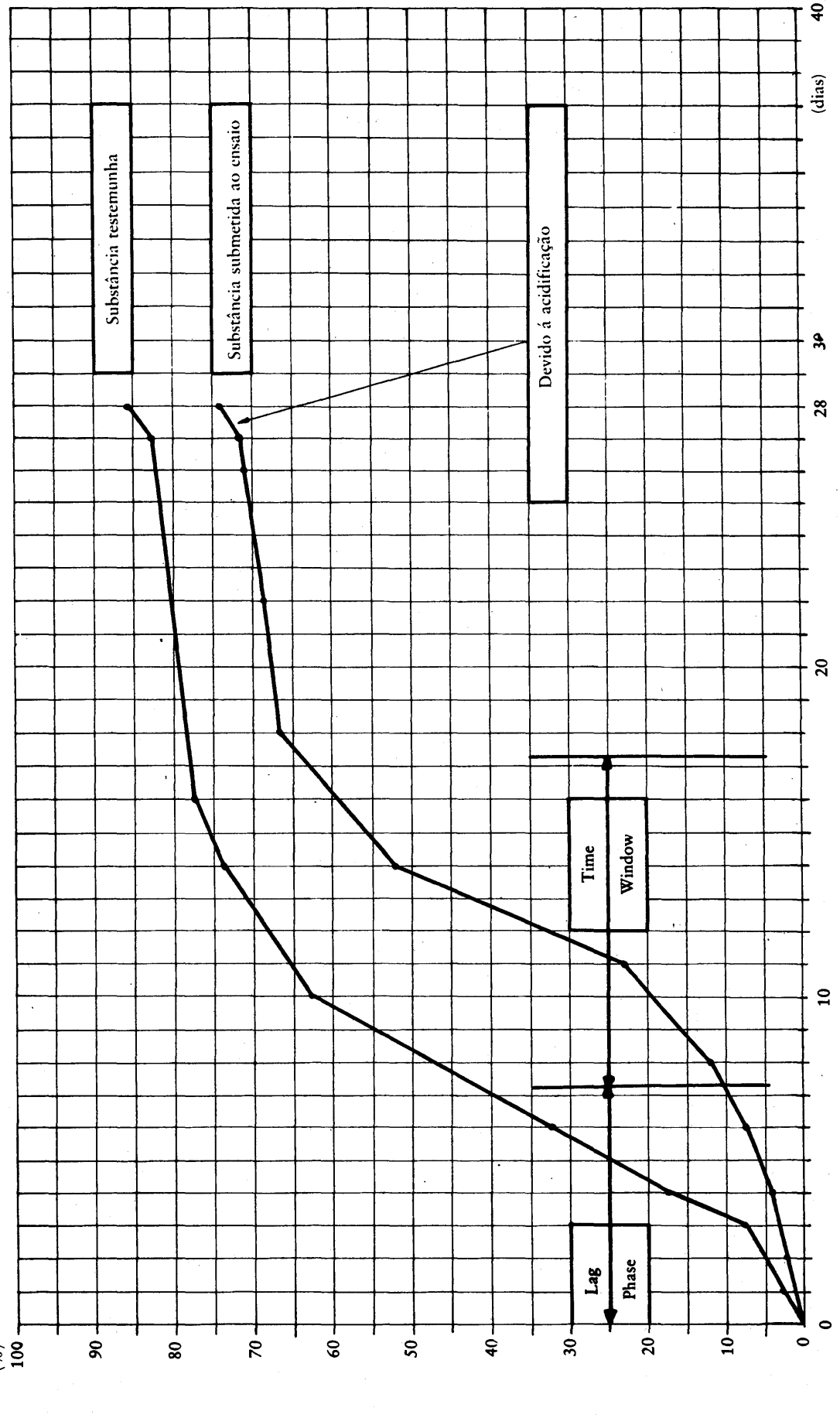
— substância de referência e % de biodegradação: .....

— evolução total do CO_2 nos frascos testemunha: .....

Apêndice 2

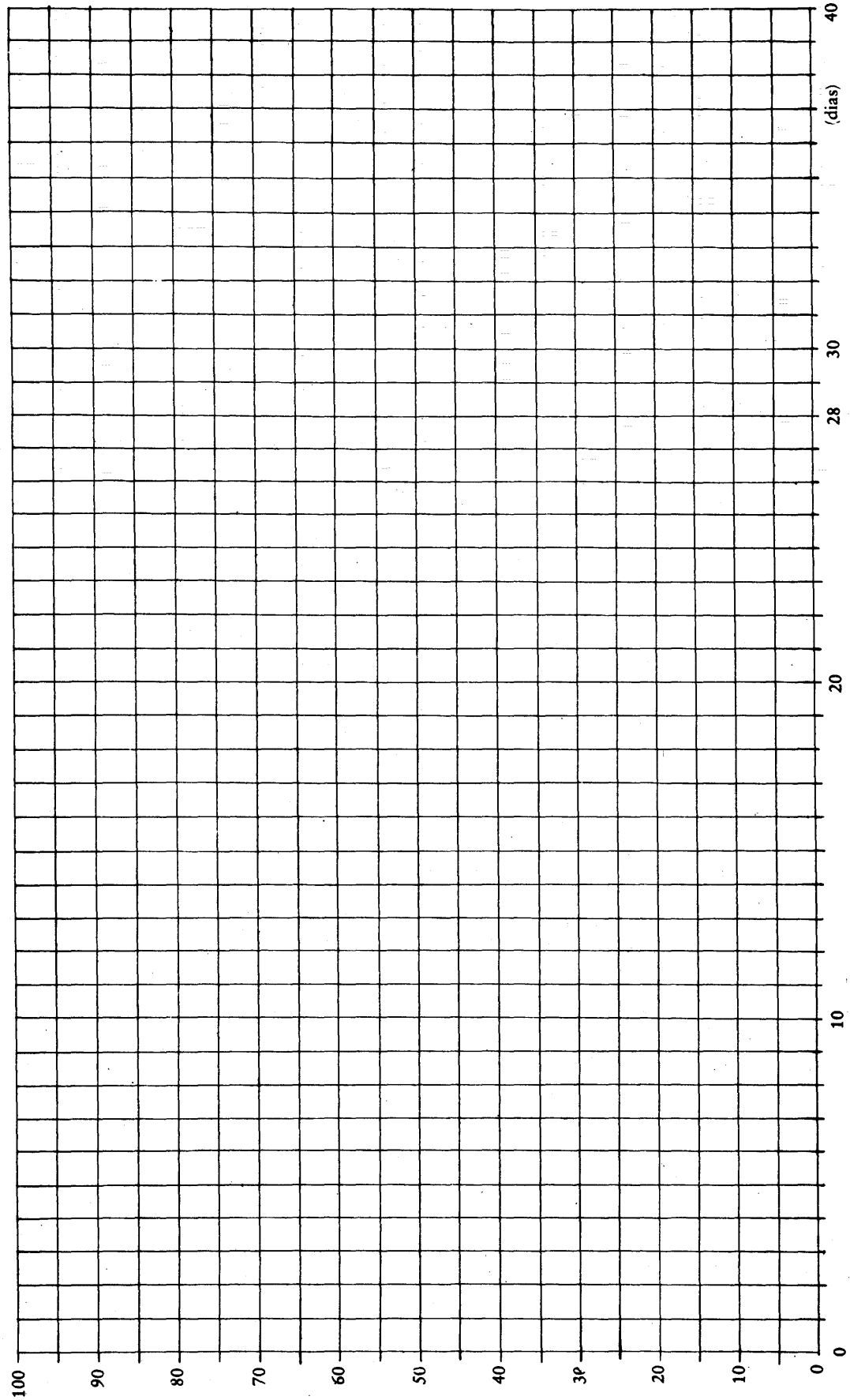
Ensaio Sturm alterado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



Ensaio Sturm alterado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



C. 6. DEGRADAÇÃO BIÓTICA: ENSAIO EM FRASCO FECHADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo deste método é a determinação da biodegradabilidade das substâncias orgânicas em meio aquoso, aeróbico, e a uma concentração de 2 mg/l (concentração-padrão) a 10 mg/l.

No estado actual do desenvolvimento, o ensaio é especialmente adequado para a avaliação da biodegradabilidade dos compostos solúveis na água. No entanto, pelo menos em princípio, nada se opõe ao estudo de compostos voláteis ou fracamente solúveis na água.

A fórmula empírica da substância de ensaio deve permitir o cálculo da carência teórica de oxigénio (CTO): se este valor não for conhecido, pode utilizar-se como valor de referência a carência química de oxigénio (CQO) da substância do ensaio (ver apêndice 1).

O método só é aplicável às substâncias de ensaio orgânicas que, na concentração utilizada no ensaio, não inibem as bactérias. Se a substância não for solúvel na concentração prevista para o ensaio, será eventualmente necessário tomar disposições especiais tal como a dispersão por ultra-sons, a fim de se obter uma dispersão satisfatória.

As informações relativas às proporções respectivas dos diferentes componentes da substância de ensaio facilitarão a interpretação dos resultados obtidos, nomeadamente quando estes são baixos.

As informações relativas à toxicidade das substâncias químicas face às bactérias podem facilitar a interpretação dos resultados de valores baixos assim como a escolha das concentrações de ensaio adequadas.

Este método pode ser utilizado para a determinação de DBO.

1.2. Definições e unidades

A carência bioquímica de oxigénio (CBO) representa a diferença do consumo de oxigénio entre uma testemunha e uma solução de substância de ensaio nas condições do ensaio. Após divisão pela concentração (P/V) da substância a ensaiar, o consumo do oxigénio é expresso em mg DBO/mg de substância.

A degradação define-se como a relação entre a carência bioquímica de oxigénio e a carência teórica de oxigénio (CTO) ou a carência química de oxigénio (CQO), expressas em percentagem.

Nota:

Por vezes, as duas formas de cálculo (percentagem de CTO ou percentagem de CQO) conduzem a resultados diferentes.

$$\% \text{ de biodegradação (CTO)} = \frac{\text{mg } O_2\text{/mg sunstância de ensaio}}{\text{CTO}} \times 100$$

ou

$$\% \text{ de biodegradação (CQO)} = \frac{\text{mg } O_2\text{/mg sunstância de ensaio}}{\text{mg CQO/mg substância de ensaio}} \times 100$$

CTO = carência teórica de oxigénio (cálculo, ver apêndice)

CQO = carência química de oxigénio, determinada experimentalmente

1.3. **Substâncias de referência**

Convém utilizar produtos químicos de referência adequados para avaliar a actividade do inóculo.

A anilina, o acetato de sódio ou o benzoato de sódio (por exemplo) podem ser utilizados para este fim e devem apresentar uma degradação $\geqslant$ 60 % em 28 dias, sem o que o ensaio é considerado como não válido e deve ser recomeçado com um inóculo proveniente de outra origem.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

Dissolver num meio mineral (solução de elementos nutritivos minerais) uma quantidade determinada da substância de ensaio de modo a obter-se uma concentração de 2 mg/l. Inocular a solução com um número restrito de microorganismos pertencentes a diferentes espécies e manter em frascos fechados a uma temperatura constante (20 a 21°C) e ao abrigo da luz.

O processo de degradação é seguido por meio de análises de oxigénio durante 28 dias. O processo é controlado por meio duma substância de referência. Efectuar-se-á um ensaio em paralelo, sem substância de ensaio nem substância de referência, para a determinação do consumo testemunha em oxigénio.

Na mesma ocasião, controla-se a substância de ensaio para verificar os efeitos de inibição eventuais face ao inóculo.

1.5. **Critérios de qualidade**

A reprodutibilidade do método foi estabelecida aquando do ensaio de intercomparação da CEE e da OCDE.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Água destilada ou desionizada.

