



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLOGIAS
Programa de pós-graduação Mestrado em Tecnologia Ambiental

**CORO HIDRATO: AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA
COMO SUBPRODUTO DA DESINFECÇÃO DA ÁGUA**

Isadora Rios Baroni

RIBEIRÃO PRETO
2019

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Baroni, Isadora Rios, 1992-

B266c Cloro hidratado : avaliação de risco à saúde humana como
subproduto da desinfecção da água / Isadora Rios Baroni.

- - Ribeirão Preto, 2019.

56 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni.

ISADORA RIOS BARONI

“ CLORO HIDRATO: AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA COMO
SUBPRODUTO DA DESINFECÇÃO DA ÁGUA”.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto.

Orientador(a): Prof. Dr. Rene De Oliveira Beleboni.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

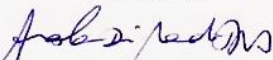
Data de defesa: 29 de maio de 2.019

Resultado: Aprovada

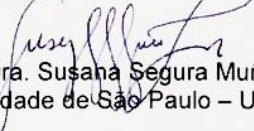
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rene De Oliveira Beleboni
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP
Presidente



Profa. Dra. Angela Di Bernardo Dantas
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Susana Segura Muñoz
Universidade de São Paulo – USP

Ribeirão Preto
2019

Isadora Rios Baroni

**CORO HIDRATO: AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA
COMO SUBPRODUTO DA DESINFECÇÃO DA ÁGUA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto.

Orientador: Prof. Dr. Rene de Oliveira Belebani

RIBEIRÃO PRETO

2019

RESUMO

Nos processos de tratamento de água potável são utilizados produtos químicos clorados para garantir o nível de segurança sanitária e controlar as doenças de veiculação hídrica. Contudo, a adição desses acarreta a formação de Subprodutos da Desinfecção (SPD), gerados através de reações químicas indesejáveis entre os precursores em água e produtos à base de cloro. Os principais precursores da formação dos SPD são a Matéria Orgânica Natural (MON), matéria algácea e a carbonácea. A formação do SPD Cloro Hidrato (CH) não ocorre naturalmente na água e para a população, a maior via de exposição ao CH ocorre através da água de abastecimento. O objetivo geral deste trabalho foi o de estimar o risco toxicológico do CH e sugerir um Valor Máximo Permitido (VMP) em água potável para ser inserido na próxima revisão da legislação que regulamenta os padrões de potabilidade no Brasil, a fim de evitar riscos à saúde da população. Para tal, foi necessário determinar a estabilidade da solução de CH; estabelecer o Nível de Efeito Adverso não Observado (NOAEL) e o Nível do Menor Efeito Observado (LOAEL) através de bioensaios em diferentes modelos animais, além de calcular e sugerir o VMP de CH em água potável. Foi utilizado sal de CH P.A. e a estabilidade da concentração da solução foi analisada periodicamente pela técnica de cromatografia a gás. Na realização dos bioensaios foram utilizados ratos *Wistar* machos que foram submetidos aos testes do campo aberto, rotarod, indução de sono e análises bioquímicas. Considerando os dados obtidos pode-se concluir que: a estabilidade da solução de CH é relativamente elevada, pois apresentou uma tendência de decaimento apenas entre 17 e 21 dias após sua preparação, sendo adotado preventivamente o tempo máximo de uso da solução de 11 dias; foi identificado o NOAEL na dose de $9,60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, sendo o mesmo utilizado para o cálculo do VMP, obtendo-se o valor de $2,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH; considerando o valor de LOAEL na dose de $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, o VMP calculado foi de $0,023 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH; o VMP de $0,023 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH obtido pelo cálculo utilizando o LOAEL está próximo do VMP citado pela Austrália e Nova Zelândia que é $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ para este composto.

Palavras-chave: Avaliação de risco, Cloro Hidrato, NOAEL, LOAEL, Subprodutos da Desinfecção.

ABSTRACT

In the process for production of drinking water, chlorinated chemicals are commonly used to obtain sanitary safety and control of diseases in which water could serve as a vehicle. However, they are responsible for the propagation of Disinfection By-products (DBP) generated through reactions amongst precursors and chlorine-based products. The main precursors of DBP formation are Natural Organic Matter (NOM), algae and carbonaceous matter. Formation of DBP Chloral Hydrate (CH) does not occur naturally in water. For the population, the major route of exposure to CH occurs through the use of drinking water. The overall objective of this work was to estimate the toxicological risk of CH and to suggest a Maximum Contaminant Levels (MCL) in drinking water to be inserted in the next revision of the Brazilian drinking water quality regulation, in order to avoid risks to the health of the population. For that, it was necessary to determine the stability of the CH solution; to establish the Non-Observed Adverse Effect Level (NOAEL) and the Lowest Observed Effect Level (LOAEL) through bioassays using different animal models; to calculate and suggest the MCL of CH in drinking water. The salt of CH P.A. was used and the stability of the solution concentration was analyzed periodically by the gas chromatography technique. In the bioassays male Wistar rats were used, which were submitted to the open field, rotarod, sleep induction and blood collection tests for biochemical analyzes. Considering the obtained data it is possible to conclude that: the stability of the solution of CH is high and showed a tendency of decay between 17 and 21 days, in this work the time of 11 days was preventively adopted as the maximum time for use of CH solution; NOAEL was identified at a dose of $9.6 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ at which was used for the calculation of MCL, the value of 0.23 mg.L^{-1} of CH was obtained; considering the value of LOAEL at the dose of $0.96 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ .d}^{-1}$, the calculated MCL was 0.023 mg.L^{-1} of CH ; the MCL of 0.023 mg.L^{-1} of CH obtained by the calculation using LOAEL is close to the MCL quoted by Australia and New Zealand which is 0.02 mg.L^{-1} .

