

Desenvolvimento de critérios para avaliação do Potencial de Periculosidade ao Ambiente (PPA) de agentes químicos diversos

Elza Yuriko Onishi Bastian (1)

Fausto Antonio de Azevedo (2) Neemias de Castro (3)

Rodrigo Cesar de Araújo Cunha (4)

Kátia Maria Diniz (5)

INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias químicas, virtualmente em todos os aspectos da vida, tem-se intensificado aceleradamente nos últimos decênios e o comércio internacional de substâncias químicas a granel, especialidades químicas e produtos de consumo tem-se acrescentado proporcionalmente, dando um caráter imperativo à necessidade de uma análise e uma reavaliação constantes dos procedimentos para determinar sua inocuidade (OMS, 1980).

Em 1976 calculava-se que cerca de 600 mil produtos químicos industriais tóxicos eram utilizados em diversas regiões do mundo e o Instituto Nacional de Segurança e Higiene do Trabalho dos Estados Unidos calculava que eram produzidos mais de 30 mil produtos químicos/ano (Crônica de la OMS, 30: 344-351, 1976).

Segundo Craig & Enslein (1981) a estimativa era de existirem seis a oito milhões de substâncias químicas. No final de 1979, o CAS-Chemical Abstracts Service (um departamento da American Chemical Society) já tinha registrado mais 4.800 mil produtos químicos em uso e novas substâncias eram introduzidas no mercado, na faixa de 400 mil/ano.

Milhares de substâncias químicas estão catalogadas na ONU-Organização das Nações Unidas, de acordo com a sua classe de periculosidade. As classificações dependem das características físicas e químicas das substâncias. Para efeito de transporte de cargas perigosas, no Brasil, as substâncias estão agrupadas, segundo a norma NBR-7502 da ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas em nove categorias.

O aumento de volume e de diversidade de produtos químicos que estão sendo manufaturados, comercializados, armazenados, transportados ou despejados, leva a uma probabilidade crescente e significativa de acidentes que envolvem o escape de produtos químico-

cos potencialmente tóxicos. Portanto, não é surpreendente que um crescimento exponencial no número de acidentes químicos esteja sendo documentado (OMS, 1984).

Alguns, como o com as dioxinas, através de ocorrências repentinas; outros, como o Kepone (inseticida organoclorado) ou o mercúrio de indústrias alcali-cloro, através de descargas crônicas; e até outros, incluindo o DDT, que são utilizados propositalmente pelo homem.

A presença de inúmeros tipos de praguicidas vem causando preocupação frequente, tendo sido encontrados valores elevados em águas de rios e represas em todos os países. No Brasil, cerca de quatro mil formulações e 300 ingredientes ativos de praguicidas são autorizadas para uso em atividades agrícolas.

Outro assunto de grande polêmica e preocupação foi o caso das bifenilas policloradas (PCBs), que foram introduzidas pelas indústrias químicas em 1929 para serem usadas em um largo sortimento de aplicações de engenharia e técnica, particularmente em transformadores elétricos. Em meados de 1960, biólogos descobriram que tais produtos químicos eram bioacumulativos em águas e outros animais rústicos. Os praguicidas organoclorados, também acumulativos e biomagnificantes em animais rústicos, eram às vezes confundidos com PCBs, e ambos trouxeram sérias ameaças, para o homem e seu ambiente. A produção, comercialização e manuseio de PCBs e organoclorados estão proibidos nos Estados Unidos e em outros países, mas grandes quantidades desses produtos químicos tóxicos ainda estão presentes em solos, lodos e águas — (Weber et alii, 1981).

A toxicologia demonstra e nos ensina que toda substância química apresenta algum nível de toxicidade para os seres vivos, sendo, portanto, potencialmente capaz de produzir dano. Não há substância química desprovida de poder tóxico. O que existe, isto sim, são condições mais ou menos seguras — do ponto de vista de risco à saúde — de se utilizar um agente químico. Assim posto, para se definir critérios de segurança para o uso de substâncias (os quais envolvem considerações

técnicas e legais), bem como para se instrumentar as atividades de avaliação de impactos ambientais determinados por agentes químicos, faz-se mister a posse de algum conhecimento da toxicidade (a curto, a médio e a longo prazos) destes agentes, além de alguns conceitos básicos de perigo, risco e segurança.

Em um sentido geral poder-se-ia dizer que a toxicidade de uma substância é a sua capacidade para causar lesão em um organismo vivo. Uma substância muito tóxica causará danos a um organismo se for administrada em quantidades muito pequenas; uma substância de baixa toxicidade só produzirá efeito quando a quantidade administrada for muito grande. Em consequência, não se pode definir toxicidade sem fazer referência à quantidade da substância administrada ou absorvida (dose), a via de administração dessa quantidade (por exemplo, inalação, ingestão ou injeção) e sua distribuição no tempo (ou seja, dose única ou doses repetidas), o tipo e a gravidade da lesão, e o tempo necessário para produzi-la.

Ainda não existe uma definição geral aceita de "perigo" vinculado com uma substância química. O termo se usa para indicar a probabilidade de que uma substância química cause um efeito adverso sobre a saúde (lesão), em condições nas quais se a produz ou utiliza (OMS, 1980).

A Comisión Preparatoria de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano, definiu "risco" como uma frequência esperada de efeitos indesejáveis derivados da exposição a um contaminante. As estimações de risco podem ser expressas em termos absolutos ou relativos. O risco absoluto é o risco excessivo devido à exposição. O risco relativo é a relação entre o risco na população exposta e o risco na população sem exposição ao agente químico.

Segurança é um termo que se tem usado com frequência, ainda que seja difícil defini-lo. Pode-se entender "segurança" com a certidão prática de que uma substância não produzirá lesão quando utilizada na quantidade e na forma propostas para seu uso. Esta colocação segundo a OMS (1980), de pouco serve, se não se define asso-

(1) Elza Yuriko Onishi Bastian - Eng. Química
(2) Fausto Antonio de Azevedo - Farm. Bioquímico
(3) Neemias de Castro - Biomédico
(4) Rodrigo Cesar de Araújo Cunha - Eng. Agrônomo
(5) Kátia Maria Diniz - Acadêmica de Farmácia e Bioquímica
— Todos da Gerência de Ecodesenvolvimento da Diretoria de Pesquisa da Cetesb.

ciativamente, de alguma maneira, a "certidão prática", por exemplo, em termos de um risco reduzido numericamente especificado. Outra tese é que a "segurança" deve ser julgada em termos de riscos socialmente "aceitáveis". Estes conceitos, ainda que escapem fundamentalmente ao âmbito da avaliação científica, requerem uma avaliação tanto das probabilidades (ou seja, das frequências esperadas) dos diversos efeitos adversos, como de sua gravidade em termos de saúde humana ou ambiental (OMS, 1980).