A água destilada ou desionizada não contém mais de 0,01 mg Cu/l, saturada de ar. O volume necessário às operações diárias (por exemplo 501) é mantido à temperatura ambiente, próxima dos 20°C, e é arejado vigorosamente durante 20 minutos com a ajuda de ar comprimido. Geralmente, a água fica pronta após permanecer 20h a 20°C. O teor em oxigénio é determinado, para controlo, e deve atingir 9,90 mg O_2/l a 20°C. Todas as operações de tranferência ou de enchimento de água saturada de ar devem ser efectuados por meio de sifão, sem libertação de bolhas.

1.6.1.2. Solução nutritiva

a) Soluções-mãe

KH_2PO (diidrogenofosfato de potássio):	8,50 g
K_2HPO_4 (monoidrogenofosfato de potássio):	21,75 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (monoidrogenofosfato de sódio biidratado):	33,30 g
NH_4Cl (cloreto de amónio):	1,70 g
dissolver em 1 000 ml de água destilada. O pH deve ser de 7,2.	
Mg $SO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnésio, heptaidratado):	22,50 g
dissolver em 1 000 ml de água destilada.	
$CaCl_2$ (cloreto de cálcio):	27,50 g
dissolver em 1 000 ml de água destilada.	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (cloreto de ferro (III), hexaidratado):	0,25 g
dissolver em 1 000 ml de água destilada;	

b) Meio de ensaio

O meio de ensaio conterá, por litro de água (1.6.1.1.), 1 ml de cada uma das soluções-mãe, mencionadas anteriormente.

O pH será igual a 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Substâncias de referência

Anilina (recentemente destilada), acetato de sódio e benzoato de sódio.

1.6.2. *Aparelhagem*

1.6.2.1. Podem ser utilizados frascos de ensaio calibrados, com uma capacidade entre 250 a 300 ml, com rolha de vidro, ou frascos não calibrados de gargalo estreito, de 250 ml, com rolha de vidro cujo volume deve ser determinado.

1.6.2.2. Vários frascos de 2, 3 e 5 litros graduados, para a preparação da experiência e para o enchimento dos frascos de CBO.

1.6.2.3. Pipetas com capacidade de 1 a 10 ml. Ampolas de decantação e papel de filtro grosseiro. Frascos para a preparação do inóculo.

1.6.2.4. Banho-maria para manter os frascos a uma temperatura constante e ao abrigo da luz.

1.6.3. *Preparação do inóculo*

Pode utilizar-se uma das quatro fontes seguintes como inóculos e a sua validade pode ser controlada com a ajuda duma substância de referência (ponto 1.6.1.3.).

1.6.3.1. Inóculo à base de terra

100 g de terra de jardim, à qual não foi recentemente adicionado adubo (recomenda-se particularmente a utilização de proveniente duma estufa mantida a uma temperatura constante durante todo o ano), são postos em suspensão em 1 l de água potável, não clorada. Após 30 minutos, a suspensão é filtrada por papel de filtro grosseiro, sendo os dois primeiros mililitros do filtrado desprezados. O restante filtrado serve de inóculo (1 gota por litro do volume final). O inóculo deve ser preparado precisamente antes do ensaio. Deve ser arejado em caso de conservação durante várias horas. O número de bactérias pode ser determinado por contagem em gelose nutritiva ou lâminas nutritivas. Não deve conter mais de 10^3 a 10^5 de bactérias/ml de volume final.

1.6.3.2. Inóculo proveniente de um efluente secundário

É conveniente preparar o inóculo utilizando um efluente secundário (instalação de lamas activadas ou leitos bacterianos de tratamento em especial de águas domésticas). O efluente deve ser arejado no período entre a sua colheita e a sua utilização. Tendo e vista a preparação do inóculo, a amostra é filtrada por papel de filtro grosseiro. Os primeiros 200 ml são desprezados. O resto do filtrado é convenientemente arejado até ao momento da sua utilização. O inóculo deve ser utilizado no próprio dia.

1.6.3.3. Inóculo proveniente de uma « lama activada » de laboratório

Utiliza-se uma efluente proveniente de uma estação experimental de lamas activadas, equipada com um poderoso dispositivo de arejamento. A solução de inoculação é preparada como indicado no ponto 1.6.3.2.

1.6.3.4. Inóculo misto

Misturam-se convenientemente volumes iguais das três amostras de inoculação (pontos 1.6.3.1. a 1.6.3.3), de modo a obter o inóculo final.

1.6.4. *Técnica*

Todas as manipulações realizadas antes da incubação são efectuadas a uma temperatura de cerca de 20°C.

Os diferentes lotes de frascos (ponto 1.6.2.1.) são preparados para a determinação do CBO das substâncias de ensaio e das substâncias de referência, aquando de séries de experiências simultâneas (ver apêndice 2). Se as análises químicas forem efectuadas simultaneamente, é necessário preparar um número suficiente de frascos, incluindo os frascos necessários para o controlo do inóculo e da testemunha. Preparar-se-ão, por exemplo, 7 ou 15 frascos para a substância submetida aos ensaios de 0, 5, 15 e 28 dias, após se ter preparado um volume de água suficiente nos frascos grandes (ponto 1.6.2.2.).

Estes frascos grandes são primeiro cheios de água destilada até 1/3 do seu volume com a ajuda de um tubo flexível (ponto 1.6.1.1.). Em seguida introduz-se cada uma das soluções-mãe nutritivas (ponto 1.6.1.2.) nos frascos até à obtenção de um volume final e juntam-se as substâncias de ensaio ou de referência até serem atingidas as concentrações definitivas de 2 mg/l e por vezes de 5 mg ou 10 mg/l.

A concentração aproximada de 9 mg de oxigénio dissolvido por litro de água de diluição a 20°C limita a concentração inicial possível da substância de ensaio a cerca de 2 mg/l, de forma a garantir a manutenção de uma concentração importante em oxigénio após a oxidação da substância.

As substâncias de degradabilidade fraca ou as substâncias com DThO baixo podem ser ensaiadas paralelamente a concentrações mais elevadas.

A inoculação é realizada por pipeta à razão de uma gota/l do volume final; procede-se do mesmo modo para a testemunha.

Finalmente, a solução será levada ao volume exigido por meio de um tubo flexível que toque o fundo do frasco. Daí resultará uma mistura suficiente da solução. Em seguida, cada solução assim preparada será vertida imediatamente em cada lote respectivo de frascos por meio dum tubo flexível mergulhando até 3/4 do frasco (não até ao fundo).

Além disso, os frascos destinados ao exame do tempo zero são analisados ou submetidos a um tratamento que assegure a sua conservação tendo em vista as análises posteriores (para a determinação do O_2, precipitação por meio do $MnCl_2$ e de NaOH).

Os outros frascos preparados paralelamente são colocados em banho-maria a 20°C, ao abrigo da luz; serão retirados do banho após 5, 15 e 28 dias e analisados.

Cada série é acompanhada duma série completa de ensaios paralelos para a determinação da testemunha, do consumo de oxigénio sem inoculação e da substância de referência.

Controlo de inibição:

É fácil e simples controlar os efeitos de inibição das substâncias num teste em frasco fechado:

Série 1: 2 mg/l dum composto facilmente biodegradável, por exemplo um álcool gordo condensado com óxido de etileno numa razão molecular de 1:10, ou qualquer outra substância química de controlo.

Série 2: x mg/l da substância de ensaio (x é habitualmente igual a 2).

Série 3: 2 mg/l de compostos facilmente biodegradáveis, mais 1 x mg/l da substância de ensaio.

Se os valores CBO da série 3 forem inferiores à soma dos valores das séries 1 e 2, pode considerar-se que a substância de ensaio não tem efeitos inibidores face às bactérias nesta concentração. Este controlo é sempre necessário se uma degradabilidade negativa ou fraca parecer ilógica face à estrutura da substância a testar, isto é, quando certos índices permitem supor que esta fraca degradação é provocada por fenómenos de inibição.

1.6.5. *Determinação do oxigénio dissolvido*

A dosagem do oxigénio dissolvido efectua-se por meio de métodos químicos ou electroquímicos normalizados reconhecidos no plano internacional ou nacional.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

Os resultados analíticos são registados no boletim anexo (ver apêndice 3).

A evolução da degradação é representada graficamente num diagrama.

Os resultados do teste de degradação são válidos se forem preenchidas as condições seguintes:

— na mesma série de ensaios, a substância de referência revela uma biodegradação $\geqslant$ 60 % para um período de 28 dias. Se tal não se verificar, toda a série deve ser eliminada,

— o consumo de oxigénio, sem inoculação, nao excede 0,3 mg de oxigénio por litro após 5 dias e 0,4 mg de oxigénio por litro após 28 dias; a testemunha com inoculação não deve revelar um consumo > 0,5 mg de oxigénio por litro após 5 dias e 0,6 mg de oxigénio por litro após 15 a 28 dias.

3. RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório deve conter, se possível:

— os dados registados sob a forma prevista no boletim (ver apêndice 3),

— o desenrolar do ensaio de degradação representado num diagrama indicando a fase de latência, a fase de degradação, a inclinação da curva e o intervalo de tempo (o « intervalo de tempo significa, aqui, um período de 10 dias com início no dia em que o nível de biodegradação observado excedeu pela primeira vez 10 %),

— o método utilizado para a determinação de DQO,

— o método utilizado para a medição do oxigénio,

— a justificação e os comentários científicos relativos a qualquer alteração do processo ou à eliminação do teste,

— o processo de dispersão para as substâncias fracamente solúveis no controlo do ensaio,

— o controlo de validade do teste.

3.2. Interpretação dos resultados

Deve ter-se em conta a influência eventual dos compostos azotados sobre os resultados.

Sendo o ensaio realizado em condições muito rigorosas, um resultado baixo não significa necessariamente que o composto testado não seja biodegradável no meio ambiente, mas indica que será necessário efectuar estudos suplementares para a sua confirmação.

As subtâncias químicas do ensaio, que se caracterizam por um consumo elevado de oxigénio neste ensaio, devem ser consideradas como facilmente biodegradáveis, quando este nível for atingido nos 10 dias a contar do dia em que o nível de biodegradação observado excedeu pela primeira vez 10 %.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301D*. Decision of the Council C(81)30, Final.

(2) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of biodegrability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various test II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45-55.

Apêndice 1

Calculo da carência bioquímica teórica de oxigénio (CTO)

A CTO do composto $C_c\ H_h\ Cl_{cl}\ N_n\ Na_{na}\ O_o\ P_p\ S_s$ de peso molecular PM é calculado pela fórmula seguinte:

$$CTO_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Esta fórmula implica que C é mineralizado em CO_2, H em H_2O, P em P_2O_5 e Na em Na_2O. O halogéneo é eliminado sob a forma de halogeneto de hidrogénio e o azoto sob forma de amoníaco.

Exemplo:

glucose $C_6H_{12}O_6$, PM = 180

$$CTO = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose.}$$

Para os cálculos dos pesos moleculares dos sais, excluindo os sais de metais alcalinos, supõe-se que estes sais foram hidrolisados.

O enxofre, supõe-se oxidado no estado de + 6.