Key words: Risk Assessment, Chloral Hydrate, NOAEL, LOAEL, Disinfection By-products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cromatograma com a ocorrência e a identificação do CH	19
Figura 2 - Curva de dose-resposta indicando o NOAEL e LOAEL	26
Figura 3 - Rampa de aquecimento da coluna.....	34
Figura 4 - Cromatógrafo	35
Figura 5 - Equipamento utilizado para o teste do campo aberto	36
Figura 6 - Equipamento Rotarod	37
Figura 7 - Animais durante a realização do teste de Indução de sono	38
Figura 9 - Resultado de estabilidade da solução de CH.....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Categorização de fontes de produtos químicos encontrados na água potável.....	22
Quadro 2 - Etapas que constituem a avaliação de risco.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais Subprodutos da Desinfecção (SPD) identificados, nomes comuns, fórmulas químicas e classificação carcinogênica.....	21
Tabela 2 - Características e propriedades do Cloro Hidrato	23
Tabela 3 - Valores do Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) e Nível de Menor Efeito Observado (LOAEL) de acordo com a espécie, duração do experimento e resposta encontrados na literatura	29
Tabela 4 - Compilação dos Valores Máximos Permitidos dos Subprodutos da Desinfecção (mg.L^{-1}) recomendados pela Organização Mundial da Saúde e por vários países.....	31
Tabela 5 - Divisão dos grupos animais de acordo com o tempo para cada bioensaio	35
Tabela 6 - Grupos de animais, critério de cálculo da dose com referência do Cloro Hidrato à DL_{50} de 480 mg.kg^{-1} e concentração da solução a ser administrada e cálculo da dose diária.....	39
Tabela 7 - Resultados de testes de recuperação da extração líquido-líquido e cálculo da porcentagem de recuperação.....	41
Tabela 8 - Resultados de Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) média ($n=3$) e desvio padrão (DP) da solução de CH com $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, em função do tempo para os limites de recuperação da extração entre 70 a 120%	42
Tabela 9 - Resultados de médias e desvio padrão expressos em números de cruzamentos (crossing), levantamentos (rearing) e autolimpeza (grooming) dos animais submetidos ao modelo do campo aberto	43
Tabela 10 - Resultados do tempo médio e desvio padrão (em segundos) até a primeira queda no teste do Rotarod	44
Tabela 11 - Resultados de médias e desvio padrão expressos em número de quedas dos animais submetidos ao teste do Rotarod.....	44
Tabela 12 - Resultados de médias e desvio padrão do tempo (em segundos) até a perda do reflexo postural dos animais submetidos ao teste de indução do sono.....	45
Tabela 13 - Resultados de médias e desvio padrão do tempo (em segundos) total de sono dos animais submetidos ao teste de indução do sono	46
Tabela 14 - Resultados de médias e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos analisados	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFC	Célula de Combustível Alcalina
AHA	Ácidos Haloacéticos
ALDH	Aldeído Desidrogenase
ALT	Alanina Aminotransferase
ANA	Agência Nacional de Águas
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato Aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-DCE	Cromatografia à gás com detetor de captura de elétrons
CH	Cloro Hidrato
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Cloropicrina
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DP	Desvio Padrão
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FI	Fator de Incerteza
HAD	Haloaldeídos
HAN	Haloacetoneitrilas
HC	Haleto Cianogênicos
HF	Halofenóis
HK	Haloacetonas
HOCL	Ácido Hipocloroso
HP	Halopicrinas
IDT	Ingestão Diária Tolerável
LDH	Lactato Desidrogenase
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
MCL	Maximum Contaminant Level
MON	Matéria Orgânica Natural
MTBE	Metil-terc Butirico Éter
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NBR	Norma Brasileira Regulamentadora
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPM	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SPD	Subprodutos da Desinfecção
TCA	Ácido Tricloroacético Sérico
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
THM	Trihalometanos
UNAERP	Universidade de Ribeirão Preto
USEPA	United States Environment Protection Agency
UV	Ultravioleta
VMP	Valor Máximo Permitido

LISTA DE SÍMBOLOS

DL ₅₀	Dose letal em 50% da população
µg.L ⁻¹	Micrograma por litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
U/L	Unidade por litro
g	Gramma
g.cm ³	Gramma por centímetro cúbico
g.gmol	Gramma por mol
g.L ⁻¹	Gramma por litro
i.p	Intraperitoneal
kg	Quilograma
L	Litro
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg.kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹	Miligrama por quilograma de peso corpóreo por dia
mg.L ⁻¹	Miligrama por litro
mL	Mililitro
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
%v/v	Porcentagem volume por volume
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 PRECURSORES PARA A FORMAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA DESINFECÇÃO	17
3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CLORO HIDRATO	22
3.3 FORMAÇÃO DO SUBPRODUTO CLORO HIDRATO	23
3.4 AVALIAÇÃO DE RISCO	24
3.5 RISCO À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO CLORO HIDRATO.....	27
3.6 LEGISLAÇÃO.....	29
3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A LITERATURA	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE CLORO HIDRATO.....	34
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL EM ANIMAIS.....	35
4.2.1 Teste do campo aberto.....	36
4.2.2 Teste do rotarod	37
4.2.3 Teste de indução de sono	37
4.2.4 Parâmetros bioquímicos como provas de funções renal e hepática.....	38
4.3 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EFEITO ADVERSO NÃO OBSERVADO (NOAEL) E NÍVEL DO MENOR EFEITO OBSERVADO (LOAEL)	38
4.4 CÁLCULO DO VALOR MÁXIMO PERMITIDO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORO HIDRATO EM ÁGUA POTÁVEL	39
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO	42
5.2 RESULTADO DO TESTE DO ROTAROD	43

5.3 RESULTADO DO TESTE DE INDUÇÃO DE SONO	44
5.6 CÁLCULO DO VALOR MÁXIMO PERMITIDO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORO HIDRATO EM ÁGUA POTÁVEL	49
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A	56

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 70 diversos pesquisadores relatam que a Matéria Orgânica Natural (MON) presente nas águas dos mananciais que são captadas pela Estação de Tratamento de Água (ETA), pode reagir com o cloro causando a formação de Subprodutos da Desinfecção (SPD) (BELLAR; LICHTENBERG; KRONER, 1974; LYKINS; KOFFSKEY; PATTERSON, 1994; STEVENS et al., 1976).

Países como Suécia, Noruega, Alemanha e Grã-Bretanha, a partir da década de 90, relataram um crescente aumento nos níveis de concentração de MON nos corpos de água, provavelmente devido a eventos associados à variações climáticas diversas, como o aquecimento global, mudanças na acidificação do solo, aumento da severidade da seca e/ou aumento da intensidade de chuvas (FORSBERG, 1992; EIKEBROKK et al., 2004; KORTH et al., 2004).

Na maioria das ETA brasileiras, o cloro é utilizado como agente oxidante na desinfecção da água, tendo em vista seu baixo custo e elevada eficiência na inativação de microrganismos patogênicos e na oxidação de compostos que causam sabores e odores. Contudo, o uso do cloro viabiliza a formação de importantes SPD (MEYER, 1994).

Quando a aplicação desses agentes oxidantes é feita no início do tratamento da água (pré-oxidação), potencializa a formação indesejável de compostos halogenados de cloro e bromo, sendo estes os principais halogênios formados e, denominados de Subprodutos da Desinfecção (SPD). Alguns destes como os Trihalometanos (THM) e os Ácidos Haloacéticos (AHA) são reconhecidamente cancerígenos, o que revela grande interesse de saúde pública da questão aqui tratada.

Segundo o padrão de potabilidade de água para consumo humano atualmente vigente no Brasil, anexo XX da Portaria Consolidação nº 5 (2017), o Valor Máximo Permitido (VMP) de THM e AHA totais é de 0,1 mg.L⁻¹ e 0,08 mg.L⁻¹, respectivamente. De modo relevante, a referida legislação brasileira não menciona o VMP para o CH (BRASIL, 2017).

O CH é um composto utilizado na medicina veterinária e humana como sedativo e hipnótico, sendo também usado na fabricação do pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) (BUDAVARI, 1996). Além disso, o CH é um dos principais subprodutos formados no tratamento da água potável, especialmente quanto ao quesito de

quantidade (DABROWSKA; NAWROCKI, 2009).

Considerando que a água potável é a principal via de exposição da população ao CH e, que o VMP para o subproduto não é declarado no padrão de potabilidade disposto na legislação brasileira, esse trabalho se propõe:

A realizar ensaios de escala dose-resposta através de bioensaios aplicados a diferentes modelos animais e propósitos, de modo a se avaliar o risco toxicológico à saúde causado pelo CH na água potável.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar o risco toxicológico do Cloro Hidrato (CH) e calcular a concentração de ingestão tolerável ao ser humano para esse subproduto em água potável, expresso em concentração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a estabilidade da solução de Cloro Hidrato (CH) em meio aquoso a ser empregada nos ensaios toxicológicos em animais;
- Estabelecer o Nível de Efeito Adverso não Observado (NOAEL) e o Nível do Menor Efeito Observado (LOAEL) através de diferentes bioensaios em modelos animais;
- Calcular o Valor Máximo Permitido (VMP) da concentração de Cloro Hidrato (CH) em água potável.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nos processos de tratamento de água destinada ao abastecimento, são utilizados produtos químicos clorados e desinfetantes de modo a se garantir o nível de segurança sanitária exigido e controlar doenças de veiculação hídrica. Porém, esse processo poderá acarretar na formação de Subprodutos da Desinfecção (SPD), quando por meio de reações químicas entre os compostos clorados e os constituintes da Matéria Orgânica Natural (MON) como ácidos fúlvicos e húmicos, matéria orgânica carbonácea e algas (PASCHOALATO, 2005). Um destes subprodutos gerados e de importância para saúde pública é o Cloro Hidrato (CH).