O objetivo precípuo desse estudo foi o de fazer a seleção e o estabelecimento de critérios de avaliação da periculosidade para o ser humano e para o ambiente geral, de agentes químicos diversos. Preocupou-se, inicialmente, com a periculosidade apresentada pelo conjunto dos produtos enquadrados como agrotóxicos ou praguicidas. Em suma, visou-se fixar as bases de um sistema racional e científico de avaliação do Potencial de Periculosidade de ao Ambiente de alguns agentes químicos.

Para o futuro pretende-se estender esta avaliação a toda e qualquer categoria de substâncias químicas, desenvolvendo-se critérios de estimativa tanto da periculosidade aguda (ou a curto prazo), quanto da crônica (ou a longo prazo). Também em etapa posterior intenta-se fazer a padronização, a nível laboratorial, das metodologias analíticas aqui reunidas e discutidas.

SELEÇÃO DOS CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PERICULOSIDADE AO AMBIENTE DOS PRAGUICIDAS

Vários processos e fatores estão envolvidos na dissipação dos praguicidas no ambiente. Incluem-se os processos de degradação, tais como a decomposição química; fotoquímica e biológica, e processos de transferência como a absorção, a transpiração, a retenção e a acumulação através dos organismos, a adsorção pelos colóides do solo e outras superfícies, e o movimento nas fases de vapor, líquida e sólida através da atmosfera, solo e água (Fig. 1).

Esses processos de degradação e de transferência são dependentes de fatores edáficos, tais como os tipos e quantidades de colóides presentes no solo, pH, umidade e temperatura do solo, tipos e número de organismos no solo, nível de nutrientes, e de fatores climáticos como a temperatura,

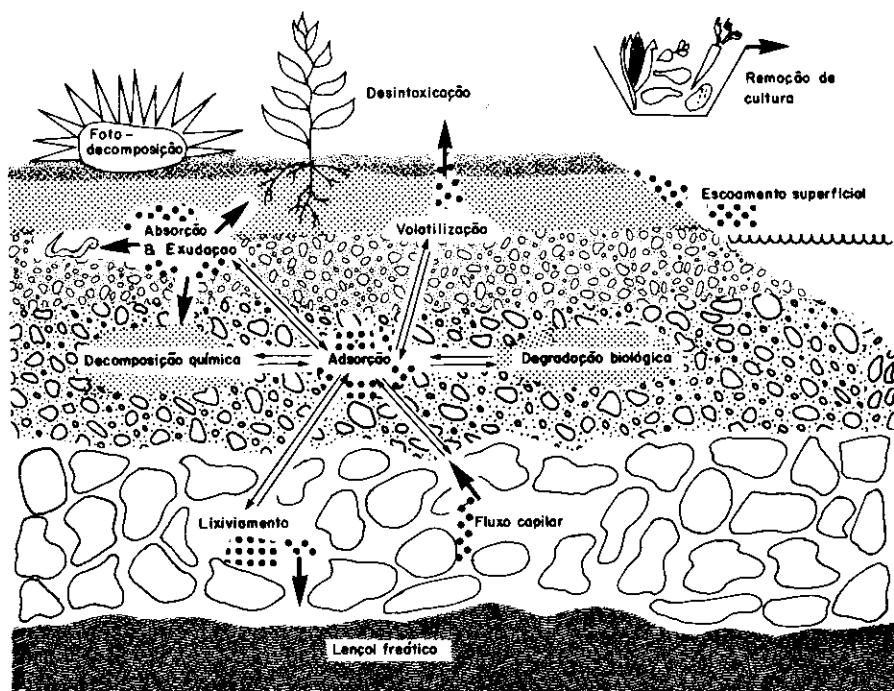


Figura 1 — Processos influenciando no comportamento e destino dos praguicidas no ambiente

a umidade, a intensidade das chuvas, duração e ocorrência, e a qualidade e intensidade de radiação (Weber, 1975).

Mas, em essência, para se avaliar um praguicida quanto ao seu Potencial de Periculosidade ao Ambiente, tem-se que considerar e pesquisar quatro fatores, ou propriedades-chave: toxicidade, mobilidade, persistência e bioacumulação, os quais radiografam a substância química, principalmente o praguicida, na sua capacidade de produzir danos à saúde do meio ambiente e também do ser humano.

A toxicidade, que foi definida como a capacidade de um agente químico causar uma lesão num organismo vivo, pode ser avaliada a curto e a longo prazos para microrganismos, para organismos aquáticos, organismos dos solos e animais superiores.

A mobilidade é a capacidade que a substância apresenta de se movimentar no solo, ou dele sair para as águas. Depende da sua hidrossolubilidade, da sua ionizabilidade e da sua adsorvidade aos colóides do solo.

A persistência, ou longevidade, depende da relativa susceptibilidade e à acessibilidade da degradação biológica, química ou fotoquímica. Geralmente é expressa em termos de controle de duração ou valores de meia-vida, os quais significam o tempo necessário para que a concentração do agente químico na matriz considerada se reduza à metade.

A bioacumulação, ou fator de acumulação, é o fenômeno da acumulação de uma substância química num organismo. É avaliada pela concentração da substância encontrada no organismo em relação à concentração da mes-

ma encontrada no ambiente (Weber, 1975).

É importante observar que ao fenômeno de concentração de um agente tóxico numa cadeia alimentar em quantidades distintas e crescentes dá-se o nome de biomagnificação. Portanto, numa primeira etapa de trabalho, estudaremos o fenômeno de acumulação, podendo futuramente ser aprimorado para estudos do fenômeno de biomagnificação.

ESCOLHA E DESCRIÇÃO DE METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, MOBILIDADE, PERSISTÊNCIA E BIOACUMULAÇÃO

Toxicidade

Toxicidade a curto e a longo prazos para microrganismos

Na área de Microbiologia da Cetesb já se encontram implantadas e em utilização normal algumas metodologias de avaliação da toxicidade de agentes químicos a microrganismos.