Exemplo:

n — alquilbenzenesulfonato de sódio, $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$CTO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg de substância.}$$

No caso de certos compostos contendo azoto, este pode ser igualmente eliminado sob a forma de amoníaco, de nitrito ou nitrato segundo as diferentes carências bioquímicas teóricas de oxigénio.

$$CTO_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

$$CTO_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

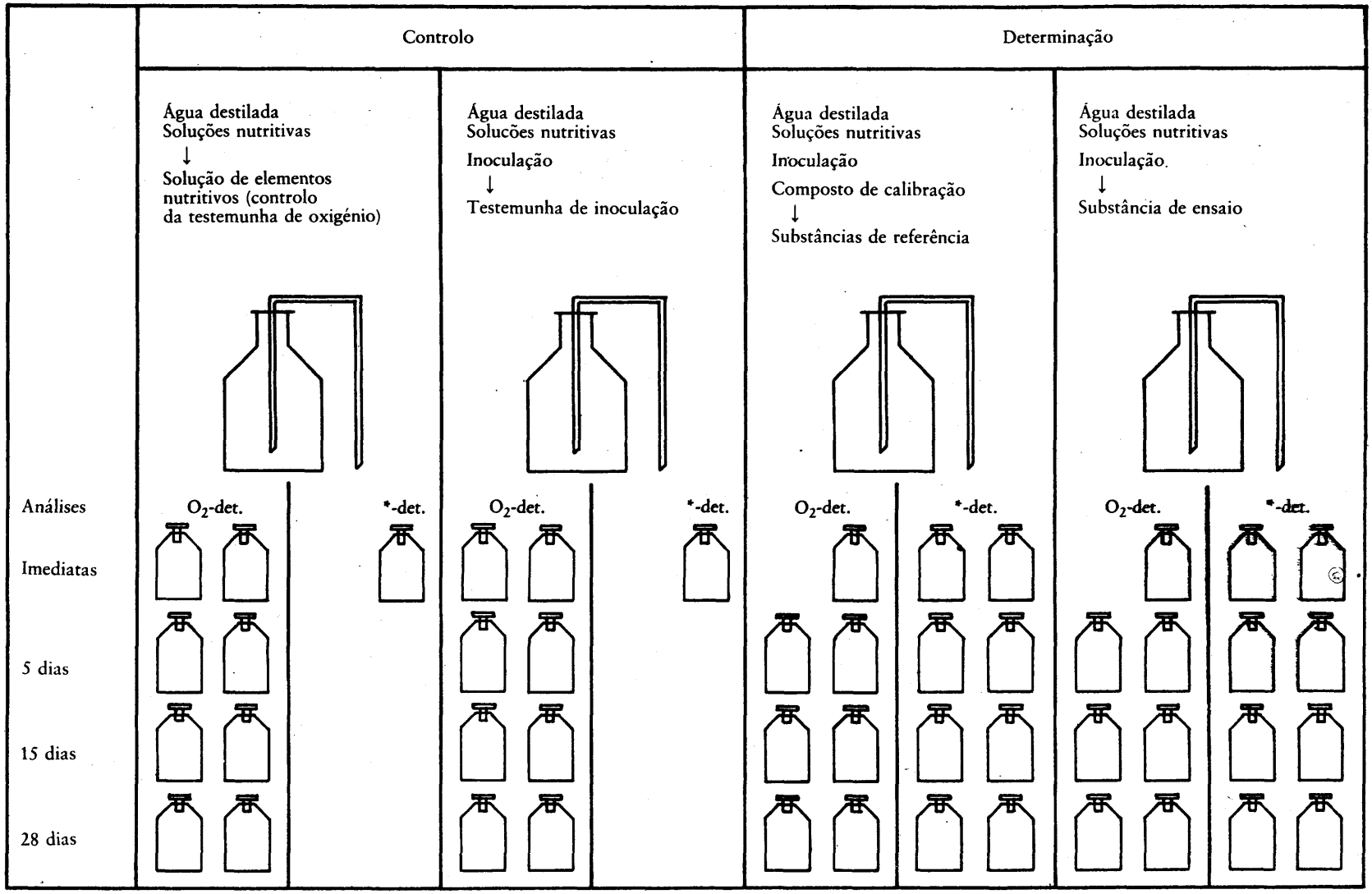
Supondo que uma formação total de nitrato foi observada por análise, por exemplo, no caso de uma amina secundária: $(C_{12}H_{25})_2\ NH$, PM = 353

$$CTO_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg de substância.}$$

Apêndice

Esquema da repartição dos frascos para ensaio en frasco fechado

(* para análise específica eventual)



Apêndice 3

Degradação biótica: ensaio em frasco fechado (boletim)

Laboratório: .....

Director dos estudos: .....

Data de início do ensaio: ..... Experiência nº: .....

Substância de ensaio: .....

Composição química: .....

Análise (método Winkler ou eléctrodo de oxigénio): .....

CTO ou CQO da substância a ensaiar: ..... mg O_2/mg

Temperatura da água de diluição após arejamento: .....

Concentração do oxigénio da água após arejamento, e no início do ensaio: .....

..... mg O_2/l

Inóculo: .....

Resultado do ensaio

D_t = ... CBO expressa em % de CTO após 28 dias

ou

D_t = ... CBO expressa em % de CQO após 28 dias

Validação do resultado

Substância de referência: .....

Resultado: ..... CBO expressa em % de CTO após 28 dias

Experiência de referência nº: .....

Observações:

Laboratório: .....

Substância de ensaio: .....

Experiência nº: .....

A. *Determinações do oxigénio*

	Frasco nº	Análises	mg O_2 após x dias			
			0	5	15	28
Solução nutritiva mineral sem substância a ensaiar e sem inoculação	Controlo de O_2	c_1		—	—	—
		c_2		—	—	—
	Média	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Solução nutritiva mineral sem substância a ensaiar mas com inoculação	1	c_3				
	2	c_4				
	Média em branco	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Solução nutritiva mineral com substância a ensaiar e com inoculação	1	a_1				
	2	a_2				
	Média de substância a ensaiar	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B. *Consumo de O_2 (mg CBO/l) após x dias*

$CBO_x = (m_o - m_{b_x}) - (m_o - m_{t_x})$ (*)

mg CBO/l após x dias		
5	15	28

(*) Esta diferença é importante para o controlo da validade do ensaio.

C. *Avaliação*

$$D_t = \frac{\text{mg } CBO_x/l}{\text{mg } S_E \text{ (**)}/l} \cdot 100$$

ou

$$CBO_x/CQO = \frac{\text{mg } CBO_x/l}{\text{mg SE/l CQO}} \cdot 100$$

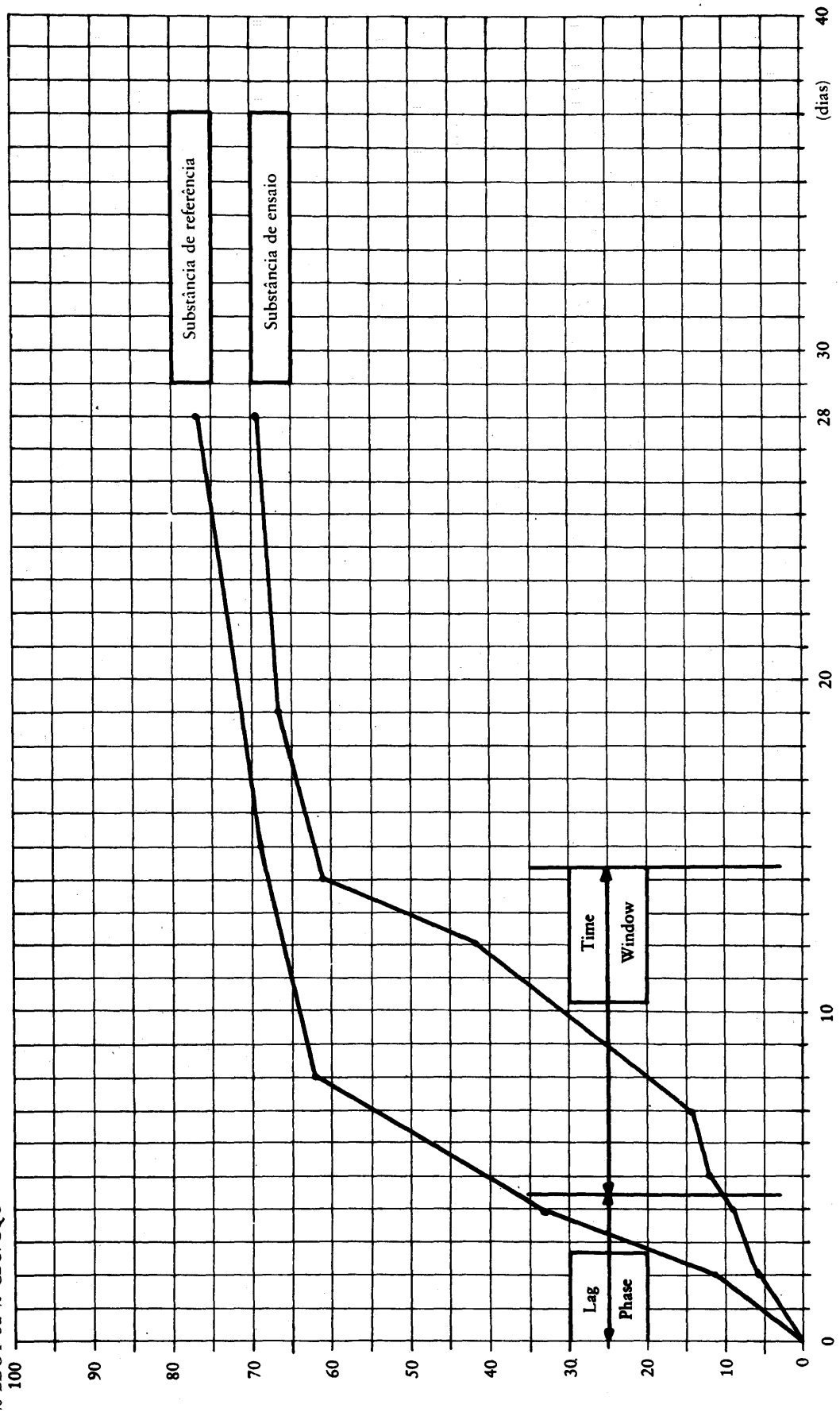
	Após x dias		
	5	15	28
% CBO/CTO			
% CBO_x/CQO			

(**) Substância de ensaio.

Apêndice 4

Ensaio em frasco fechado

Organização responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....