3.1 PRECURSORES PARA A FORMAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA DESINFECÇÃO

Os precursores para a formação dos SPD na água potável são a MON, decorrente de ácidos fúlvicos e húmicos, a eutrofização devido a presença de microalgas e cianobactérias, e a presença de matéria nitrogenada, fosforada carbonácea. Tais precursores estão intimamente relacionados a poluição antrópica através do lançamento de efluentes doméstico e industrial nos cursos de água utilizados como mananciais, tão bem como as diferentes alterações do clima e meio-ambiente, intensificadas nas últimas décadas (ESTEVES, 1998; EIKEBROKK; VOGT; SKJELKVÅLE, 2003; LILTVED, 2004; FORSBERG, 1992; KORTH et al., 2004).

A MON é considerada a maior precursora para formação de SPD, sendo composta por uma complexa matriz de constituintes orgânicos (BLACK; BE, 2014). A MON pode ser de origem autóctone, quando é produzida no interior do corpo de água, ou alóctone, quando é transportada a partir de diferentes localidades ao leito do manancial (EDZWALD, 2011).

Outro precursor da formação de SPD é a eutrofização que corresponde ao aumento da concentração de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio nos ambientes aquáticos, aumentando, por consequência, a população residente de microalgas e cianobactérias (ESTEVES, 1998). Esse processo pode acontecer de forma natural ou artificial. Quando ocorre de forma natural, o processo é lento e gradual no qual o próprio corpo d'água faz a ciclagem desses nutrientes. A eutrofização artificial provoca o acúmulo excessivo de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, advindos de atividades humanas, que principalmente se finalizam com o

lançamento de efluentes domésticos, agrícolas e industriais em fontes hídricas aliados ao crescimento populacional e a urbanização desordenada (ESTEVEES, 1998).

As algas e cianobactérias, além de trazerem riscos à saúde enquanto potenciais microrganismos patogênicos, podem comprometer o funcionamento das ETA, como quando do prejuízo de função nas etapas de sedimentação e flotação e, quando da formação de compostos orgânicos halogenados prejudiciais à saúde humana (DI BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010).

No contexto dos prejuízos advindos da atividade antrópica, segundo o Instituto Trata Brasil, (2018), atualmente no país, 51,92% da população têm acesso a coleta de esgoto e apenas 44,92% do esgoto do país é tratado, sendo que mais de 100 milhões de brasileiros ainda não dispõem desse serviço e mais de 3,5 milhões de pessoas, nas 100 maiores cidades do país, despejam esgoto de forma irregular, ainda que possuam rede coletora disponível. Em vista disso, em 2013 tiveram 391 mil internações devido a doenças infecciosas causadas por veiculação hídrica

A indisponibilidade de água devido à escassez e má utilização dos recursos hídricos tornando-os insuficientes para atender a elevada e crescente demanda, requer uma busca de recursos alternativos para suprir essa carência hídrica. Portanto, a água de reuso tem sido pesquisada como alternativa. O reuso direto consiste em tratar o esgoto já existentes nas cidades para complementar o abastecimento urbano. Porém, a água proveniente do esgoto apresenta alta carga de MON, o que acarretará a formação de SPD quando desinfetadas com produtos à base de cloro (HESPANHOL, 2015).

Entretanto, segundo Hespanhol (2015), países como Estados Unidos, África do Sul, Austrália, Bélgica, Namíbia e Singapura, já utilizam a prática do reuso direto sem que ocorram problemas de saúde pública, o reuso direto consiste em empregar um tratamento avançado em esgotos domésticos, que poderá ser introduzido diretamente em uma ETA.

Desde que existam fatores que favoreçam a formação dos subprodutos, os mesmos serão formados tanto em ETA quanto em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Em uma ETA a formação de SPD pode acontecer em diferentes etapas do processo, principalmente na etapa de pré-oxidação, onde a desinfecção se dá no início do tratamento da água. Contudo, isto também pode se dar nas etapas de inter-oxidação e de pós-oxidação. Finalmente, a formação de SPD pode ser contínua ao longo de toda a rede de distribuição, devido à presença de cloro residual na água a

ser distribuída (SINGER, 1994). Muito embora a matéria orgânica presente no esgoto tratado seja bastante reduzida em comparação ao esgoto bruto, mesmo essa pequena quantidade em contato com o desinfetante clorado acarretará na formação dos SPD, podendo também consumir o cloro que seria importante na inativação de microrganismos (DEGRÉMONT, 1979; MARRENGULA, 2016).

Segundo Marrengula (2016), em uma pesquisa realizada com efluente secundário de ETE submetido ao processo de desinfecção com intuito de adequação da qualidade para reuso indireto, foi observado que em 100% das amostras analisadas foram formados THM em valores acima de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. De mesmo modo o CH foi identificado pelo autor entre os SPD analisados em seu estudo (Figura 1).

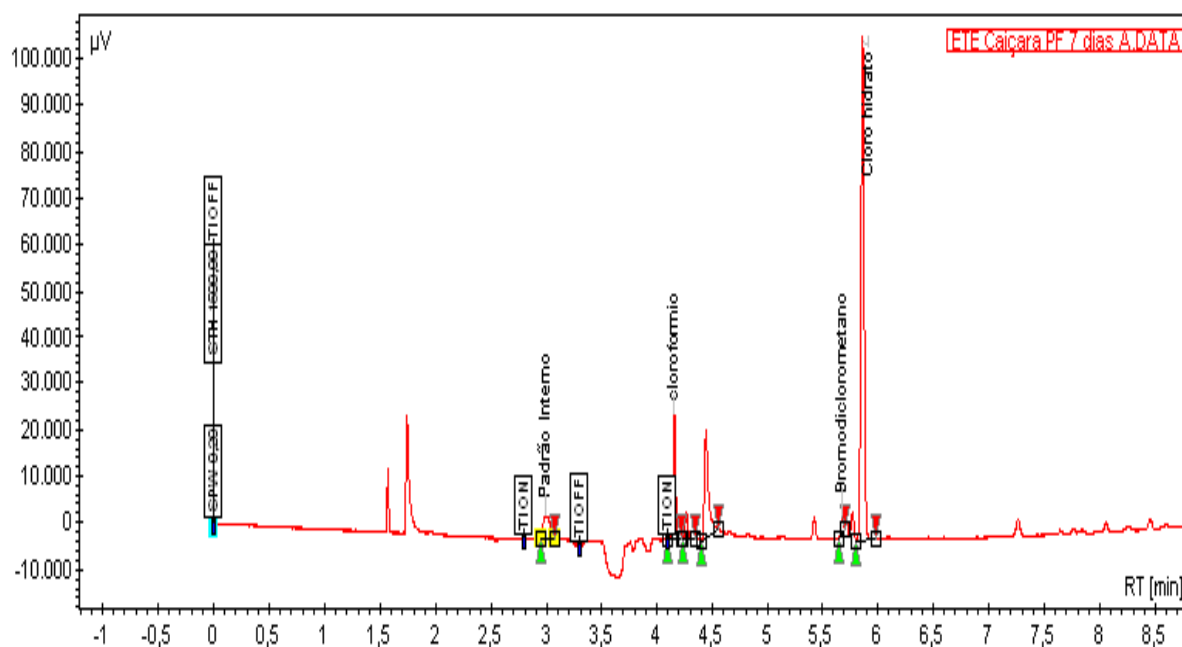


Figura 1 - Cromatograma com a ocorrência e a identificação do Cloro Hidrato

Fonte: Marrengula (2016)