Assim, a toxicidade aguda (ou a curto prazo) é determinada através dos quais se empregam bactérias *Spirillum volutans*, segundo o método descrito por Bowdre & Krieg (1974) e modificado por Dutka & Skwan (1982). O princípio do teste baseia-se no fato de essas bactérias, que são extremamente móveis, perderem sua motilidade ou

coordenação flagelar frente a substâncias químicas tóxicas. O procedimento do teste consiste em juntar volumes definidos de uma cultura "over night" de *Spirillum volutans* com a amostra ou diluição da amostra a ser testada e fazer leituras diretas em microscópio de campo escuro nos intervalos de tempo de 0,5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Em paralelo, são feitos controles positivos e negativos.

A medida da toxicidade é dada em MEC₉₀, que corresponde à concentração mínima efetiva capaz de imobilizar 90% das bactérias presentes.

A toxicidade crônica (ou a longo prazo) é pesquisada através da detecção da capacidade mutagênica das substâncias químicas frente a cepas especiais de bactérias utilizando-se o Teste de Ames, segundo o método descrito por Ames et alii (1975).

As amostras são testadas frente a cepas de *Salmonella typhimurium* (TA'100 TA'98 TA 1535 e TA 1538) dependentes da histidina, com e sem ativador enzimático (S₁₀) extrato de fígado de rato.

Paralelamente são realizados controles positivos com substâncias comprovadamente mutagênicas (2 acetilaminofluorene ou azida sódica).

Toxicidade a curto prazo para organismos aquáticos

Algumas metodologias para pesquisa deste parâmetro também estão padronizadas e em utilização rotineira pelo Laboratório de Ensaios Biológicos da Cetesb.

A toxicidade a curto prazo, ou seja, o efeito agudo de substâncias tóxicas a organismos aquáticos pode ser expressa em termos de CL₅₀ ou CE₅₀. A primeira refere-se à concentração do agente tóxico na água que causa a letalidade a 50% dos organismos em curto tempo de exposição. A segunda refere-se à concentração efetiva do agente tóxico na água, capaz de causar um efeito deletério em 50% dos organismos em curto tempo de exposição, que não a letalidade, como, por exemplo, a imobilidade.

Os métodos de análise utilizados são os propostos por organizações internacionais de padronização.

Avaliação da toxicidade a curto prazo para *Daphnia* sp., um microcrustáceo de água doce.

O método utilizado é basicamente o descrito pela Norma ISO (1982) com algumas modificações tais como o organismo-teste (*Daphnia similis*, Claus, 1976) e água de diluição (água mole ASTM; dureza total em CaCO₃, 40-48 mg/l).

Tal procedimento e outras condições específicas permitem avaliar a concentração inicial efetiva (concentração do agente tóxico no início do teste) que em 24 horas imobiliza 50% dos organis-

mos. Esta concentração é expressa como CE(I) 50-24 h.

Avaliação da toxicidade a curto prazo para peixes.

Este teste é baseado no método ISO/DIS 7346/3 (1982), que consiste na exposição de uma espécie de peixe (*Poecilia reticulata*, *Cheirodon notomela* ou *Hemigrammus marginatus*) frente a várias concentrações de um agente tóxico, preparado com água sintética (água mole ASTM; dureza total em CaCO₃, 40-48 mg/l).

Tal procedimento e outras condições específicas permitem avaliar a concentração inicial (medida ou calculada no início do teste) de uma substância ou de uma mistura (efluentes industriais ou formulações), letal a 50% dos peixes durante 96 horas de exposição. Esta concentração é expressa como CL (I) 50-96 h.

Avaliação da toxicidade de substâncias químicas no crescimento de culturas algáceas.

Este teste é baseado no método da OECD (1980) modificado por Lee (1982) que consiste na exposição de uma cultura axênica de *Chlorella vulgaris* a várias concentrações de uma substância ou produto químico.

O teste permite estimar a CE₅₀, definida como a concentração de uma substância ou produto que causa inibição de 50% da biomassa algácea em relação ao controle, num período de 72 horas de exposição. Em geral, o experimento prossegue após este período (sete a dez dias adicionais) a fim de se determinar a concentração não efetiva, isto é, a concentração mais elevada do agente tóxico que não altera o crescimento celular, e para verificar se a substância-teste exerce um efeito algicida ou algistático.

Todas as modificações das metodologias originais citadas e os detalhamentos dos métodos acima referidos são descritos nos Procedimentos Operacionais Padronizados que constam do relatório técnico de atividades do Laboratório de Bioensaios, da Cetesb — (Cetesb, 1983).

Toxicidade a curto prazo para roedores.

A toxicidade a curto prazo para animais superiores ou roedores pode ser pesquisada determinando-se a dose letal para 50% — DL₅₀ — dos animais de um lote de ratos (Rato Wistar), para as vias de exposição oral e intravenosa. Entende-se por DL₅₀ uma expressão estatisticamente obtida e correspondente à dose única da substância que, previsivelmente, matará 50% dos animais no período de até 24 h após a administração. A DL₅₀ poderá ser obtida por um dos seguintes métodos: método gráfico segundo Litchfield & Wilcoxon (1949); método do papel quadriculado do proibito logá-

rico segundo Miller & Tainter (1944); método das médias móveis segundo Thompson (1947) e Weil & McCollister (1963); ou outro método equivalente e comparável.

Mobilidade

O movimento de resíduos de praguicidas, por meio do lixiviamento através do perfil do solo ou do transporte e da dispersão no ambiente aquático, pode causar contaminação do alimento, resultar na perda de terras utilizáveis e recursos d'água para o homem, contaminar o suprimento das águas subterrâneas, ou ainda destruir a habitação da vida selvagem (EPA, 1982).

Segundo Anderson et alii (1968), a extensão na qual um praguicida (especificamente um herbicida) é movido pela água é governada principalmente pela afinidade adsorviva entre o praguicida e o solo, a solubilidade do praguicida na água e a quantidade de água passando através do solo. Uma correlação inversa tem sido demonstrada entre a adsorção e a solubilidade em água de alguns herbicidas. Alguns herbicidas solúveis em água reagem com vários constituintes do solo para formar compostos que são relativamente insolúveis; estas moléculas podem resistir ao lixiviamento e tornarem-se imóveis no solo. Os praguicidas podem se mover em várias direções no solo dependendo do fluxo d'água. O conteúdo de matéria orgânica do solo é o mais importante fator que afeta a adsorção dos herbicidas.