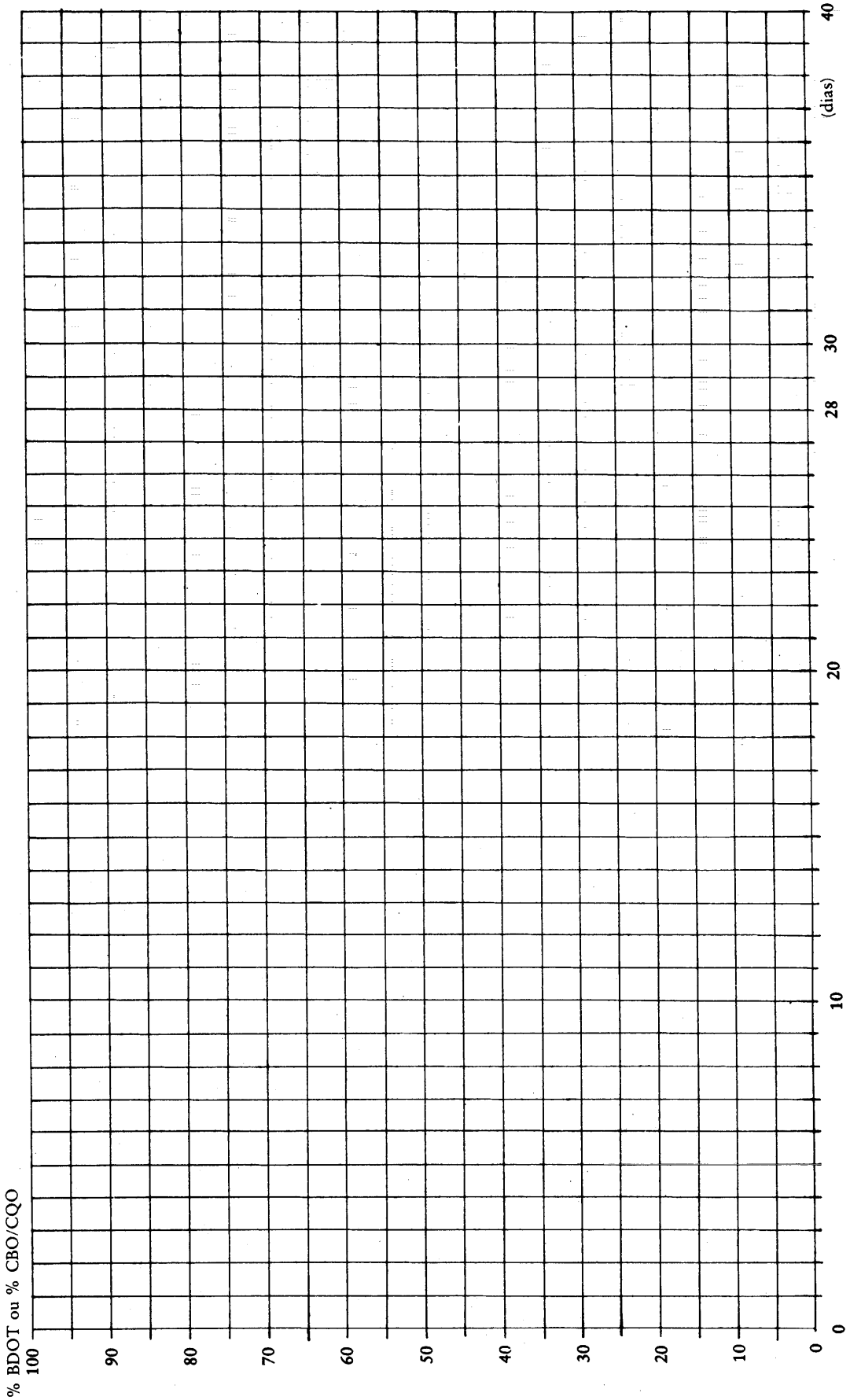


Ensaio em frasco fechado

Organização responsável pelo ensaio: .....

Substância a ensaiar: .....

Experiência nº: .....



C. 7. DEGRADAÇÃO BIOTICA: ENSAIO MITI ALTERADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O presente método de ensaio tem por objectivo a medição de biodegradabilidade das substâncias orgânicas em meio aquoso, por meio de um respirómetro que indica a demanda bioquímica em oxigénio.

Convém dispor da fórmula empírica do produto submetido a ensaio, de modo a que se possa calcular a carência teórica de oxigénio (CTO); caso contrário, pode usar-se a carência química de oxigénio (CQO). O presente método só é aplicável às substâncias orgânicas que, na concentração utilizada para o ensaio:

— têm uma pressão de vapor que se pode desprezar,

— não inibem as bactérias,

— não estão em contacto com o absorvente do CO_2 e não reagem com ele.

Se a substância a testar não for solúvel na concentração do ensaio, pode recorrer-se a processos especiais, como a dispersão por ultra-sons, de modo a obter-se uma dispersão suficiente.

Informações sobre a toxicidade da substância química face aos microrganismos podem revelar-se úteis para a interpretação dos resultados que indiquem uma biodegradação limitada e também para escolher as concentrações adequadas.

São também úteis para a interpretação dos resultados obtidos, as informações sobre as proporções relativas dos principais componentes da substância ensaiada.

1.2. Definições e unidades

$$\text{taxa de degradação} = \frac{\text{CBO} - \text{B}}{\text{CTO (ou CQO)}} \times 100\ \%$$

ou

$$\text{taxa de degradação} = \frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100\ \%$$

em que

CBO = Carência bioquímica de oxigénio (experimental) (mg) do produto ensaiado, tal como é obtido na curva da CBO

B = Consumo de oxigénio (experimental) (mg) do meio de cultura de base, ao qual o inóculo é adicionado, tal como se revela sobre a curva da CBO

CTO = Carência teórica de oxigénio para uma oxidação completa (teórica) do produto ensaiado (mg)

Sa = Quantidade residual (experimental) (mg) do produto ensaiado no final do ensaio de biodegradabilidade

Sb = Quantidade residual (experimental) (mg) do produto submetido ao ensaio testemunha, por meio de água à qual se adicionará unicamente o produto submetido ao ensaio.

1.3. Substâncias de referência

A fim de verificar a actividade do inóculo, convém usar substâncias de referência, tais como a anilina, o acetato de sódio ou o benzoato de sódio. Se a taxa de degradação da anilina, calculada após o consumo de oxigénio, não exceder 40 % após 7 dias e 65 % após 14 dias, o ensaio é considerado nulo.

Se a degradação no ensaio testemunha (Sb) se revelar importante, o ensaio é igualmente considerado nulo.

1.4. **Princípio do método**

Os produtos a examinar constituem a única fonte de carbono orgânico no meio e não há adpatação prévia dos microrganismos aos produtos a ensaiar.

Utiliza-se um aparelho automático para medição do consumo de oxigénio em circuito fechado, (aparelho de medição da CBO). As substâncias químicas que são objecto de ensaio, colocadas nos recipientes de ensaio, são inoculadas com microrganismos. Durante o ensaio, mede-se continuamente a carência bioquímica de oxigénio, no aparelho de medição da CBO. Calcula-se a biodegradabilidade a partir do valor CBO e de uma análise química complementar, tal como a medição da concentração do carbono orgânico dissolvido, a concentração dos produtos residuais, etc.

1.5. **Critérios de qualidade**

1.5.1. *Reprodutibilidade*

Geralmente boa, nomeadamente para as substâncias químicas cuja solubilidade na água é superior a 0,1 g/l.

1.5.2. *Sensibilidade*

A) Consumo de oxigénio: limite de detecção = 1 mg (oxigénio consumido pelos microrganismos);
B) Análise química: depende da sensibilidade das técnicas analíticas utilizadas.

1.5.3. *Especificidade*

Este método aplica-se a qualquer substância química não volátil, para a qual $(C)_{água}/(C)_{ar} \geqslant 1$. Para os produtos voláteis, convém utilizar um «aparelho de medição da CBO alterado» que consiste no aparelho normal equipado com tubos capilares (ver apêndice 1).

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. A água destilada não deve conter mais de 10 % do carbono orgânico introduzido pela substância a ensaiar.

1.6.1.2. Meio de cultura de base

Retirar 3ml da solução A, da solução B, da solução C e da solução D e juntar água para completar o volume até 1 000 ml (utilizar em todos os casos água desionizada).

A) K_2HPO_4 (monoidrogenofosfato de potássio):	21,75 g
KH_2PO_4 (diidrogenofosfato de potássio):	8,50 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$ (monoidrogenofosfato de sódio, dodecaidratado):	44,60 g

NH_4Cl (cloreto de amónio): 1,70 g
Dissolver e completar o volume até 1 000 ml com água (1.6.1.1.);

B) $MgSO_4.7H_2O$ (sulfato de magnésio, heptaidratado): 22,50 g
Dissolver e completar o volume até 1 000 ml com água (1.6.1.1.);

C) $CaCl_2$ (cloreto de cálcio): 27,50 g
Dissolver e completar o volume até 1 000 ml com água (1.6.1.1.).

D) $FeCl_3.6H_2O$ [cloreto de ferro (III), hexaidratado]: 0,25 g
Dissolver e completar o volume até 1 000 ml com água (1.6.1.1.).

1.6.2. *Aparelhagem*

Aparelho de medição do DBO equipado com 6 frascos de 300 ml de capacidade cada um.

Frascos nº 1 e nº 2:

300 ml de água desionizada + 30 mg da substância de ensaio.

Frascos nº 3 e nº 4:

300 ml do meio de cultura de base + 9 mg de lama activada (peso seco) + 30 mg da substância de ensaio.

Frasco nº 5:

300 ml do meio de cultura de base + 9 mg de lama activada (peso seco) + 30 mg de anilina ou outra substância de referência.

Frasco nº 6:

300 ml do meio de cultura de base + 9 mg de lama activada (peso seco).

1.6.3. *Preparação do inóculo*

1.6.3.1. Lama activada

Locais de recolha de amostras de lama: em princípio, as amostras são recolhidas pelo menos em 10 locais diferentes, repartidos por todo o país, principalmente em zonas em que diferentes substâncias químicas são susceptíveis de serem utilizadas e rejeitadas no meio ambiente.

No Japão,por exemplo, a lama activada padrão do Japanese Chemical Biotesting Centre é constituída por uma mistura de amostras recolhidas nos seguintes locais:

— estação de depuração urbana: 3 estações no Norte, Centro e Sul do Japão,

— estação de depuração industrial: uma estação destinada ao tratamento de águas provenientes de indústrias químicas,

— rios: três rios situados no norte, centro e sul,

— lago: um lago situado no Centro do Japão,

— mares: dois mares interiores no Japão.

Periodicidade dos levantamentos de lama:

— em principio as amostras de lamas devem ser retiradas quatro vezes por ano, em Março, Junho, Setembro e Dezembro.

Método de amostragem das lamas:

— águas de esgoto: colher 1 litro de lama reciclada na estação de depuração,

— rios, lagos, pântanos ou mares: colher 1 litro de terra situada na superfície da praia e em contacto com a atmosfera.

Preparação:

Colocar as lamas das diversas proveniências num recipiente, homogeneizar e deixar decantar. Retirar as matérias flutuantes estranhas e passar o líquido sobrenadante por papel de filtro nº 2. Ajustar o pH do filtrado a 7,0 + 0,1 com hidróxido de sódio ou ácido fosfórico, depois transferir o filtrado para um recipiente de incubação e submetê-lo a arejamento.

Cultura:

Após cerca de 30 minutos de arejamento, retirar cerca de 1/3 do volume total do líquido sobrenadante. Juntar igual volume de água de esgoto sintetica a 0,1 % (água de esgoto sintética: dissolver 1 g de glucose, 1 g de peptona e 1 g de monofosfato de potássio num litro de água e ajustar o pH a 7,0 ± 1,0 com hidróxido de sódio) ao resto do líquido sobrenadante e arejar a mistura de novo. Repetir todos os dias a operação. A incubação é feita a 25 ± 20° C.