No contexto deste trabalho, o trabalho pioneiro realizado por Rook (1974) fez a primeira comprovação de que a aplicação de cloro na desinfecção final potencializa a formação de SPD. Como dito, isto ocorre devido a matéria orgânica dissolvida presente nos mananciais, que após ter sido submetida as diversas etapas do tratamento para obtenção de água potável não foram removidas com eficiência. Além disso, foi identificada uma associação positiva em estudos epidemiológicos entre o número de anos de exposição do ser humano aos SPD e incidência de câncer (CANTOR et al., 1999) de modo que a persistência destes compostos na água é igualmente importante no contexto de nosso problema, sobretudo no que se diz da

água armazenada para abastecimento. Assim, dados que possam contribuir para avaliação de persistência, ainda que indiretos, são importantes também para o CH.

Outros subprodutos podem ser detectados em águas cloradas, cloraminadas ou ozonizadas como haloaldeídos, halopicrinas, haloacetoneitrilas, haloacetonas, haletos cianogênicos, halofenóis e MX, que afetam igualmente a saúde da população. Todos os SPD supracitados estão listados na Tabela 1, juntamente com seu nome comum, fórmula química e classificação de carcinogenicidade de acordo com a United States Environmental Protection (1999).

Tabela 1 - Principais Subprodutos da Desinfecção (SPD) identificados, nomes comuns, fórmulas químicas e classificação carcinogênica

Nome	Nome comum	Fórmula	Grupo de Carcinogenicidade
Trihalometanos (THM)			
Triclorometano	Clorofórmio	CHCl ₃	B2
Bromodiclorometano	Diclorobromometano	CHBrCl ₂	B2
Clorodibromometano	Dibromoclorometano	CHBr ₂ Cl	C
Tribromometano	Bromofórmio	CHCl ₃	B2
Ácidos Haloacéticos (AHA)			
Ácido monocloroacético	AMCA	CH ₂ ClCOOH	-
Ácido dicloroacético	ADCA	CHCl ₂ COOH	B2
Ácido tricloroacético	ATCA	CCl ₃ COOH	C
Ácido monobromoacético	AMBA	CH ₂ BrCOOH	-
Ácido dibromoacético	ADBA	CHBr ₂ COOH	-
Ácido tribromoacético	ATBA	CBr ₃ COOH	-
Ácido bromocloroacético	ABCA	CHBrClCOOH	-
Ácido bromodicloroacético	ABDCA	CBrCl ₂ COOH	-
Ácido clorodibromoacético	ACDBA	CBr ₂ ClCOOH	-
Haloaldeídos (HAD)			
Dicloroacetaldeído	-	CCl ₂ CHO	-
Tricloroacetaldeído	Cloro hidrato	CCl ₃ CHO	C
Halopicrinas (HP)			
Tricloronitrometano	Cloropicrina	CCl ₃ NO ₂	-
Tribromonitrometano	Bromopicrina	CBr ₃ NO ₂	-
Haloacetoneitrilas (HAN)			
Dicloroacetoneitrila	DCAN	CHCl ₂ CN	C
Tricloroacetoneitrila	TCAN	CCl ₃ CN	-
Dibromoacetoneitrila	DBAN	CHBr ₂ CN	C
Tribromoacetoneitrila	TBAN	CBr ₃ CN	-
Bromocloroacetoneitrila	BCAN	CHBrClCN	-
Haloacetonas (HK)			
1,1-Dicloropropanona	Dicloroacetona	CHCl ₂ COCH ₃	-
1,1,1-Tricloropropanona	Tricloroacetona	CCl ₃ COCH ₃	-
Haleto cianogênicos (HC)			
Halofenóis (HF)			
2-clorofenol	-	C ₆ H ₄ ClOH	D
2,4-diclorofenol	-	C ₆ H ₃ Cl ₂ OH	D
2,4,6-triclorofenol	-	C ₆ H ₂ Cl ₃ OH	B2
MX [3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona]			

Nota: **Grupos B**, provável carcinogenicidade humana: B1-evidência limitada em estudos epidemiológicos; B2-evidência suficiente por estudos com animais. **Grupo C**, possível carcinogenicidade humana: evidência limitada em estudos realizados em animais. **Grupo D**, não classificado: inadequado para o ser humano e evidência de carcinogenicidade em animal.

Fonte: Adaptado de United States Environmental Protection (1999).

Dentro deste contexto, a Organização Mundial da Saúde (BENSON, 2000) recomenda que os países incluam em suas legislações Valores Máximos Permitidos (VMP) expressos em concentração (mg.L^{-1} ou $\mu\text{g.L}^{-1}$) para substâncias químicas que possam representar riscos à saúde humana. No caso do padrão de potabilidade, as substâncias químicas consideradas são aquelas que apresentam evidências epidemiológicas e toxicológicas de risco; sejam elas presentes naturalmente na água ou trazidas à mesma por contaminação, como quando advindas de efluentes industrial e agrícola e subprodutos formados durante o tratamento de água (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009).

No Quadro 1 estão apresentadas as substâncias químicas possíveis de serem encontradas na água e suas fontes.

Quadro 1 - Categorização de fontes de produtos químicos encontrados na água potável

Fonte	Exemplo de fonte
Produtos químicos naturais (incluindo ocorrência natural de toxinas de algas)	Rochas e solos (por exemplo, cálcio, magnésio, mas também arsênio e flúor, cianobactérias em águas superficiais)
Produtos químicos de atividades agrícolas (incluindo pesticidas)	Aplicação de estrume, fertilizantes e pesticidas; práticas intensivas de animais
Produtos químicos de atividade humana (incluindo aqueles usados para fins de saúde pública, por exemplo, controle de vetores)	Esgoto e disposição de resíduos, escoamento urbano, vazamento de combustível
Químicos de atividades industriais	Fabricação, processamento e mineração
Produtos químicos de tratamento e distribuição de água	Produtos químicos para tratamento de água; corrosão e lixiviação de tanques e tubulações de armazenagem, subprodutos de tratamento

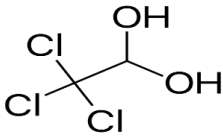
Fonte: Adaptado de THOMPSON et al. (2007).

3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CLORO HIDRATO

O CH é utilizado como medicamento sedativo e hipnótico em seres humanos e animais, que em doses mais altas pode provocar irritação gástrica, náusea, vômito, diarreia, leucopenia e eosinofilia (BUDAVARI, 1996; MCEVOY, 1999), e está presente

em água potável como um dos SPD (DABROWSKA; NAWROCKI, 2009). Na Tabela 2 estão apresentadas as principais características e propriedades do CH.