Swoboda & Thomas (1968) realizaram um estudo de lixiviação utilizando colunas de solo, com um inseticida organofosforado e concluíram que o movimento dos praguicidas no solo depende da quantidade de água que move através dele e do grau de adsorção do praguicida no solo. É relatado em seu estudo que a maioria dos dados de movimento dos praguicidas em solo tem sido obtida usando herbicidas. Os dados limitados sobre o movimento de inseticidas em solo têm sido divulgados com compostos do tipo organoclorado. Pouca informação sobre o movimento de inseticidas organofosforados em solo está disponível na literatura. Os inseticidas organofosforados geralmente são muito mais solúveis em água que os compostos organoclorados. Isso poderia indicar que eles são muito mais susceptíveis ao lixiviamento que os compostos clorados. Reynolds & Metcalf (1962) encontraram que o movimento de vários inseticidas organofosforados sistêmicos era diretamente relacionado com sua solubilidade em água.

Existem controvérsias em estudos realizados por diferentes autores na literatura. É dito que o praguicida Parathion é geralmente considerado não

persistente em solo. Carlo et alii (1952) relatam que o Parathion não era detectável em um solo, 16 dias após a aplicação. Entretanto, Nicholson et alii (1962) encontraram que o Parathion estava ainda presente em solos do tipo "Appling" e "Cecil", nove meses após a última aplicação (Swoboda & Thomas, 1968).

Portanto, estudos devem ser realizados no sentido de aclarar as dúvidas existentes quanto aos dados encontrados na literatura.

Para tanto, a Environmental Protection Agency (EPA, 1982) sugere metodologias a serem seguidas para a avaliação dos estudos de mobilidade, os quais dão suporte, quando requeridos, para o registro de um produto de uso final, especificamente um praguicida.

As metodologias indicadas são as técnicas analíticas utilizando radioisótopos, as quais são preferidas, onde estudos deverão ser conduzidos com cada ingrediente ativo do produto e, métodos analíticos como estudo em cromatografia de camada delgada para solo (TLC), estudo em colunas de solo e estudo de adsorção/desorção, que deverão ser conduzidos com o ingrediente ativo do produto.

Os estudos em cromatografia de camada delgada para solo (TLC), para a determinação do potencial de lixiviação de praguicidas e seus metabólitos em solo, são realizados preparando-se as placas TLC com solos anteriormente caracterizados onde são aplicadas as substâncias-teste, usando como referência um praguicida padrão com o comportamento de lixiviação já conhecido.

A avaliação dos dados de mobilidade dos praguicidas e seus metabólitos realizados segundo os critérios estabelecidos pela EPA, classificam-se em categorias de mobilidade dependendo dos valores de R_f encontrados.

O termo R_f, literalmente, significa "relação de frentes" e é usado para exprimir a distância relativa que a substância tem percorrido (Edwards, 1975).

Os valores da relação solo/água (K_d) devem ser relatados usando valores de R_f apropriados para as equações K_d/R_f. A EPA, por ocasião do registro, solicita o fornecimento das equações utilizadas na determinação dos valores de K_d.

Os estudos em coluna de solo para definir a distribuição vertical da subs-

tância-teste e seus metabólitos no perfil do solo, podem ser realizados utilizando-se colunas de 30 a 300 cm de altura, constituídas de solos anteriormente caracterizados e poderão ser irrigados com um volume de água igual a 50.8 cm vezes a área da secção transversal da coluna. Este valor baseia-se nos valores de recarga das águas subterrâneas. Uma curva de distribuição da substância-teste na coluna pode ser determinada por quantificação da substância e seus metabólitos em segmentos de 6 cm da coluna e no percolado.

Os valores da relação solo/água (K_d) devem ser relatados para a substância-teste e seus metabólitos usando equações apropriadas. A EPA, para efeito de registro, solicita que sejam fornecidos os cálculos usados na determinação dos valores de K_d.

Para os estudos de adsorção/desorção, os coeficientes adsorção/desorção calculados são usados juntamente com os dados de solubilidade para prognosticar a extensão ou profundidade de lixiviação do praguicida em diferentes tipos de solo testados, e também a extensão de adsorção/desorção dos praguicidas em sedimentos aquáticos quando propostos. O estudo é conduzido usando solos caracterizados, mais um sedimento aquático representativo (quando proposto o uso envolvendo descarga direta em ambientes aquáticos).

Os dados de adsorção/desorção devem ser relatados com as concentrações da substância-teste incluindo seus metabólitos, a partição entre solo e água calculados como valores de K_d, usando equações apropriadas.

A EPA sugere as metodologias acima descritas e acredita que isto pode dar aos requerentes a escolha de quais técnicas usar para determinar o lixiviação e ainda obter dados adequados para avaliação da mobilidade dos praguicidas. Considera que provavelmente, do ponto de vista econômico, é mais eficiente prevenir a contaminação da água subterrânea do que remover seus poluentes. Portanto, como parte da avaliação do destino ambiental do praguicida, a EPA irá avaliar o seu potencial de contaminação para a água subterrânea.

A metodologia a ser desenvolvida nesta primeira etapa do trabalho será o método analítico laboratorial utili-

zando-se colunas de solo, descrito anteriormente, e estudos de mobilidade em campo usando extratores de solução do solo.

Os estudos em campo serão realizados instalando-se tensiômetros e extratores em solos, onde já se tenha caracterizado suas principais propriedades físicas e químicas, entre elas sua curva de característica e a condutividade hidráulica. A partir dos valores de umidade observados, ao lado das concentrações do produto nas diferentes profundidades, tornar-se-á possível determinar para esse determinado solo a mobilidade do produto em questão.

Persistência

Após o seu lançamento no meio ambiente, um praguicida segue uma ou várias destas vias: volatilização, lixiviação, degradação e/ou reações de transformação (química, fotoquímica e/ou biológica), carregamento pelas enxurradas atingindo rios, lagos e oceanos, retenção nos solos na forma de resíduos fixos etc. Todas essas possibilidades de reações devem ser consideradas para se avaliar o grau de persistência global de praguicida no meio ambiente (Jury et alii, 1983).

A biodegradação é, frequentemente, a principal via de eliminação de compostos orgânicos do meio ambiente e, portanto, o estudo da persistência de praguicidas, quase sempre, dá mais peso a este parâmetro.

Os estudos de persistência de praguicidas no meio ambiente, nesta etapa do trabalho, serão iniciados com o estudo da degradação dos mesmos, com ênfase na biodegradação.