Controlo:

Para o controlo da cultura, verificar as condições mencionadas a seguir e proceder aos ajustamentos necessários:

— aspecto do líquido sobrenadante: o líquido sobrenadante da lama activada deve ter aspecto claro,

— propriedades de decantação da lama activada: a lama activada em grossos flocos deve ter boas propriedades de decantação,

— estado de formação da lama activada: quando não se observe o desenvolvimento dos flocos, deve-se aumentar, quer o volume da água de esgoto sintética a 0,1 %, quer a frequência de adição da água de esgoto sintética,

— o pH do líquido sobrenadante deve ser igual a 7,0 ± 1,0,

— temperatura: a temperatura da incubação da lama activada é de 25° ± 2° C,

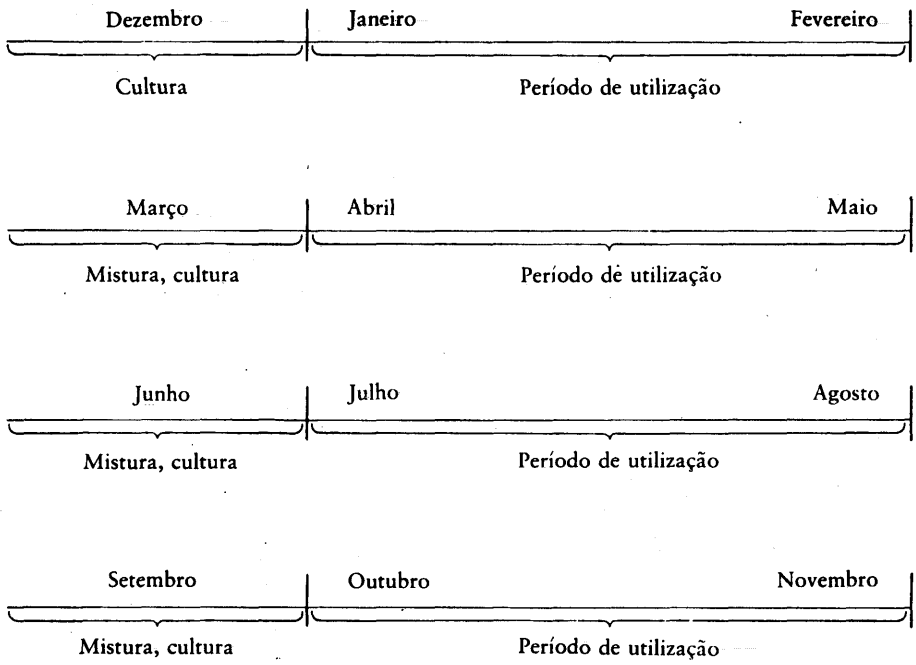
— grau de arejamento: aquando da substituição do líquido sobrenadante pela água de esgoto sintética, a suspensão contida no recipiente de cultura deve ser suficientemente arejada, de forma a manter a concentração em oxigénio dissolvido na solução a um valor superior a 5 mg/l,

— microflora da lama activada: a observação da lama activada ao microscópio (x 100 a x 400), deve permitir a revelação, além dos flocos, dum certo número de protozoários de diferentes espécies,

— mistura de lamas activadas frescas e antigas: a fim de se conservar a mesma actividade para as lamas activadas frescas e antigas, o filtrado do líquido sobrenadante de uma lama activada utilizada para o ensaio deve ser misturado com igual volume do líquido sobrenadante de uma lama activada recentemente recolhida, após o que a mistura é submetida à incubação,

— controlo da eficácia da lama activada: verificar periodicamente, isto é pelo menos uma vez de 3 em 3 meses, a eficácia da lama activada com substâncias padrão e utilizando o método descrito a seguir. Deve vigiar-se particularmente o controlo da actividade da lama antiga aquando da mistura de amostras de lamas frescas e antigas.

Exemplo de preparação de amostras de lama activada e tempo de utilização:



(e assim por diante).

1.6.4. *Preparação do produto a examinar*

Se o produto a examinar não puder ser solubilizado na água para se obter a concentração exigida para o ensaio, convém pulverizá-lo tão finamente quanto possível.

1.6.5. *Adição do produto a examinar e preparação do ensaio*

Preparar os recipientes mencionados a seguir, e levá-los à temperatura exigida para o ensaio (ponto 1.6.2.).

1) Dois recipientes de ensaio contendo água à qual se adicionaram 100 mg/l da substância a examinar (recipientes 1 e 2).

2) Dois recipientes de ensaio contendo o meio de cultura de base ao qual se adicionarão 100 mg/l da substância a examinar; se necessário, ajustar o pH desta solução para 7, antes da inoculação da lama activada (recipientes 3 e 4).

3) Um recipiente de ensaio contendo o meio de cultura de base ao qual se adicionarão 100 mg/l de anilina ou de qualquer outra substância de referência (recipiente 5).

4) Um recipiente de ensaio testemunha contendo unicamente o meio de cultura de base (recipiente 6).

1.6.5.1. Inoculação da lama activada

Juntar o inóculo nos recipientes de ensaio 3, 4, 5 e 6 anteriores, de modo a que a concentração de matérias em suspensão definidas pelas normas industriais japonesas (3), por exemplo, seja igual a 30 mg/l.

1.6.5.2. Condições do ensaio

Concentração em produtos a examinar: 100 mg/l.

Concentração das lamas activadas: 30 mg/l.

Temperatura do ensaio: 20 a 25° C.

Duração do ensaio: 28 dias.

Efectuar o ensaio às escuras. Verificar diariamente a temperatura, assim como as alterações da cor do conteúdo do recipiente de incubação.

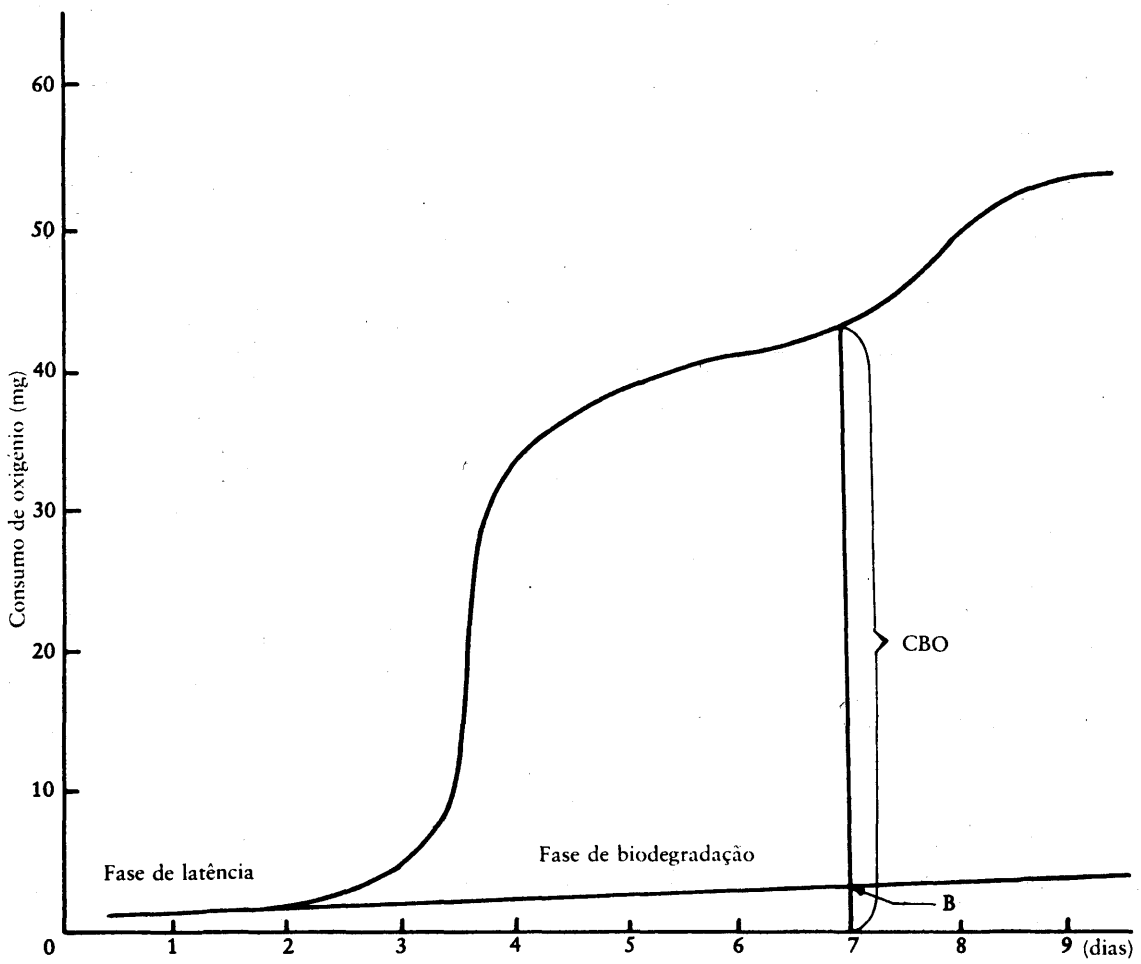
Homogeneizar as soluções com agitador mecânico.

1.6.6. *Técnica*

A curva de evolução do DBO é registada continuamente durante 28 dias (ver figura). Após 28 dias de ensaio, medir o pH e a concentração dos produtos químicos residuais e intermediários contidos no recipiente de ensaio.

Figura 1

Curva de CBO da anilina



Analisar igualmente os produtos a examinar contidos no recipiente sem lama activada, de modo a confirmar se há qualquer alteração do produto examinado durante o período de ensaio ou qualquer perda do produto original por evaporação, por evaporação ou adsorção pelas paredes do recipiente de ensaio, etc.

1.6.7. *Aparelhos de análise*

Se a substância a ensaiar for solúvel na água, convém igualmente determinar a quantidade residual de carbono orgânico total no final do ensaio.

a) Quando se utiliza um aparelho para determinação do carbono orgânico total:

Retirar do recipiente de ensaio 10 ml da solução a examinar e centrifugá-los a 3000 g, durante 5 minutos. Medir em seguida a quantidade residual de carbono orgânico total no líquido sobrenadante, por meio de um aparelho para determinação do carbono orgânico total;

b) Quando se utilizam outros aparelhos:

Extrair a substância a examinar por meio de um solvente adequado, actuando sobre o conteúdo total do recipiente de ensaio e, após um pré-tratamento conveniente, tal como a concentração, determinar a quantidade residual de substância, por meio de um instrumento de análise (cromatografia gasosa, espectrometria de massa, espectrofotometria, etc.).

Para os produtos voláteis, o banho termostatizado do aparelho de medição da CBO deve ser arrefecido para 10° C, e mantido a esta temperatura durante pelo menos 30 minutos, a fim de impedir a evaporação. Proceder em seguida às análises a) e b).

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

2.1. Expressão dos resultados

Os métodos de cálculo da taxa de degradação a partir do consumo de oxigénio e a partir dos resultados de análise directa são definidos em 1.2.

2.2. Avaliação dos resultados

A carência teórica de oxigénio pode ser calculada como se indica no Apêndice 2 ou segundo o processo de MITI original:

Elemento:	*Forma oxidada:*
C	CO_2
H	H_2O
N	NO_2
S	SO_2
X (halogéneo)	X

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1. Relatório do ensaio

O relatório de ensaio deve conter, se possível, as seguintes indicações:

— informações sobre os produtos químicos a examinar: nome, estrutura, peso molecular, grau de pureza, natureza das impurezas, propriedades físico-químicas e identificação da substância,

— condições do ensaio,

— inóculos: locais de recolha e concentração das lamas activadas,

— substância a examinar: concentração,

— duração do ensaio,

— temperatura do ensaio,

— técnica analítica:
pré-tratamento,
condições analíticas dos instrumentos,
eficácia da análise,
identificação dos produtos intermédios,

— resultados:
curvas de biodegradação (controlo da actividade do inóculo + curva da substância)
DBO (mg)
B (mg)
Sa (mg)
Sb (mg)
DThO (mg)
taxa de degradação obtida por determinação do DB0,
taxa de degradação obtida por análise química,
cromatografias ou espectros dos produtos do ensaio obtidos e utilizados para a análise,
prova da validade (ver ponto 1.3.).

3.2. **Interpretação dos resultados**

Convém verificar se as substâncias não contêm azoto susceptível de influenciar os resultados.

Se a taxa de recuperação de Sb se revelar da ordem dos 10 % ou inferior, isto põe em evidência problemas analíticos ou uma hidrólise, por exemplo; em tal caso, convém ser particularmente prudente na interpretação.

Apesar do rigor do ensaio,um resultado pouco elevado não significa necessáriamente que a substância submetida ao ensaio não seja biodegradável em meio natural, mas indica que será necessário proceder a outros ensaios para o provar.

Os produtos a examinar para os quais os resultados do presente ensaio indiquem um forte consumo de oxigénio devem ser considerados como fácilmente biodegradáveis, quando esse nível for atingido no prazo de 10 dias a contar do dia em que o nível de biodegradação observado excedeu pela primeira vez 10 %.

4. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 301C. Decision of the Council C(81) 30,Final.

(2) *Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances* (C-5/98/JAP), 1978.