Tabela 2 - Características e propriedades do Cloro Hidrato

Cloro Hidrato	Característica e Propriedade
CAS nº	302-17-0
Nome químico	Tricloroacetaldéidomonohidratado 2,2,2 tricloro-1,1 etanodiol 1,1,1-tricloro-2,2 etanodiol
Formula molecular	$C_2H_3Cl_3O_2$
Estrutura molecular	
Massa molecular	165,40 g/gmol
Ponto de fusão	52°C
Ponto ebulição	96°C
Densidade relativa	1,424 g/cm ³
Coeficiente de partição n-octanol/água	Log Pow 0,99
Solubilidade em água	6,600 g/L a 20°C
Toxicidade aguda em ratos	DL ₅₀ via oral 480 mg.kg ⁻¹

Fonte: Adaptado de PanReac AppliChem (ITW Reagents).

3.3 FORMAÇÃO DO SUBPRODUTO CLORO HIDRATO

A formação do CH não ocorre naturalmente na água e para a população, a maior via de exposição a esse subproduto ocorre através da água de abastecimento. O CH é um metabolito do ácido tricloroacético e do ácido dicloroacético que são subprodutos formados no processo de desinfecção com cloro (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION, 2000). Dabrowska e Nawrocki (2009) apontaram o CH como SPD da água que é formado em maior quantidade depois dos THM e dos AHA. A formação é resultado da reação química entre a MON presente na água, com o cloro adicionado na desinfecção.

De fato, a principal via de exposição ao CH e outros SPD é relacionado à água potável, mas também podendo ocorrer através do contato com a pele, absorção cutânea, banhos de ducha, trabalhos domésticos e imersão em piscinas. Em vista disso, um estudo publicado por Butião (2011) sobre a formação de SPD em águas de piscinas, onde os precursores de formação são principalmente a matéria orgânica,

algas e urina, analisou-se a formação de Trialometanos (THM); Halocetonas (HC); Cloro Hidrato (CH); Cloropicrina (CP) e Haloacetonitrilas (HAN). Para isto, foram selecionadas 5 piscinas destinadas a diferentes usos e tratadas por diferentes processos, sendo: piscina 1 com oxidantes eletroquimicamente gerados; piscina 2 e 3 com hipoclorito de sódio; piscina 4 com hipoclorito de cálcio e piscina 5 com radiação Ultravioleta (UV) combinada ao cloro. A autora relata que os subprodutos THM, CH e HAN foram encontrados em todas as amostras, e que apenas nas piscinas 1 e 5 não houve a formação dos subprodutos HC e CP. Portanto, foi concluído que houve formação de CH nas águas das piscinas avaliadas devido à presença de matéria orgânica e algas (BUTIÃO, 2011).

A formação do CH e de outros subprodutos varia conforme o método de desinfecção utilizado e o tipo de precursor. Nesse sentido, uma pesquisa realizada por Rosário (2012) investigou o potencial de formação de SPD em dois mananciais da região da grande São Paulo. Sendo constatada a formação de CH em 100% das amostras, em valores que variaram de 32,20 a 236,34 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,89 a 81,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$. E a partir dos resultados obtidos, o autor recomenda a inclusão do CH como SPD no padrão de potabilidade do Brasil, porém não cita um VMP.

Paschoalato, Trimailovas e Di Bernardo (2008) avaliaram o potencial de formação de 22 SPD com a aplicação dos pré-oxidantes alternativos: cloro, dióxido de cloro, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, ozônio e peroxônio, simulando o potencial de formação por meio de uma água preparada com substâncias húmicas, em que passaram pelo processo de pré-oxidação, coagulação, filtração e pós-cloração. Pelos resultados obtidos, o ozônio e o peroxônio associados a coagulação, filtração e pós-cloração formam menores quantidades de subprodutos. Com o cloro aplicado na pré-oxidação, o potencial de formação dos subprodutos formados foi mais elevado. Portanto, a formação de CH foi observada apenas quando utilizados pré-oxidantes clorados.

3.4 AVALIAÇÃO DE RISCO

A avaliação de risco é um método científico que avalia a probabilidade e a natureza dos riscos adversos que podem ocorrer quando há exposição a uma dada substância química. O risco é a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso resultante da exposição a um agente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

As etapas que constituem os ensaios para a avaliação de risco, passam inicialmente pelo conhecimento disponível e a descrição dos efeitos adversos à saúde, crônicos e agudos, de determinada substância. Em seguida, faz-se o ensaio de avaliação de dose-resposta conduzido em animais, relacionando a quantidade administrada e os efeitos observados. A partir do conhecimento da dose que causa o efeito adverso, aplicam-se modelos matemáticos e estima-se a magnitude do problema para a saúde humana através da aplicação de fatores de incerteza obtendo-se um VMP a ser recomendado (Quadro 2) (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009).

Quadro 2 - Etapas que constituem a avaliação de risco

Identificação do perigo
Caracterização e identificação dos efeitos adversos à saúde de um determinado agente químico à qual um indivíduo poderia estar exposto.
Avaliação da resposta à dose
Posteriormente a caracterização e identificação do agente associado, é necessário caracterizar a relação entre a dose e a ocorrência de efeitos adversos à saúde em populações expostas. Por meio de experimentos realizados com animais é possível definir a dose que causa algum efeito adverso.
Avaliação da exposição
Compreende a medição ou estimativa da intensidade, da duração e da frequência da exposição humana ao agente químico. É importante levar em conta algumas informações como: produção e liberação das substâncias no ambiente; persistência e degradação da substância no ambiente; tamanho e distribuição das populações expostas e informações sobre a ingestão do agente.
Caracterização do risco
Estimativa da incidência de efeitos adversos à saúde englobando os resultados das etapas anteriores para a determinação qualitativa e quantitativa, incluindo a variabilidade e a incerteza.

Fonte: Adaptado de Fernandes Neto E Sarcinelli (2009); Organização Mundial da Saúde (2000).

A base para determinar o risco associado ao limite de uma substância e para estabelecer os níveis de tolerância de exposição humana é o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL - *No Observed Adverse Effects Level*). Entretanto, quando a dose selecionada for muito alta, somente o Nível de Menor Efeito Observado (LOAEL - *Low Observed Adverse Effect Level*) pode ser determinado e, nesse caso, pode-se utilizar o LOAEL para deduzir os níveis de tolerância humana. Ambos usualmente são expressos em miligramas (mg) ou microgramas (μg) por quilograma (kg) de peso corpóreo por dia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

Os fatores que podem influenciar o valor do NOAEL ou do LOAEL, são: a via de exposição; as espécies; o sexo; a idade dos animais estudados e o tempo de exposição (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

O objetivo de estimar níveis seguros de substâncias químicas é determinar a Ingestão Diária Tolerável (IDT) ou *Tolerable Daily Intake* (TDI). A IDT é uma estimativa do quanto uma pessoa (pesando de 60 a 70 kg) pode ingerir de uma determinada substância, diariamente, durante toda a vida, sem apresentar risco significativo à saúde humana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000)

A partir da estimativa da IDT calcula-se o Valor Máximo Permitido (VMP), expresso em concentração (mg.L^{-1} ou $\mu\text{g.L}^{-1}$) para substâncias químicas. O VMP para cada substância pode ser estabelecido a partir de evidências toxicológicas ou epidemiológicas, que permitam determinar um NOAEL. As comprovações da toxicidade podem ser obtidas através de experimentos realizados com animais que são extrapolados para definir o nível de exposição segura à uma determinada substância para seres humanos. Considera-se variações inter e intra espécie e a aplicação de Fatores de Incerteza (FI) ao valor obtido do NOAEL (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2000) recomenda que os valores de NOAEL devem ser obtidos por meio de estudos que envolvam ingestão de água e que sejam os mais específicos possível. Ressalta ainda, que se o valor de NOAEL não for obtido pode-se utilizar o valor de LOAEL, e que em vista disso, deve ser aplicado um FI adicional para explicar o uso de LOAEL ao invés do NOAEL, quando necessário. Na Figura 2 está apresentado o exemplo de NOAEL e LOAEL em uma curva de dose-resposta.