Por definição, biodegradação é a destruição de um composto orgânico qualquer pela ação de microrganismos.

Do ponto de vista ambientalista a biodegradação pode ser definida em três níveis principais (Swisher, 1970 & Cetesb, 1980).

a) biodegradação primária: que é a simples perda da identidade química original do composto em estudo;

b) biodegradação ecologicamente aceitável: é a degradação numa extensão tal que o composto não mais apresenta suas propriedades ambientalmente indesejáveis, principalmente ecotoxicidade, cor, odor, capacidade de formar espumas etc., e;

c) biodegradação total: que é a completa conversão do composto orgânico a CO₂, H₂O, sais inorgânicos, biomassa e metabólitos normais dos microrganismos.

A biodegradação primária é a evidenciada pelo uso de métodos que apenas possibilitam a quantificação do

Valor de R _f	Categoria de Mobilidade	Classe
0,0 a 0,09	imóvel	1
0,10 a 0,34	pouco móvel	2
0,35 a 0,64	moderadamente móvel	3
0,65 a 0,89	móvel	4
0,90 a 1,0	muito móvel	5

composto em sua forma original, não quantificando os seus subprodutos de degradação. Assim ocorre com o emprego de métodos químicos específicos e com o emprego de cromatografia em fase gasosa (GC), cromatografia em camada delgada (TLC) etc.

A determinação da biodegradação ecologicamente aceitável baseia-se nos resultados de bioensaios de ecotoxicidade do composto original e de seus subprodutos de degradação. Os bioensaios com solos têm sido realizados com minhocas e com plantas, mas é um campo ainda em desenvolvimento.

A determinação da biodegradação total é feita pelo uso de métodos que permitam a quantificação total do material orgânico em teste, incluindo o composto original e os subprodutos de degradação. A melhor metodologia baseia-se no uso de compostos marcados radioativamente com ^{14}C , quantificando-se a conversão do composto a CO_2 . Outras técnicas são: quantificação da produção de CO_2 ; quantificação do desaparecimento do carbono orgânico total (TOC) ou da demanda química de oxigênio (DQO) etc.

Nos ensaios com solos, somente o emprego de compostos marcados radioativamente com ^{14}C permite a determinação inequívoca da biodegradação total. Isto ocorre porque, além da complexidade das composições químicas do solo impossibilitarem quantificações corretas do desprendimento de CO_2 , devido unicamente ao produto não marcado radioativamente em estudo, os compostos em teste podem sofrer transformações químicas e se ligarem firmemente aos solos, não mais sendo extraíveis por solventes, portanto, levarem a falsos resultados de degradação (Katan et alii, — 1976).

A tendência atual é no sentido de expressar a biodegradação em termos da meia-vida, ($t_{1/2}$), do produto num meio ambiente definido. Como meia-vida, ($t_{1/2}$), de um produto qualquer, entende-se o tempo necessário para ocorrer a degradação de 50% da concentração empregada no teste. De um modo geral, a degradação tem sido representada empiricamente em termos da meia-vida, a qual arrola todas as transformações ocorridas com o composto em teste dentro de um processo considerado como efetivamente de primeira ordem (Jury et alii, 1983).

Estudos da biodegradação

Para os estudos da degradação de compostos orgânicos a melhor metodologia desenvolvida é a baseada no uso de produtos marcados radioativamente com ^{14}C , conforme anteriormente descrito (Katan et alii, 1976).

Entretanto, enquanto não forem disponíveis materiais marcados com ^{14}C , estudos mais simples podem ser efe-

tuados utilizando-se compostos não marcados. As pesquisas serão desenvolvidas com amostras aquosas e com amostras de solos.

Estudos de biodegradação em meio aquoso

Para os estudos em meio aquoso, recomendam-se os métodos descritos pela ISO-International Standard Organization, Norma ISO/TC 147/SC5 (ISO, 1981) que são também subscritos pela OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 1979).

Estes métodos foram motivo de um estudo feito nos Estados Unidos com resultados publicados, inclusive com cálculos de meias-vidas de alguns produtos (Larson, 1979).

De uma forma sucinta, o método se baseia na introdução do composto, a ser testado, como única fonte de carbono e de energia em um meio mineral definido e inoculado com microrganismos representantes do ecossistema que se queira estudar. O composto é quantificado por métodos que possibilitem a avaliação da biodegradação total, como análise do carbono orgânico dissolvido (DOC), análise da demanda química de oxigênio (DQO), ou análise do total de CO_2 desprendido. Destas três possibilidades analíticas, a determinação da DQO é a menos recomendável, uma vez que exige quantidades de composto em concentrações que podem ser tóxicas para os microrganismos. A determinação do "DOC", por sua vez, é uma metodologia instrumental que tem sido comprovada como eficiente para os equipamentos modernos do tipo "Total Carbon Analyser" Beckman modelo 915. Aparelhos de menores sensibilidades analíticas do que as apresentadas por aquele analisador de "DOC" não são aplicáveis aos estudos de biodegradação (ISO, 1981). A terceira metodologia baseia-se na captação em meio básico, do CO_2 desprendido pela ação bacteriana, e sua posterior titulação.

O método é exaustivo e não recomendável para testes de rotinas, mesmo porque não possibilita a realização de vários ensaios concomitantemente. A tendência internacional é a de se utilizar análises de "DOC" para os testes de biodegradação de compostos solúveis e análises de CO_2 desprendido para os casos de compostos pouco solúveis ou insolúveis.

Devido à falta de equipamentos específicos, a metodologia analítica mais viável, atualmente, é a da cromatografia em fase gasosa (GC), que, conforme já explicito, somente permite a determinação da biodegradação-primária.

Outra metodologia muito empregada e bastante eficiente para estudos da biodegradação-primária é a cromato-

grafia em camada delgada (TLC), que é vastamente descrita em vários livros técnicos (Stahl, 1969); Sherma & Zweig, 1973; Akherem & Kuznetsova, (1965).

Para os estudos de biodegradação total através da determinação do carbono orgânico dissolvido (DOC) é necessário um equipamento específico do qual não dispomos no momento. Sugere-se, também, o estudo de metodologias para a determinação da biodegradação total pela análise do CO_2 desprendido. Para isso, existem publicações científicas recomendáveis para serem tomadas como base (Larson, — 1979; Gledhill, 1965; Sturm, 1973; — OECD, 1979).