(3) *The chemical substances control law in Japan* (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.

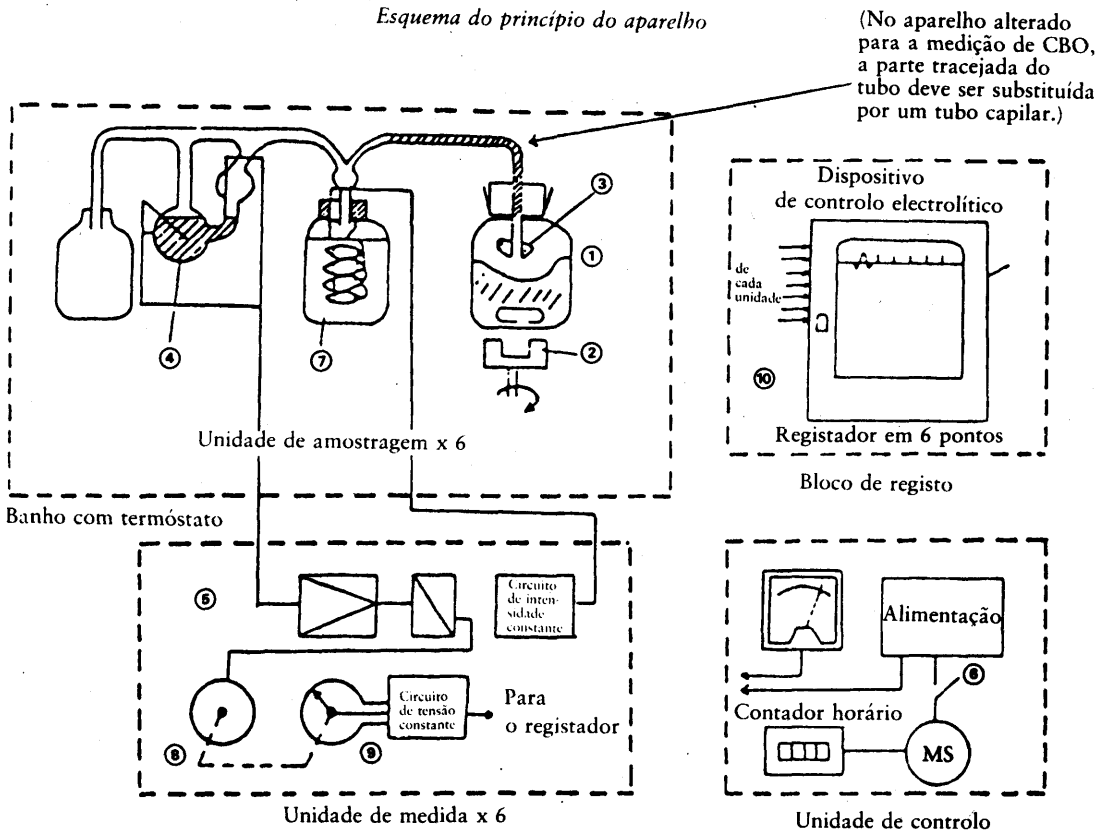
(4) *The biodegrability and bioaccumulation of new and existing chemical substances*, 5, 8 (C-3/78/JAP), 1978.

Apêndice 1

Princípio de funcionamento do aparelho para medição do consumo de oxigénio em circuito fechado

A medição do oxigénio consumido pelos microrganismos pode ser feita por um processo de análise electroquímica (colorimetria).

Esquema do princípio do aparelho



O meio contido no frasco de incubação (1) é homogeneizado com agitador magnético (2). À medida que a reaçcão progride, o oxigénio dissolvido no líquido é consumido. O oxigénio (O_2) mantido no frasco de incubacão é dissolvido no líquido e transforma-se em CO_2.
Quando o CO_2 é absorvido cal viva (3), a pressão parcial do oxigénio no frasco e a pressão total diminuem.
O abaixamento da pressão é detectado e convertido em sinal eléctrico pelo manómetro de electrodo (4), e este sinal é ampliado pelo amplificador (5), para accionar o interruptor (6) o que provoca o arranque do motor síncrono (8).
Simultaneamente, sob a acção de uma corrente de intensidade constante, o oxigénio é produzido por electrólise a partir de uma solução de cobre em ácido sulfúrico, contida no frasco de electrólise (7). Este oxigénio é enviado para o frasco de incubação e o restabelecimento da pressão assim obtido é detectado pelo manómetro, o que tem por efeito desligar o circuito e parar o motor electrolítico e síncrono.
O espaço situado por cima do líquido no frasco de incubação é mantido a uma pressão de oxigénio constante e a quantidade de oxigénio é produzida por electrólise. Sendo esta última quantidade por seu lado proporcional à duração da electrólise, a corrente electrolítica é constante. Por consequência, o ângulo de rotação do motor síncrono (9) é transformado em sinal mV por meio dum potenciómetro de inter fechadura, o que se traduz pela indicação da quantidade de oxigénio consumida no registador (10).

Apêndice 2

Cálculo da carência bioquímica teórica de oxigénio (CTO)

A CTO de um composto $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de peso molecular PM é calculada pela fórmula seguinte:

$$CTO_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Esta fórmula implica que C é mineralizado em CO_2, H em H_2O, H em H_2O, P em P_2O_5 e Na em Na_2O. O halogéneo é eliminado sob a forma de halogeneto de hidrogénio e o azoto sob a forma de amoníaco.

Exemplo:
Glucose $C_6H_{12}O_6$, PM = 180

$$CTO = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose}$$

Para o cálculo dos pesos moleculares dos sais, excluindo os sais de metais alcalinos, supõe-se que esses sais são hidrolisados. O enxofre, supõe-se oxidado na forma de + 6.
Exemplo:
n-Alquilbenzenossulfonato de sódio, $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$CTO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg de substância}$$

No caso de compostos contendo azoto, este pode ser eliminado sob a forma de amoníaco, de nitrito ou nitrato segundo as diferentes carências bioquímicas teóricas de oxigénio.

$$CTO_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

$$CTO_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Supondo que uma formação total de nitrato foi observada por análise, por exemplo no caso de uma amina secundária:
$(C_{12}H_{25)2}NH$; PM = 353,

$$CTO_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg de substância.}$$

Apêndice 3

Degradação biótica: ensaio MITI alterado (boletim)

Laboratório: .....

Director dos estudos: .....

Data de início do ensaio: ..... Experiência nº: .....

Substância de ensaio: .....

Composição química: .....

Análise: .....

CTO ou CQO da substância a ensaiar: .....

Inóculo: .....

Local de amostragem: .....

Concentração: .....

Resultado do ensaio

..... % degradação = $\frac{\text{CBO} - \text{B}}{\text{CTO}} \times 100$ % após 28 dias

ou

..... % degradação = $\frac{\text{CBO} - \text{B}}{\text{CQO}} \times 100$ % após 28 dias

..... % degradação = $\frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100$ % após 28 dias

Validação do resultado

Controlo químico: .....

Resultado: ..... % de degradação após 28 dias .....

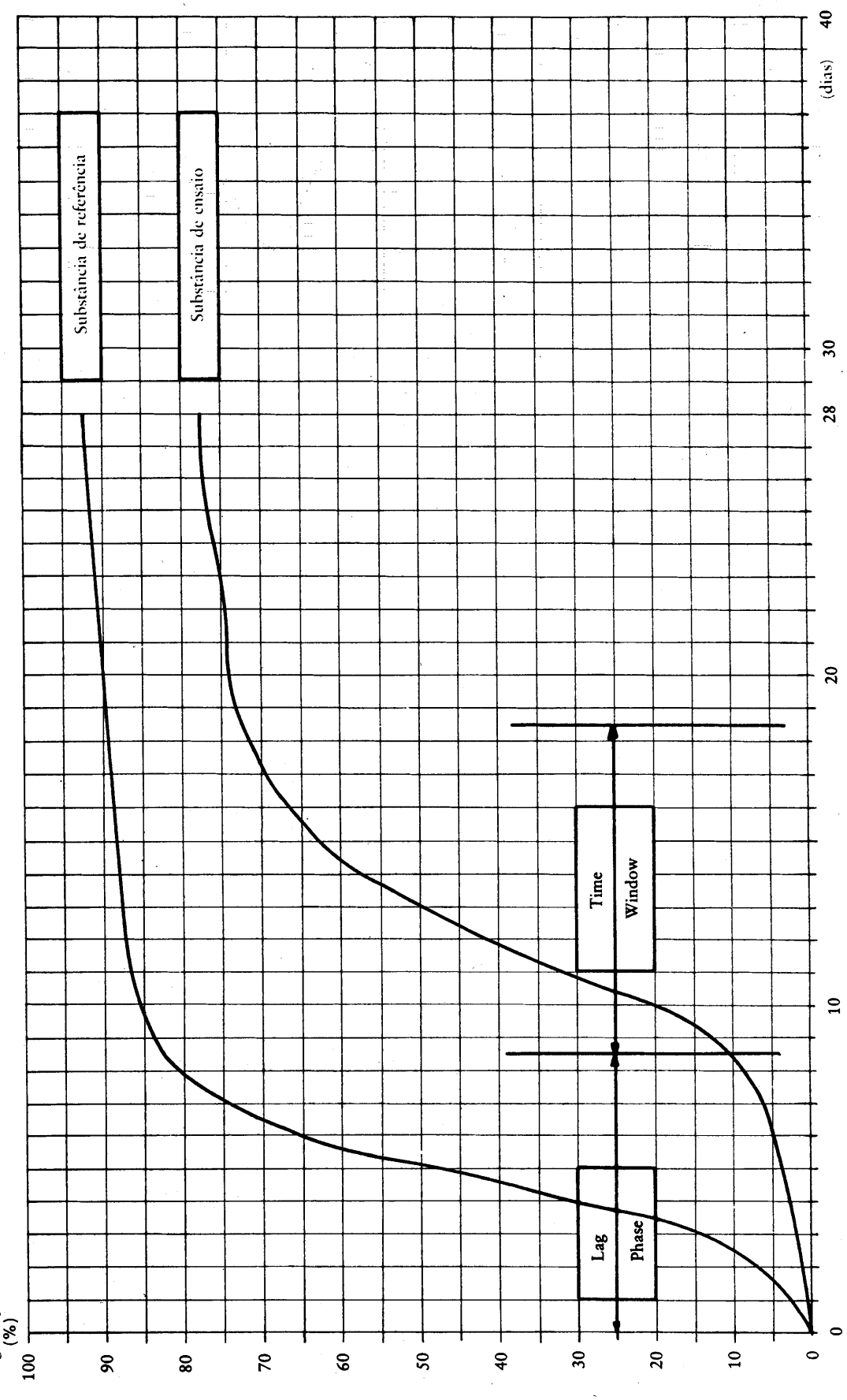
Experiência de referência nº: .....