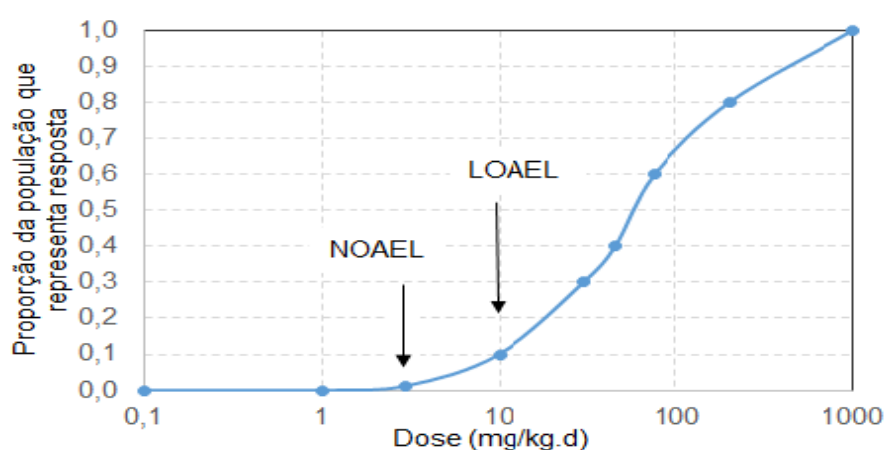


Figura 2 – Curva de dose-resposta

Fonte: Umbuzeiro (2009).

3.5 RISCO À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO CLORO HIDRATO

Instigados pela publicação da década de 70 cujo o CH foi identificado como substância carcinogênica e presente na água potável, diversos autores realizaram estudos com a administração de CH. Como Sanders et al. (1982) e Kauffmann et al. (1982), que realizaram estudos toxicológicos de CH em camundongos durante 14 dias para determinar a DL_{50} , resultando em 1265 mg.kg^{-1} para fêmeas e 1442 mg.kg^{-1} para machos. A partir da DL_{50} encontrada, foi utilizado 1/10 e 1/100 para o preparo das soluções, correspondendo a doses de 14,4 e $144 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ com a finalidade de avaliar a toxicidade aguda do CH. Observaram que na maior dose ocorreu um aumento no peso do fígado e nos níveis de lactato desidrogenase (LDH) no sangue e uma diminuição no peso do baço comparados ao grupo controle, em decorrência disso foi identificado o NOAEL na dose de $14,4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Os mesmos pesquisadores em um estudo de 90 dias com administração de CH em doses equivalente a 16 e $160 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para machos e 18 e $173 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para fêmeas avaliaram a toxicidade do CH em relação aos órgãos e seus efeitos adversos ao sistema imunológico dos animais. Observaram um aumento no peso do fígado e uma diminuição no peso cerebral, sugerindo-se que o órgão alvo do CH é o fígado e com base nessas alterações hepáticas foi determinado o LOAEL na dose de $16 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Concluíram também que o sistema imunológico, particularmente a capacidade de produzir anticorpos IgM para um antígeno T-dependente em camundongos fêmeas, é o indicador mais sensível da toxicidade do CH. Sendo assim, a concentração mais baixa utilizada, isto é $16 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, foi eficaz na indução de ambas as respostas (KAUFFMANN et al., 1982; SANDERS et al., 1982).

Em outro estudo, também de 90 dias, publicado por Daniel et al. (1992) foram utilizadas doses de 24; 48; 96 e $168 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de CH em ratos machos. Foi observado necrose hepatocelular focal nas doses de 96 e $168 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e portanto baseado nesses efeitos hepatotóxicos e em alterações enzimáticas séricas, o NOAEL foi estabelecido na dose de $48 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e o LOAEL em $96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Porém, o autor não cita um VMP.

Klinefelter et al. (1995) em um estudo de 52 semanas, pesquisaram o CH como substância tóxica presente em água potável para avaliar o potencial deste SPD causar alteração reprodutiva em machos por meio de um estudo com ratos, no qual foi administrado CH em água potável nas doses de 55 e $188 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, avaliando o

efeito do CH na morfologia e motilidade de espermatozoides. Foi observado uma redução na motilidade dos espermatozóides na dose mais alta, de $188 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e uma mudança na distribuição de frequência das velocidades médias da linha reta dos espermatozóides, quando comparados ao controle negativo. Portanto, baseados nesses efeitos, o NOAEL foi estabelecido em 55 mg.kg^{-1} e o LOAEL em $188 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Em um estudo de carcinogenicidade do CH em água potável de 104 semanas, George et al. (2000) realizaram um ensaio crônico em ratos e camundongos, com administração de CH nas doses de 7,4; 37,4 e $162,6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em ratos e 13,5; 65 e $146,6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em camundongos. Após o tempo de exposição, os animais apresentaram um aumento de lesões no fígado (hiperplasia, adenomas, carcinoma e adenoma combinado), um aumento e a prevalência de adenomas hepatocelular em todas as dosagens de exposição. Na dosagem mais alta, foi observada a prevalência e multiplicidade de adenomas e carcinoma hepatocelulares, e na dosagem mais baixa foi observada neoplasia hepática, e, portanto, um NOAEL não pode ser determinado, pois a ocorrência de efeito adverso foi observada já na menor dose de administração desse estudo sendo assim, foi estabelecido o LOAEL na dose de $13,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Poon et al. (2000) realizaram um estudo de 7 dias com a administração de CH em doses de 5, 43 e $375 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e foi observado alterações histopatológicas no fígado em todas as dosagens, constatando que este é o principal órgão alvo da exposição ao CH a curto prazo. Desse modo, o LOAEL foi estabelecido na dose de $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, não sendo possível determinar o NOAEL.

Poon et al.(2002) realizaram um estudo de 13 semanas com a administração de CH nas doses de 0,02; 0,19; 1,9 e $19,8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ nos machos e 0,03; 0,24; 2,6 e $23,6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ nas fêmeas no entanto, observaram um aumento no nível sérico de ácido tricloroacético sérico (TCA) em ambos os sexos e determinaram que o CH é um forte inibidor da ALDH. Portanto, baseado nessas alterações, o NOAEL foi identificado em $1,9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ nos machos e $2,6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ nas fêmeas e o LOAEL em $19,8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de NOAEL e LOAEL de acordo com a espécie, duração do experimento e resposta encontrados na literatura.

Tabela 3 - Valores do Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) e Nível de Menor Efeito Observado (LOAEL) de acordo com a espécie, duração do experimento e resposta encontrados na literatura

Autor	Espécie	Duração	NOAEL (mg.kg⁻¹.d⁻¹)	LOAEL (mg.kg⁻¹.d⁻¹)	Resposta
Daniel et al., 1992*	Camundongo	104 semanas	—	166*	Necrose e aumento no peso do fígado
Daniel et al., 1992**	Rato	90 dias	96	168	Necrose hepática e aumento das enzimas séricas
Poon et al., 2000	Rato	7 dias	—	5	Alterações histopatológicas hepáticas
Poon et al., 2002	Rato	13 semanas	1,9	19,8	—
George et al., 2000	Rato	104 semanas	162.6	—	—
George et al., 2000	Camundongo	104 semanas	146.6**	—	—
Klinefelter et al., 1995	Rato	52 semanas	55	188	Motilidade espermática
Sanders et al., 1982	Camundongo	14 dias	14.4	144	Aumento no peso do fígado
Sanders et al., 1982	Camundongo	90 dias	16	160	Aumento no peso do fígado
Kauffmann et al., 1982	Camundongo	14 dias	144	—	Imunotoxicidade
Kauffmann et al., 1982	Camundongo	90 dias	16	160	Imunidade Humoral

*Aumento da incidência de adenomas e carcinomas hepatocelulares em 166 mg.kg⁻¹.d⁻¹.