Por fim, algumas publicações recomendadas pela US Environmental Protection Agency (EPA), 1982, para serem seguidos como modelos em estudos de biodegradação ou de metabolismo aquático de compostos químicos (Krzeminski et alii, 1975-a e 1975-b; — Schalfer & Dupras, 1976). Estas referências deverão ser estudadas e seguidas em estudos de biodegradação em meio aquático.

Estudos de biodegradação em solos

A maioria dos comentários feitos para os estudos em meio aquoso é válida para os estudos em solos. Cumpre ressaltar que as metodologias analíticas da determinação do carbono orgânico dissolvido (DOC) e da DQO não se aplicam aos estudos de biodegradação em solos. E que para estes estudos a melhor metodologia é a do uso de compostos marcados com ^{14}C .

A US Environmental Protection Agency (EPA, 1982), recomenda várias publicações para serem seguidas como modelos para os estudos de biodegradação, ou do metabolismo aeróbio, de compostos químicos no solo.

Recomendam-se o estudo destas referências bibliográficas e a seleção das metodologias e das técnicas analíticas mais viáveis para serem utilizadas no laboratório.

Em princípio sugere-se que os estudos sejam feitos segundo Bartha & Pramer (1965), que se baseia na quantificação do CO_2 desprendido. Mas outras metodologias deverão ser estudadas, dentre elas a da cromatografia em camada delgada (TLC), para a qual o artigo de Fuhremann & Lichtenstein (1980), pode servir de modelo.

Bioacumulação

Para se conhecer a bioacumulação de uma substância pode-se empregar uma metodologia que parece ser

bastante rústica e simples, porém de eficiência adequada. Trata-se de tanques de água contendo o produto químico potencialmente poluente em concentrações conhecidas, nos quais são colocados organismos-testes como ostras e peixes. Após um certo tempo padronizado, geralmente 24, 48 ou 96 horas, o organismo é analisado pela sua quantidade de praguicida e o fator acumulação calculado pela relação presente no organismo e na água (Weber, 1975).

Devido às dificuldades em termos de laboratórios específicos que possam analisar e determinar a concentração do poluente presente no organismo-teste, a metodologia a ser estudada pode ser modificada e escolhida, a princípio, como uma primeira etapa de pesquisa para futuramente ser aprimorada.

O organismo-teste é colocado nos tanques de água contendo o produto químico poluente em concentrações específicas e, após um tempo padronizado, o organismo é retirado, e então é determinada a quantidade restante do produto na água. A relação ou a diferença dos valores é estimada como sendo a quantidade que foi acumulada no organismo.

As discussões encontradas na literatura demonstram que o parâmetro bioacumulação é bastante difícil para ser determinado com grande precisão. Ainda existem poucos estudos e testes, por isso faz-se necessária uma pesquisa contínua para o estabelecimento de métodos de análise novos e aperfeiçoados.

Cálculo do índice de periculosidade

O Potencial de Periculosidade ao Ambiente de um agente químico, mormente um praguicida, está relacionado a todos os fatores antes mencionados. A expressão numérica do PPA, se conseguida, pode-se transformar num utilíssimo Índice de Periculosidade do agente químico. A vantagem de se possuir um tal Índice é a possibilidade de enquadramento dos agentes em categorias de periculosidade. Estas poderão variar, por exemplo, desde aquela das substâncias praticamente não perigosas, até a das substâncias extremamente perigosas, e, do ponto de vista técnico, prático e legal, legislações específicas quanto ao controle, restrições e/ou proibições para cada categoria de periculosidade poderão ser adotadas, considerando-se os processos de produção, armazenamento, transporte, comercialização e uso das substâncias químicas.

TOXICIDADE		
Valor da CL ₅₀ (ppm)	Categoria de Perigo	Ponderação
CL ₅₀ > 100	não perigoso	1
100 < CL ₅₀ > 1	ligeiramente perigoso	2
1 < CL ₅₀ > 0,01	perigoso	3
CL ₅₀ < 0,01	tóxico	4
MOBILIDADE		
Características físico-químicas	Categoria de Mobilidade	Ponderação
Solubilidade em água < 5 ppm; catiônicos; presença dos elementos no solo como Mn, Zn, Hg, Cu, Sn, Ca, K ou NH ₄	Imóvel	1
5 ppm < solubilidade em água < 500 ppm; básicos; presença dos elementos no solo como P ou As	Intermediário	2
Solubilidade em água > 500 ppm; praguicidas ácidos ou aniônicos	Móvel	3
PERSISTÊNCIA		
Duração no solo (meses)	Categoria de Persistência	Ponderação
menos de 1	imediatamente degradável	1
1 a 6	moderadamente degradável	2
5 a 8	lentamente degradável	3
mais de 18	persistente	4
BIOACUMULAÇÃO		
Concentração no organismo-teste	Categoria de acumulação	Ponderação
< presente na água	não acumulativo	1
< 10 x presente na água	ligeiramente acumulativo	2
entre 10 e 1000 x presente na água	moderadamente acumulativo	3
> 1000 x presente na água	altamente acumulativo	4

Basicamente o esquema para obtenção do Índice de Periculosidade depende da conquista das informações concernentes a cada um dos níveis da toxicidade, da mobilidade, da persistência e da bioacumulação do produto químico num só valor.

Assim, a título de exemplificação, Weber (1975) em um estudo realizado com praguicidas sugere as seguintes classificações para as quatro distintas propriedades demonstradas no quadro acima.

Após um agente químico, por exemplo, um praguicida ter sido submetido à avaliação dos diferentes critérios (toxicidade a microorganismos, toxicidade a organismos aquáticos, toxicidade a organismos do solo, toxicidade a vertebrados, mobilidade, persistência, bioacumulação) e ter sido enquadrado nas categorias respectivas recebendo suas ponderações, estes pesos podem ser reunidos através de

soma (Weber, 1977) ou produto gerando, finalmente, um único valor numérico que será o índice de periculosidade.