Observações

Apêndice 4

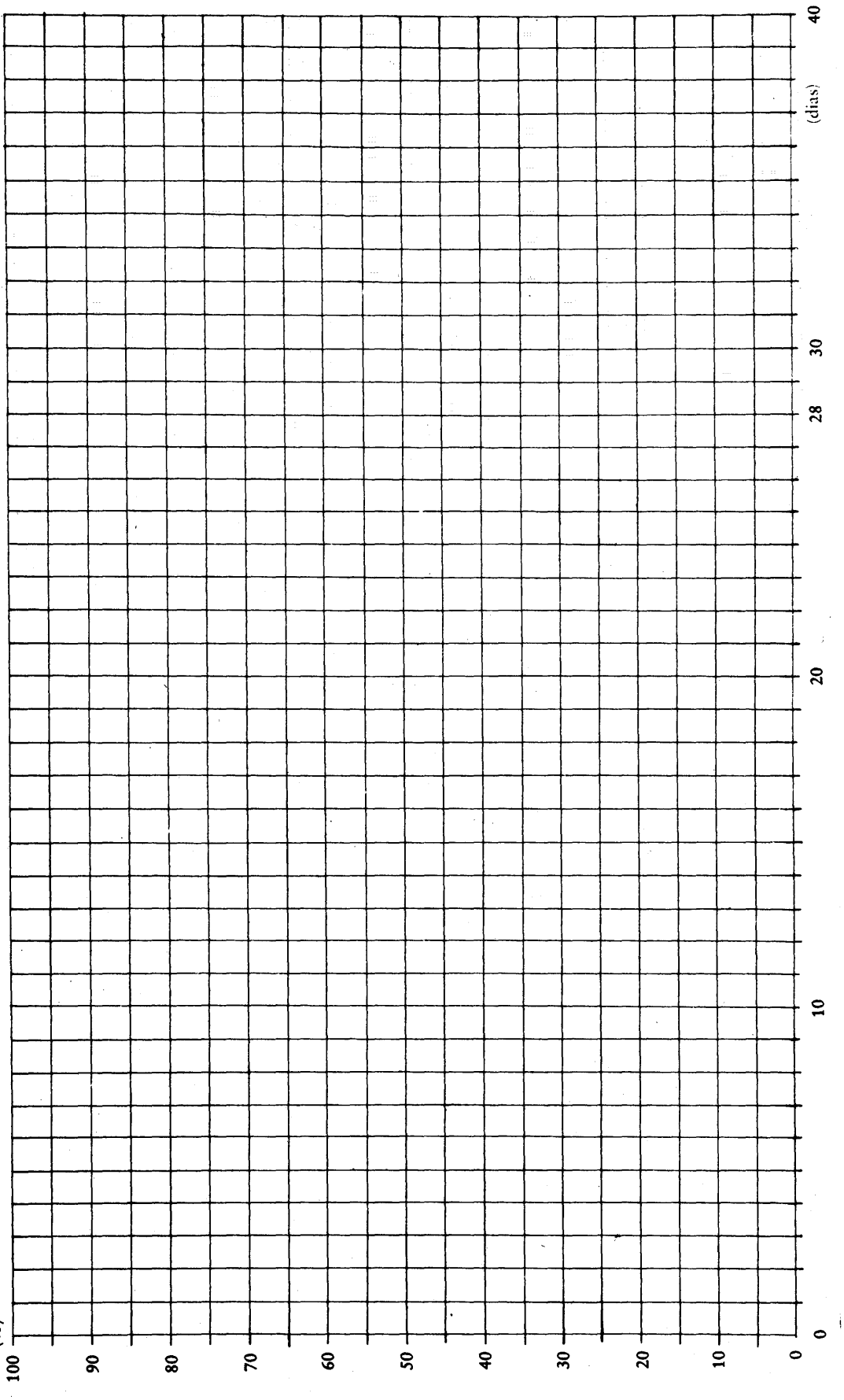
Ensaio MITI alterado

Organismo responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



Ensaio MITI alterado

Organismo responsável pelo ensaio: ..... Substância a ensaiar: ..... Experiência nº: .....



C.8 DEGRADAÇÃO: CARÊNCIA BIOQUÍMICA DE OXIGÉNIO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O método tem por objectivo medir a carência bioquímica de oxigénio (CBO) das substâncias orgânicas, sólidas ou líquidas.

Os dados fornecidas por este ensaio incidem sobre os compostos hidrossolúveis, no entanto, os compostos voláteis e os de fraca hidrossolubilidade podem também ser ensaiados, pelo menos em princípio.

O método é aplicável unicamente às substâncias orgânicas, não inibidoras face às bactérias na concentração utilizada no ensaio. Se a substância não é solúvel à concentração do ensaio, podem ter que ser utilizados processos particulares, tais como o recurso à dispersão ultra-sónica, a fim de se obter uma boa dispersão da substância.

Os dados sobre a toxicidade da substância química podem ser úteis para a interpretação de resultados pouco esclarecedores e para a escolha de concentrações de ensaio adequadas.

1.2. Definição e unidades

A CBO é definida como a massa de oxigénio dissolvida necessária para assegurar em condições definidas a oxidação bioquímica dum certo volume de uma solução da substância submetida ao ensaio.

Os resultados são expressos em gramas de CBO/grama da substância submetida ao ensaio.

1.3. Substância de referência

Não podem ainda ser recomendadas substâncias de referência.

É conveniente a utilização de uma substância química testemunha, para verificar a actividade do inóculo.

1.4. Princípio do método de ensaio

Cultivar com microrganismos e incubar a uma temperatura ambiente constante, definida, na obscuridade, uma quantidade pré-determinada de substância, dissolvida ou dispersa em meio arejado, adequado.

O valor de CBO é determinado pela diferença entre o teor em oxigénio dissolvido no início e no final do ensaio. A duração do ensaio é de pelo menos 5 dias e não excede 28 dias.

Uma testemunha deve ser constituída por um ensaio paralelo não contendo a substância a submeter a ensaio.

1.5. Critérios de qualidade

A determinação da CBO não pode ser considerada como avaliação segura da biodegrabilidade de uma substância e constitui apenas um ensaio de selecção.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparar uma solução ou uma dispersão preliminar da substância, a fim de se obter uma concentração de CBO compatível com o método utilizado. A CBO é então determinada por aplicação de método normalizado, nacional, adequado, mas de preferência seguindo por um método internacional, que ainda está por definir.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

A CBO da solução preliminar é calculada segundo um método normalizado escolhido e convertido em gramas de CBO por grama de substância de ensaio.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Deve ser indicado o método utilizado.

A carência bioquímica de oxigénio deve ser a média de pelo menos três medições válidas.

Todos os dados e observações importantes que ajudem a interpretação dos resultados devem ser referidos, nomeadamente no que diz respeito às impurezas, estado físico, efeitos tóxicos e composição da substância, susceptíveis de afectar os resultados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lista de métodos-padrão, por exemplo:

NF T 90-103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).]

The Determination of biochemical Oxygen Demand, 1981 *(Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London).*

C.9. DEGRADAÇÃO: CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O método tem por objectivo a medição da carência química de oxigénio (CQO) das substâncias orgânicas sólidas ou líquidas, por aplicação de qualquer técnica normalizada, nas condições laboratoriais determinadas.

Os dados disponíveis sobre a fórmula da substância facilitarão a realização deste ensaio e também a interpretação dos resultados obtidos (por exemplo, sais de halogéneo, sais ferrosos de compostos orgânicos, compostos organo-clorados).

1.2. Definições e medidas

A carência química de oxigénio é a medição da oxidabilidade duma substância, definida como a quantidade de oxigénio dum reagente oxidante, consumida pela substância em condições laboratoriais determinadas.

O resultado é expresso em gramas de CQO por grama da substância de ensaio.

1.3. Substâncias de referência

Não é exigida a utilização de substâncias de referência em todos os casos em que se analisa uma nova substância. Aquelas substâncias devem permitir aferir periodicamente o método e facilitar a comparação dos resultados em caso de aplicação de métodos diferentes.

1.4. Princípios do método de ensaio

Uma quantidade determinada de substância a ensaiar, dissolvida ou dispersa na água, é oxidada pelo dicromato de potássio em presença de ácido sulfórico concentrado (sendo o catalisador sulfato de prata), a quente e sob refluxo durante 2 horas. O dicromato residual é determinado por titulação com solução padrão de sulfato ferroso II e amónio.

No caso das substâncias conterem cloro, juntar sulfato mercórico para atenuar a interferência dos cloretos.

1.5. Critérios de qualidade

Em virtude das condições arbitárias de determinação da CQO, este deve ser considerado mais como um « indicador Redox » que como uma avaliação da substância orgânica.

Os cloretos podem interferir durante este ensaio; outras substâncias minerais redutoras ou oxidantes podem igualmente influenciar a determinação da CQO.

Certos compostos cíclicos não são totalmente oxidados neste ensaio.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparar uma solução ou uma dispersão preliminar da substância para se chegar a um valor de CQO de 250 a 600 mg/l.

Observação:

No caso de substâncias pouco solúveis ou não dispersáveis, pesar uma quantidade de substância finamente pulverizada ou no estado líquido, correspondendo a cerca de 5 mg de CQO, e introduzi-la no aparelho da experiência com adição de água.

Determinar em seguida o DQO por aplicação de qualquer método nacional normalizado, adequado, enquanto se espera pela publicação de um método normalizado internacional , ao qual se dará então preferência.

2. AVALIAÇÃO DOS DADOS

Calcular a CQO no frasco experimental, seguindo o método normalizado escolhido, e converter em gramas de CQO por grama da substância de ensaio.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Deve ser indicado o método de referência utilizado.

A carência química de oxigénio será a média de pelo menos três medições. Serão referidos todos os dados e observações que apresentem interesse para a interpretação dos resultados, nomeadamente sobre impurezas, estado físico e propriedades específicas da substância (se conhecidas) susceptíveis de afectar os resultados.

Mencionar o sulfato mercúrico, caso este tenha sido utilizado para reduzir a interferência dos cloretos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Exemplos de métodos normalizados:

NBN T 91-201	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
ISBN O 11 7512494	Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters.
NF T 90-101	Détermination de la demande chimique en oxygène.
DS 217 = Water Analysis	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DIN 38409 - H - 41	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 m/l
NEN 3235 5.3.	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods.

C.10. DEGRADAÇÃO ABIÓTICA: HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DO pH

1. MÉTODO

Este método baseia-se no que está descrito nas «linhas directivas» da OCDE (1).

1.1. Introdução

A hidrólise é uma reacção química importante no controlo da degradação abiótica. Esta reacção é particularmente importante para as substâncias pouco biodegradáveis, e pode influenciar a persistência duma substância no meio ambiente.

A maior parte das reacções de hidrólise são de pseudo-primeira-ordem e, por isso, os «tempos de semivida» são independentes da concentração. Isso permite, habitualmente, extrapolar os resultados obtidos com as concentrações de laboratório, para as condições do meio ambiente.

Além disso, foram citados (2) vários exemplos, mostrando um acordo satisfatório entre os resultados encontrados na água pura e na água natural, e isto para vários tipos de produtos químicos.

É útil, para a realização deste ensaio, dispôr-se de dados preliminares sobre a tensão de vapor da substância.

Este método só é aplicável às substâncias sólidas. As impurezas vão, em geral, influenciar os resultados.

O comportamento hidrolítico das substâncias químicas deve ser estudado para valores do pH habitualmente encontrados no meio ambiente (pH de 4 a 9).

1.2. Definições e unidades

A hidrólise refere-se à reacção de um produto químico RX com a água. Esta reacção pode ser representada por uma troca característica do radical X com OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

A velocidade à qual a concentração de RX decresce é dada pela relação:

$$\text{Velocidade} = K.\,[H_2O] \cdot [RX] \qquad [2]$$

Como a água está em grande excesso em relação à substância química, este tipo de reacção é habitualmente descrito como sendo uma reacção de «pseudo»-primeira ordem, durante a qual a constante de velocidade observada é dada pela relação:

$$K_{obs.} = K.\,[H_2O] \qquad [3]$$

Esta constante pode ser determinada para um dado valor de pH e para uma temperatura T, utilizando a expressão seguinte:

$$K_{obs.} = \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_o}{C_t} \qquad [4]$$

em que,

t = tempo
C_o = concentração da substância no tempo 0
C_t = concentração da subtância no tempo t
2,303 = factor de conversão entre os logaritmos nepérianos e os de base 10.

As concentrações são expressas em g/l ou mole/l.

A unidade da constante $K_{obs.}$ é o (tempo)$^{-1}$.