**Maior prevalência de hiperplasia e adenomas ou carcinomas hepatocelulares a 13,5, 65 e 146,6 mg.kg⁻¹.d⁻¹.

Fonte: Adaptado de BENSON (2000).

3.6 LEGISLAÇÃO

O CH é um composto químico orgânico da família dos haloacetaldéidos popularizado como cloro hidrato. É um SPD formado em quantidades significativas e que não está previsto na legislação brasileira para água de abastecimento.

Em relação à formação de SPD em água de abastecimento, a primeira norma publicada em 1990 foi a Portaria nº 36 GM do Ministério da Saúde que limitou o VMP de THM em 100 µg.L⁻¹. Em dezembro de 2000 a publicação da Portaria nº 1.469 GM atualizou esse valor para 0,1 mg.L⁻¹. Em 25 de março de 2004 foi publicada a Portaria

do Ministério da Saúde nº 518 que manteve em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ o limite da concentração de THM presentes na água (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A revisão da Portaria nº 518 (2004) gerou a Portaria MS nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 que manteve o mesmo valor de referência máximo permitido e estabeleceu VMP para outros SPD, como: bromato ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$), clorito ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), cloro livre ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$), cloraminas total ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), 2,4,6 triclorofenol ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e ácidos haloacéticos ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$). Em novembro de 2017, o Ministério da saúde publicou uma Portaria de Consolidação de nº 5 com Anexo XX que substituiu a Portaria MS 2914 (2011), porém os compostos e os VMP não foram alterados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em comparação com a legislação de alguns países sobre o VMP de THM, são observadas grandes diferenças com os valores estabelecidos pela legislação brasileira em águas destinadas ao consumo humano: na França $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, na Alemanha $25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, nos Estados Unidos $80 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, no Canadá $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, no México $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, na Austrália $250 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004).

Os cinco ácidos acéticos clorados (ácido monocloroacético, ácido monobromoacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético e ácido dibromoacético) que já estavam delimitados na legislação dos Estados Unidos ($60 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) e no Canadá ($80 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$), foram estabelecidos na legislação brasileira apenas a partir da Portaria MS nº 2.914 (2011) com valor limitado em $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ para AHA totais.

A OMS não estabelece um VMP para cada THM (bromofórmio, dibromoclorometano, bromodiclorometano e clorofórmio), mas recomenda que a soma das razões entre a concentração de cada THM seja menor ou igual a 1.

De acordo com a orientação da OMS, o CH deve ser limitado na água potável em decorrência do seu efeito adverso à saúde e o atual VMP sugerido por ela é de $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Na Tabela 4 estão apresentados os VMP, relacionados aos SPD, de acordo com a recomendação da OMS e de diversos países.

Tabela 4 - Compilação dos Valores Máximos Permitidos dos Subprodutos da Desinfecção (mg.L⁻¹) recomendados pela Organização Mundial da Saúde e por vários países

Subproduto da desinfecção	Sigla	OMS (1993)	USEPA (2001)	Health Canada (2001)	Aus-NZ (2000)	UK (2000)	Brasil (2017)
Clorofórmio	CF	0,20	0,0001	-	-	-	-
Bromodiclorometano	BDCM	0,060	0,060	-	-	-	-
Dibromoclorometano	DBCM	0,100	0,0001	-	-	-	-
Bromoformio	BF	0,100	0,0001	-	-	-	-
Trihalometano Total	THM	≤1	0,080	0,100	0,250	0,100	0,1
Ácido monocloroacético	MCAA	-	-	-	0,150	-	-
Ácido Dicloroacético	DCAA	0,050	-	-	0,100	-	-
Ácido Tricloroacético	TCAA	0,100	-	-	0,100	-	-
Ácido 2,2-dicloropropiônico	DALAPON	-	-	-	-	-	-
Ácido Bromocloroacético	BCAA	-	-	-	-	-	-
Ácido Dibromoacético	DBAA	-	-	-	-	-	-
Ácido bromodicloroacético	BDCAA	-	-	-	-	-	-
Ácido Dibromoacético	DBAA	-	-	-	-	-	-
Ácido bromodicloroacético	BDCAA	-	-	-	-	-	-
Ácidos Haloacéticos Totais	AHA ⁸	-	-	-	-	-	0,08
Ácidos Haloacéticos Totais	AHA ⁵	-	0,060	-	-	-	-
Dicloroacetona	DCAN	0,090	-	-	-	-	-
Tricloroacetona	TCAN	0,001	-	-	-	-	-
Dibromoacetona	DBAN	0,100	-	-	-	-	-
Cloro Hidrato	CH	0,010	-	-	0,020	-	-
Clorito	-	0,200	1,000	-	-	-	1
Bromato	-	-	0,010	0,010	-	-	0,01
2,4,6Triclorofenol	-	-	-	-	0,020	-	0,2

Fonte: Adaptado de Sadiq e Rodriguez (2004).

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A LITERATURA

A água potável distribuída à população é um bem democrático e fonte de grande preocupação aos órgãos de vigilância sanitária em todos os países do mundo. É exigido das empresas responsáveis pelo sistema de tratamento e distribuição de água o atendimento aos padrões de potabilidade para inúmeras substâncias.

No Brasil, devido ao crescente aumento na concentração de matéria orgânica e a deterioração da qualidade das águas dos mananciais, é necessário a inserção de uma etapa preliminar ao processo de tratamento da água, denominada pré-oxidação,

geralmente empregando o cloro como oxidante. Esta etapa combinada aos processos de desinfecção potencializam a formação de SPD, sendo algumas substâncias reconhecidamente carcinogênicas.

Alguns SPD já têm seus VMP incluídos no padrão de potabilidade do Brasil, porém o CH, não está citado e tem sido encontrado tanto em água potável como em água de reuso. Desde 1869 o CH tem sido utilizado em tratamento terapêutico como sedativo e hipnótico, vários trabalhos já foram realizados com esse foco, porém partir da década de 70, após descoberta da presença dos SPD é que surgiram os trabalhos com a avaliação da toxicidade de CH em água potável. Esses trabalhos apontam para toxicidade principalmente no fígado, mas não citam respostas quanto a testes comportamentais e locomotores e também não fazem a avaliação de risco para indicar um VMP em água potável. Tal fato foi citado e justificado por Poon et al. (2000), considerando os baixos valores de concentração de CH encontrados no Canadá que variam de 1,2 a 23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e até 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nos Estados Unidos (BUDAVARI, 1996; BENSON, 2000; POON et al., 2000; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION, 2000; HEALTH CANADA, 2008).

Infere-se que realmente é pouco provável a formação indesejável de CH nas águas distribuídas à população em países desenvolvidos onde os mananciais certamente estão protegidos de lançamentos de esgotos sem tratamento, as fontes de água, poços e sistema de coletas são protegidos de contaminação, e as estações de tratamento são dotadas de tecnologias avançadas, portanto, não necessitam da etapa de pré-oxidação e, em caso de aplicação, a tecnologia utilizada é capaz de remover os SPD formados na água durante o tratamento (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2016).