Voltando ao exemplo já aproveitado do trabalho de Weber (1975), vê-se que, segundo os critérios por ele apresentados, o valor do PPA de um praguicida pode ocupar qualquer posto de 1 até 192. Assim, dentro dessa escala, se um praguicida fornecer valor de PPA igual a 1, ele será considerado como de baixíssima periculosidade ao ambiente, enquanto um praguicida que possuir valor de PPA igual a 192 será dito como de elevadíssima periculosidade ao ambiente. Em seu trabalho é fornecida uma lista de valores de PPA para vários praguicidas selecionados (Tab. 1). Nela, valores de PPA para inseticidas organoclorados variam de 48 a 72, a maioria deles apresentando o valor de 64. O cló-

Tabela 1 — Valores do Potencial de Periculosidade ao Ambiente (PPA) para praguicidas selecionados

Nome Comum	Fatores de perigo				Valores de PPA
	Mobilidade	Persistência	Toxicidade	Biomagnificação	
<u>Praguicidas organoclorados</u>					
aldrin (i)	1	4	4	4	64
BHC (i)	2	4	3	3	72
chlordane (i)	1	4	4	4	64
DDT (i)	1	4	4	4	64
dieldrin (i)	1	4	4	4	64
endrin (i)	1	4	4	3	48
heptachlor (i)	1	4	4	4	64
lindane (i)	2	4	3	3	72
methoxychlor (i)	1	4	4	4	64
mirex (i)	1	3	2	4	24
toxaphene (i)	1	4	4	4	64
<u>Praguicidas persistentes</u>					
ethylmercury (f) chloride	1	4	2	4	32
diquat (h)	1	4	2	1	8
paraquat (h)	1	4	1	1	4
<u>Praguicidas organofosforados</u>					
acephate (i)	2	1	1	1	2
azinphosethyl (i)	2	1	3	1	6
chlorpyrifos (i)	1	1	3	3	9
coumaphos (i)	2	1	3	1	6
dichlorvos (i)	2	2	3	1	12
dioxathion (i)	2	1	3	1	6
disulfoton (i)	2	1	3	1	6
malathion (i)	2	1	3	1	6
methidemeton (i)	2	2	2	1	8
methylparathion (i)	2	1	2	1	4
mevinphos (i)	2	2	3	1	12
parathion (i)	2	2	3	3	36
phorate (i)	2	1	4	1	8
TEPP (i)	2	2	3	1	12
<u>Carbamatos</u>					
carbaryl (i,f)	2	1	2	1	4
carbofuran (i,f)	2	2	3	1	12
<u>s-Triazinas</u>					
ametryn (h)	2	2	2	1	8
atrazine (h)	2	3	2	1	12
cyazazine (h)	2	2	2	1	8
prometon (h)	2	4	2	1	16
siamazine (h)	2	3	2	1	12
<u>Ácidos orgânicos</u>					
dalapon (h)	3	1	1	1	3
dicamba (h)	3	2	1	1	6
endothall (h)	3	1	2	1	6
MCPA (h)	3	2	2	1	12
picloram (h)	3	3	2	1	18
silvex (h)	3	2	2	1	12
TCA (h)	3	2	1	1	6
2,4-D (h)	3	1	1	1	3
2,4,5-T (h)	3	2	1	1	18
<u>Outros</u>					
alachlor (h)	2	2	2	1	8
brumacil (h)	3	3	2	1	18
dichlobenil (h)	2	2	2	2	16
diuron (h)	2	3	2	1	12
monuron (h)	2	2	2	1	8
propanchlor (h)	3	2	2	1	12
pyrazon (h)	2	2	2	1	8

f = fungicida; h = herbicida; i = inseticida

reto de etilmercúrio é o único praguicida permanente ou comprovadamente persistente encontrado, com um valor de PPA de 32, o qual é consideravelmente menor que os organo-

clorados. Os organofosforados e carbamatos têm valores de PPA que variam de 2 a 36, boa parte deles ficando na faixa de 6 a 12. Os herbicidas listados têm valores de PPA variando

de 3 a 18 e, portanto, possuem um Potencial de Periculosidade ao Ambiente da mesma magnitude dos organofosforados e carbamatos.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Até recentemente, não havia considerações mais aprofundadas dos efeitos que certos produtos químicos produzem sobre o homem e o seu meio ambiente. Desde a última década, depois que trágicos acidentes ocorreram envolvendo agentes químicos, como em Flixborough (1974) e em Seveso (1976), órgãos governamentais, indústrias e até mesmo o público, têm reconhecido os perigos associados com a utilização de produtos químicos, a despeito de seus benefícios.

Em vários países industrializados, por exemplo, nos Estados Unidos, estudos estão sendo realizados para avaliar e controlar os produtos químicos. Leis e regulamentações foram criadas, como o Toxic Substances Control Act (1976), o qual ainda não está completamente implementado, que dá completa autoridade aos órgãos governamentais, como a EPA-Environmental Protection Agency, para controlar a produção, distribuição, uso e disposição dos produtos químicos potencialmente perigosos, e requer uma notificação com as informações necessárias para uma avaliação do potencial de risco à saúde e ao meio ambiente de todas as novas substâncias químicas e todos os novos usos de substâncias existentes, antes de elas serem lançadas no mercado (Schoenbaum et alii, 1980).

Até onde se tem informação, o emprego de substâncias químicas, em geral, no Estado de São Paulo, não passa por nenhuma espécie de exame ou crivo sistemático. Temos visto que, repetidamente, a preocupação que norteia aprovação ou não para registro de uso de certos compostos é apenas a toxicidade para o homem, sendo esse caso bem exemplificado pelo tipo de registro para uso de praguicidas que hoje se faz no Ministério da Agricultura.

Portanto, faz-se necessário criar e instituir um sistema racional e tão completo quanto possível para a avaliação do Potencial de Periculosidade ao Ambiente de agentes químicos diversos.