O « tempo de semivida » $t_{1/2}$ é definido como o tempo necessário para reduzir em 50 % a concentração da substancia química a testar, isto é:

$$C_t = 1/2 \cdot Co \qquad [5]$$

A partir das expressões [4] e [5], demonstra-se que:

$$t_{1/2} = 0{,}693/K_{obs} \quad [6]$$

1.3. **Substâncias de referência**

Não é necessário utilizar substâncias de referência sempre que se estuda uma nova substância. Elas servirão essencialmente para controlar periodicamente a eficácia do método e para permitir a comparação dos resultados obtidos quando é utilizado outro método.

O ácido acetilsalicílico (Aspirina) e o tiofosfato de 0,0-dietil 0-2-isopropil-4-metil-6-pirimidilo (Dimpilato e Diazinão), foram utilizados como referências. (1)

1.4. **Princípio do método**

A substância é dissolvida na água a uma baixa concentração; o pH e a temperatura são controlados.

A diminuição da concentração da substância durante o tempo seguida por qualquer processo analítico adequado.

Os logaritmos das concentrações da substância no decurso do tempo são registados num gráfico, e, se nele aparecer uma recta, a constante de velocidade de primeira ordem pode ser obtida pelo declive desta recta (ver ponto 2).

Quando não é possível determinar de imediato uma constante de velocidade para uma dada temperatura, é normalmente possível fazer a estimativa do valor desta constante, por meio de relação de Arrhenius, que dá a dependência da constante de velocidade em relação à temperatura.

Do gráfico linear do logaritimo da constante de velocidade, tal como é determinada à temperatura adequada, em função do inverso da temperatura absoluta (k), é possível extrapolar o valor da constante de velocidade que não foi obtido no primeiro caso.

1.5. **Critério de qualidade**

A referência (2) refere que medições da constante de velocidade de hidrólise para 13 classes de estruturas orgânicas podem ser de grande precisão.

A repetibilidade depende em particular do controlo do valor do pH, da concentração em oxigénio dissolvido e pode ser influenciada pela presença de microrganismos.

1.6. **Descrição do método**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Soluções-tampão

O teste é efectuado a três valores do pH: 4,0, 7,0 e 9,0.

Com esta finalidade, as soluções-tampão devem ser preparadas utilizando reagentes químicos pró-análise e água destilada ou desionizada estéril.

No apêndice são apresentados alguns exemplos de soluções-tampões.

A solução-tampão utilizada pode influenciar a velocidade de hidrólise; se tal acontecer, deve ser utilizada outra solução-tampão. O uso de tampões borato ou acetato é recomendado na referência (2) em lugar dos fosfatos.

Se o pH das soluções-tampões for desconhecido para a temperatura do ensaio, deve então ser determinado com um aparelho para medir o pH calibrado à temperatura escolhida e com uma precisão de ± 0,1 unidade de pH.

1.6.1.2. Soluções do ensaio

A substância de ensaio deve ser dissolvida num tampão escolhido e a concentração não deve exceder 0,01 M ou metade da concentração da saturação.

A utilização de solventes orgânicos miscíveis na água só é recomendada para subtâncias de fraca solubilidade na água. A quantidade do solvente deve ser inferior a 1 % e não deve interferir com o processo hidrolítico.

1.6.2. *Aparelhagem*

Devem ser utilizados frascos de vidro com rolha esmerilada, mas deve-se evitar a utilização de gordura no esmeril.

Se a substância ou o tampão forem voláteis, ou o ensaio for conduzido a temperaturas elevadas, devem preferir-se tubos selados ou fechados que são cheios tão completamente quanto possível.

1.6.3. *Método analítico*

O método analítico dependerá da natureza da substância a ensaiar e será suficientemente sensível e específico para determinar uma diminuição de 10 % da concentração inicial.

O método deve ser específico para permitir a determinação da substância de ensaio nas concentrações utilizadas durante o ensaio, e pode consistir na combinação de alguns métodos analíticos adequados.

1.6.4. *Condições do ensaio*

Os ensaios serão realizados utilizando um equipamento com controlo da temperatura ou um banho à temperatura constante estabelecida a ± 0,5 °C da temperatura escolhida. A temperatura será mantida e medida a ± 0,1 °C. Devem ser evitadas as interferências fotolíticas por meios adequados.

Devem ser tomadas todas as precauções para eliminar o oxigénio dissolvido (por exemplo, fazendo borbulhar azoto ou argon durante 5 minutos antes de preparar as soluções).

1.6.5. *Processo do ensaio*

1.6.5.1. Teste preliminar

Deve ser feito, para todas as substâncias, um ensaio preliminar a 50 °C ± 0,5 °C, com 3 valores do pH: 4,0, 7,0 e 9,0.

Realiza-se um número de medições suficientes, de forma a poder fazer-se uma estimativa se, para cada valor do pH e a 50 °C o tempo de semivida ($t_{1/2}$) é inferior a 24 h ou se se observa menos de 10 % da hidrólise após 5 dias. [Pode estimar-se que estes valores correspodem respectivamente a tempos de semivida inferiores a 1 dia ou superiores a 1 ano em condições mais representativas que o meio ambiente (25 °C)].

Se o teste preliminar demonstrar que 50 % ou mais da substância de ensaio foi hidrolizada em 24 h a 50 °C ou que menos de 10 % foi hidrolizada após 5 dias para cada valor de pH (4, 7 e 9), é inútil prosseguir os ensaios.

Noutros casos, e para os valores do pH para os quais estas condições não foram satisfeitas, deve ser efectuado o ensaio nº 1.

1.6.5.2. Ensaio nº 1

O ensaio nº 1 é conduzido a uma temperatura, de preferência a 50 °C ± 0,5 °C, se possível em condições estéreis e com os valores do pH para os quais os ensaios preliminares mostraram a necessidade de ensaios suplementares.

Um número suficiente de amostras (não menos de 4) devem ser escolhidos a fim de cobrir um intervalo de 20 a 70 % de hidrólise para a determinação do comportamento de *pseudo*-primeira ordem com os valores de pH específicos.

Para cada valor do pH para o qual o ensaio nº 1 foi efectuado, é determinada a ordem da reacção.

Estimativa da constante de velocidade a 25 °C:

A decisão duma escolha sobre o processo experimental depende da possibilidade de se concluir do ensaio nº 1 se a reacção é ou não de *pseudo*-primeira ordem.

Se não for possível determinar com exactidão durante o ensaio nº 1 se a reacção é de *pseudo*-primeira ordem, as experiências devem prosseguir, tal como foram descritas para o ensaio nº 2.

Se a determinação da *pseudo*-primeira ordem do ensaio nº 1 for de confiança, as experiências devem prosseguir segundo a descrição do ensaio nº 3 [ou melhor, é possível, em certas circunstâncias, calcular a constante de velocidade a 25 °C, com base nas constantes determinadas a 50 °C, calculadas utilizando os resultados do ensaio nº 1 (ponto 3.2)].

1.6.5.3. Ensaio nº 2

Este ensaio é efectuado para cada valor do pH, para o qual foi provado no ensaio nº 1 que era necessário prosseguir as experiências:

— quer a uma temperatura, escolhida e inferior a 40 °C,

— quer a duas temperaturas, acima de 50 °C, afastadas entre si pelo menos 10 °C.

Para cada valor de pH e temperatura para os quais o ensaio nº2 é efectuado, são medidos pelo menos seis pontos espaçados de forma adequadas de tal modo que as percentagens de hidrólise se situem no intervalo de 20 a 70 %.

Para cada valor de pH e temperatura, é efectuada uma dupla determinação. Quando o ensaio nº 2 é realizado a duas temperaturas acima de 50 °C, a dupla determinação é de preferência efectuada à mais baixa das duas temperaturas.

Para cada valor de pH e temperatura para os quais o ensaio nº 2 é efectuado, será dada uma estimativa gráfica do tempo de semivida ($t_{1/2}$), desde que tal seja possível.

1.6.5.4. Ensaio nº 3

Este ensaio é efectuado para cada valor do pH para o qual os resultados do ensaio nº 1 mostraram a necessidade de o realizar:

— quer a uma temperatura, escolhida e inferior a 40 °C,

— ou a duas temperaturas acima de 50 °C, distanciadas entre si de pelo menos 10 °C

Para cada valor de pH e temperatura para os quais o ensaio nº 3 é efectuado, são escolhidos 3 pontos de determinação: o primeiro no tempo 0 e segundo e terceiro quando as percentagens de hidrólise são superiores a 30 % ; a constante $K_{obs.}$ e $t_{1/2}$ devem ser calculadas.

2. DADOS

No caso de um comportamento de *pseudo*-primeira ordem os valores de $K_{obs.}$ para cada valor de pH e de temperatura dos ensaios, podem ser obtidos do gráfico dos logaritimos das concentrações em função do tempo, utilizando a expressão:

$$K_{obs} = - \text{declive} \times 2{,}303$$

Além dissso $t_{1/2}$ pode ser calculado pela equação [6].

Quando adequado, fazer a estimativa de $K_{25\,°C}$ por aplicação da equação de Arrhenius.

No caso em que o comportamento não é de *pseudo*-primeira ordem, ver o ponto 3.1.

3. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

— especificações da substância ensaiada,

— qualquer resultado obtido com substâncias de referência,

— o princípio e a descrição completa do método analítico utilizado,

— para cada ensaio: as temperaturas, o valor do pH, a composição do tampão e o quadro dos pontos experimentais concentrações/tempo,

— no caso das reacções de *pseudo*-primeira ordem, os valores de $K_{obs.}$ de $t_{1/2}$ e respectivos métodos de cálculo,

— no caso de uma reacção que não é de *pseudo*-primeira ordem, estabelecer o gráfico dos logarítmos das concentrações em função dos tempos,

— qualquer informação e observação necessárias para as interpretações dos resultados.

3.2. **Interpretação dos resultados**

É por vezes possível calcular valores aceitáveis da constante de velocidade (a 25 °C) da substância de ensaio, na condição dos valores da energia de activação para os homólogos da substância química já existirem e desde que possa ser razoavelmente estabelecido que a energia de activação da substância de ensaio é da mesma ordem de grandeza.

4 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test guideline 111* — Décision du Conseil C(81)30 F.

(2) OCDE, Paris, 1981, *Test guideline 111* — Décision du Conseil C(81)30 F — référence (2).

Apêndice

Misturas tampão

A. CLARK E LUBS

Os valores do pH indicados a seguir foram calculados a partir de medições potenciais utilizando as equações padrão de Sörensen (1909).

Os valores reais do pH são superiores a estes em 0,04 unidades.

Composição	*pH*
Hidrogenoftalato de potássio 0,1 M + HCl 0,1 N a 20 °C	
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml ftalato, completar até 100 ml	3,8
Hidrogenoftalato de potássio 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de ftalato, completar até 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de ftalato, completar até 100 ml	4,2
Fosfato monopotássico 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C	
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de fosfato, completar até 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de fosfato, completar até 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de fosfato, completar até 100 ml	7,2
H_3BO_3 0,1 M em KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C	
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico, completar até 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico, completar até 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico, completar até 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF E VLEESCHOUWER

Composição	*pH*
Citrato monopotássico 0,1 M e NaOH 0,1 N a 18 °C (juntar um cristal minúsculo de timol ou alguns miligramas de iodeto mercúrico para evitar o crescimento de bolor)	
2,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de citrato, completar até 100 ml	3,8
9,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de citrato, completar até 100 ml	4,0
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de citrato, completar até 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Composição		pH			
ml de borato de sódio	ml HCl	Sörensen 18°C	Walbum		
			10°C	40°C	70°C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Composição		pH			
ml de borato de sódio	ml NaOH	Sörensen 18°C	Walbum		
			10°C	40°C	70°C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12