Esse sistema, uma vez estabelecido, permitirá adotar um critério único para cadastramento dos agentes químicos com orientação e/ou restrição de seus usos, em função do grau de periculosidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, São Paulo. **Transporte de cargas perigosas — Classificação NBR-7502**. São Paulo, maio 1982.
- Akhrem, A. A. & Kuznetsova, A. I. **Thin layer chromatography — A practical laboratory handbook**. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1965.
- Ames, B. N.; McCann, J. & Yamasaki, E. **Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian — microsome mutagenicity test**. *Mutation Res.*, 31: 347-364, 1975.
- Anderson, W. P.; Richards, A. B. & Whitworth, W. **Leaching of trifluralin, benfen, and nitratin in soil columns**. *Weed Science*, 16: 165-69, 1968.
- ASTM - American Society Tests Materials. **Proposed Standard Practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians**. Draft 10. Astm E — 35-23, 1979.
- Bartha, R. & Pramer, D. **Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soli**. *Soil Sci.*, 100: 68-70, 1965.
- Bowdre, J. H. & Krieg, M. R. **Water quality monitoring: Bacteria as indicators**. *Virginia Water Resources Research Centre*, Bulletin 69, 1974.
- Cetesb, São Paulo. **Procedimentos Operacionais Padronizados**. São Paulo, 1993 (no prelo).
- Cetesb, São Paulo. **Biodegradabilidade de detergentes e de poluentes orgânicos**. São Paulo, 1980.
- Craig, P. N. & Enslin, K. **Structure - Activity in hazard assessment**. In: Saxena, J. & Fisher, F. *Hazard Assessment of Chemicals — Current Developments*. New York, Academic Press, Inc., 1: 389-420, 1981.
- Dutka, B. J. & Kwan, K. K. **Application of four bacterial screening procedures to assess changes in the toxicity of chemicals in mixtures**. *Environmental Pollution*. (Séries A), 29: 125-134, 1982.
- Edwards, D. I. **Cromatografia: princípios e técnicas**. Portugal, Lopes da Silva, 1975, 106 p.
- EPA. US Environmental Protection Agency. **Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision Chemistry: Environmental Fate**. EPA, Washington, D.C., USA, 1982 (PB/83.153973).
- Fuhremann, T. W. & Lichtenstein, E. P. **A comparative study of the Persistence, Movement, and Metabolism of six carbon - 14 insecticides in soils and plants**. *J. Agric. Food Chem.*, 28:446-452, 1980.
- Gledhill, W. **Screening test for assessment of ultimate biodegradability: Linear alkyl-benzene sulfonate**. *Appl. Env. Microbiol.*, 30: 922-929, 1965.
- ISO - International Standard Organization **Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic materials (method by analysis of Dissolved Organic Carbon - DOC)**. ISO, TC 147/SC 5/GT, 4N25, Draft Proposal 7827, 1981.
- ISO - International Standard Organization **Water Quality - Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia Magna Straus (Cladocera, Crustacea)**. ISO - 6341, 1982(E), 1982.
- ISO - International Standard Organization **Draft International Standard ISO/DIS - Water Quality — Determination of acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (Brachydanio rerio Hamilton - Buchanan), Teleostei, Cyprinidae**. ISO/DIS 7346/1, 2, 3, 1982.
- Jury, W. A.; Spencer, W. F. & Farmer, W. J. **Use of models for assessing relative volatility, mobility, and persistence of pesticides and other trace organics in soil systems**. In: Saxena, J. & Fisher, F. *Hazard Assessment of Chemicals — Current Developments*. New York, Academic Press, Inc., 2: 1-43, 1983.
- Katan, J.; Fuhremann, T. W. & Lichtenstein, E. P. **Binding of 14C - Parathion in soil: A reassessment of pesticide persistence**. *Science*, 193: 891-894, 1976.
- Krzeminski, S. F.; Brackett, C. K. & Fisher, J. D. & Spinnler, J. F. **Fate of microbicial 3-isothiazolone compounds in the environment: Products of degradation**. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 1068-1075, 1965b.
- Krzeminski, S. F.; Brackett, C. K.; Fisher, J. D. & Spinnler, J.F. **Fate of microbicial 3-isothiazolone compounds in the environment: Products of degradation**. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 1068-1075, 1965b.
- Larson, R. L. **Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals**. *Appl. Env. Microbiol.*, 38: 1153-1161, 1979.
- Lee, C. M. **Practical Aspects of Aquatic Toxicology. Workshop sobre Desenvolvimento de Técnicas em Toxicidade Aquática**. Realizado no período de 20 de setembro a 8 de outubro de 1982. Cetesb/Unilever, 1982.
- Litchfield, J. T. & Wilcoxon, F. **A simplifield method of evaluating dose-effect experiments**. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 96: 99-113, 1949.
- Miller, L. C. & Tainter, M. L. **Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic probit graph paper**. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57: 261-264, 1944.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Test guidelines for the determination of the biodegradability in water of organic chemicals**. OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group in Degradation and Accumulation, OECD, Paris, 1979.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **OECD Guideline for testing of Chemicals 201 - Algae growth inhibition test**, 1980.
- OMS, México. **Críterios de Salud Ambiental 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas**. Parte I, México, 1980. 287 p.
- OMS, México. **Evaluacion de Riesgos para la salud pública asociados con accidentes causados por agentes químicos**. México, 1984. 89 p.
- Schalfer, C. H. & Dupras Jr., E. F. **Factors affecting the stability of Dimilin in water and the persistence of Dimilin in field waters**. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 733-739, 1976.
- Schoenbaum, T. J.; Huisingh, D. & McDonald, P. E. **Legal Considerations**. In: Guthrie, F. E. & Perry, J. J. *Introduction to Environmental Toxicology*. New York, Elsevier North Holland, Inc., 1980, 483 p.
- Sturm, R. N. **Biodegradability of nonionic quid Chromatography and analyses of pesticides of international importance**. New York, Academic Press, 1973.
- Swisher, R. D. **Surfactant biodegradation, boratory handbook**. New York, Springer-Verlag, 1969.
- Sturm, R. N. **Biodegradability of nonionic surfactants: Screening test for predicting rate and ultimate biodegradation**. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 50: 159-167, 1973.
- Swisher, R. D. **Surfactant biodegradation. Surfactant Science series**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1970. Vol. 3.
- Swoboda, A. R. & Thomas, G. W. **Movement of parathion in soil columns**. *J. Agr. Food Chem.*, 16 (6): 923-927, nov-dec, 1968.
- Thompson, W. **Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose**. *Bacteriol. Rev.*, 11: 115-141, 1947.
- Unep, Industry and environment. **Toxic Chemicals and the environment**. 4 (4) oct/nov/dec., 1981.
- Weber, J. B. **Agricultural chemicals and their importance as a non-point source of water pollution**. In: Proc. Conf. Non-Point Sources Water Pollution. — Blacksburg, Va., USA, May, 1975.
- Weber, J. B. **The pesticide scorecard**. *Environmental Science & Technology*, 11 (8): 756-761, 1977.
- Weber, J. B.; Streck, H. J. Shea, P. J. & Overcash, M. R. **Non-point Source Pollution from PCBs: Bioavailability and inactivation with activated carbon**. In: Khan, M. A. Q. & Stanton, R. H. *Toxicology of Halogenated Hydrocarbons*. New York, Pergamon Press, Inc., 364-374, 1981.
- Weil, C. S. & McCollister, D. D. **Relationship between short and long-term feeding studies in designing and effective toxicity test**. *J. Agric. Food Chem.*, 11 (6): 486-491, 1963.