No Canadá os níveis de exposição ao CH estão abaixo da concentração que poderiam causar efeitos nocivos à saúde humana e para que o comitê do país estabeleça uma diretriz à um determinado contaminante é necessário que ele atenda a todos os seguintes critérios: a exposição ao contaminante pode acarretar efeitos adversos à saúde humana; o contaminante é frequentemente detectado ou espera-se que seja encontrado em grande parte da água de abastecimento de todo o Canadá; o contaminante é detectado, ou espera-se que seja detectado em água potável a níveis que ofereça risco à saúde humana. Em vista disso, o Canadá não possui uma diretriz limitando um VMP para CH, entretanto afirma que níveis acima de 0,2 mg.L^{-1} podem indicar uma preocupação com os efeitos à saúde e devem ser investigados (HEALTH

CANADA,

2017).

Apenas a Austrália e Nova Zelândia limitam no padrão de qualidade para água potável um VMP de CH em $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, valor 5 vezes mais restritivo que $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para THM.

Tendo em vista que a realidade da qualidade das águas dos mananciais do Brasil é totalmente oposta e considerando a toxicidade do CH, este trabalho vem inovar e contribuir com bioensaios de dose resposta para avaliar efeitos do CH utilizando-se de testes comportamentais e locomotores juntamente com a avaliação de parâmetros bioquímicos de função renal e hepática. A partir da dose experimental que se observa qualquer efeito colateral é calculado o VMP proposto para água potável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000). Isto contribui para proteção da população, apresentando o trabalho marcado valor epidemiológico e de saúde pública.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada foi realizada em três etapas, sendo a determinação da estabilidade da solução aquosa de CH, a realização dos bioensaios com a definição de NOAEL e LOAEL para avaliação de risco à saúde e o cálculo da concentração do VMP.

4.1 ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE CLORO HIDRATO

A partir do sal de CH P.A., (CAS 302-17-0), (*Dinâmica*®) Cód. 1089, foi preparada uma solução aquosa de 100 mg.L⁻¹, diluída em água purificada para a obtenção de diluições seriais nas concentrações de 100, 50 e 10 µg.L⁻¹. A confirmação da quantificação de CH na solução (meio aquoso) foi realizada pelo teste de recuperação através da técnica analítica de cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (CG-DCE). Foi utilizado o cromatógrafo a gás da marca Varian®, modelo 3600CX (Figura 4). O procedimento analítico foi adaptado do método 551.1 (USEPA, 1995), sendo empregadas as seguintes condições operacionais: coluna de sílica capilar (marca Agilent J & W GC Coluns) DB-1: 30 m x 1.00 µm filme, 0,25 mm ID, gás de arraste foi nitrogênio 5.0 ECD (*White Martins*®), pressão 15 psi, temperatura do injetor 160°C, temperatura do detector 290°C, range 10, atenuação 8, o volume de injeção de amostra 1 µL no modo com divisão (*splitless*). Na Figura 3 está apresentada a rampa de aquecimento da coluna empregada na técnica CG-DCE.

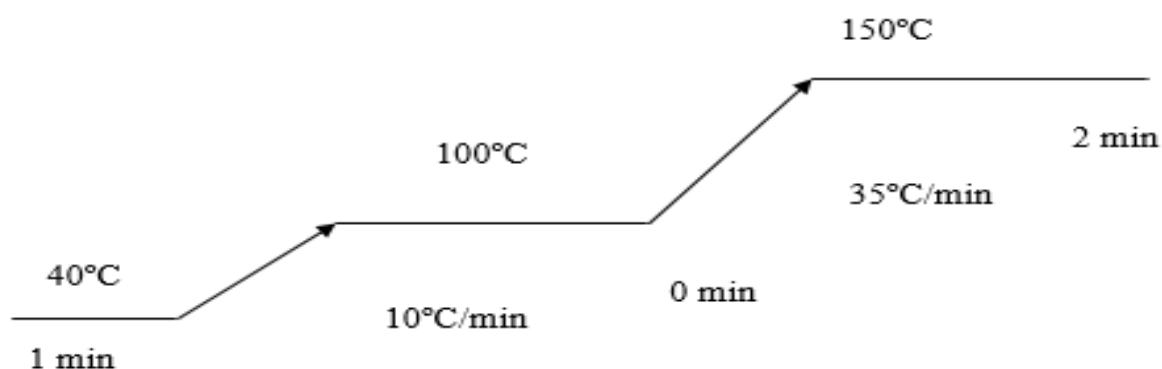


Figura 3 - Rampa de aquecimento da coluna

Fonte: Autora, 2018.

Neste processo faz-se necessária uma etapa prévia de extração líquido-líquido com Metil-terc Butirico Éter (MTBE) para obtenção de extrato orgânico a ser injetado no CG-DCE.



Figura 4 - Cromatógrafo

Fonte: Autora, 2018.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL EM ANIMAIS

Foram utilizados 72 ratos *Wistar* machos, com peso entre 170 – 210g adquiridos da empresa Anilab (Paulinia – SP) e alojados no biotério do departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Os animais foram aclimatados às condições laboratoriais por 6 dias, selecionados aleatoriamente, marcados individualmente e separados em grupos de 6 animais que receberam suprimento de água deionizada e alimentação *ad libitum*. A iluminação empregada foi artificial, sendo a sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuro em ambiente climatizado à 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) com umidade entre 30-70% e ventilação. Além disso, todos os procedimentos experimentais efetuados nesse trabalho foram realizados de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNAERP sob o número 01/2018 (Anexo A).

Os animais foram divididos em 12 grupos de 6 animais cada e separados conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Divisão dos grupos animais de acordo com o tempo para cada bioensaio

Dias de tratamento	Controle Negativo	Grupos experimentais ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)		
		0,96	9,60	96,0
7	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
14	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
21	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11	Grupo 12

Nota: **Grupos 1, 5 e 9** (n= 6 animais/grupo): Controle negativo – Administração diária de água deionizada por via oral (1 mL); **Grupos 2, 6 e 10**: Grupo experimental – Administração diária da solução de CH por via oral na dose de $0,96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; **Grupos 3, 7 e 11**: Grupo experimental – Administração diária da solução de CH por via oral na dose de $9,60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; **Grupos 4, 8 e 12**: Grupo experimental – Administração diária da solução de CH por via oral na dose de $96,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

O critério de seleção da dose ministrada por peso corpóreo teve como referência os ensaios realizados por George et al. (2000), em que foi identificado um valor de LOAEL de $13,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Em decorrência do valor de LOAEL obtido corresponder a menor dose experimental empregada pelos autores, foi adotado neste trabalho doses diárias de CH menores. Desse modo, para a determinação das doses, partiu-se da DL_{50} do CH que corresponde a 480 mg.kg^{-1} , e adotou-se as seguintes relações: $1/500 DL_{50}$ ($0,96 \text{ mg.kg}^{-1}$); $1/50 DL_{50}$ ($9,60 \text{ mg.kg}^{-1}$) e $1/5 DL_{50}$ ($96,0 \text{ mg.kg}^{-1}$).

4.2.1 Teste do campo aberto

Para a realização do teste do campo aberto, o animal foi posicionado no centro de uma arena circular com paredes transparentes de acrílico com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com piso subdividido em 12 seções, modelo *OPO199 (Insight)*, conforme apresentado na Figura 5. Os parâmetros observados foram: o número de quadrantes cruzados com as quatro patas (*crossing*), o número de vezes que o animal permaneceu levantado sobre as patas traseiras (*rearing*) e o número de vezes que realizou a autolimpeza (*grooming*). Cada animal permaneceu no equipamento por 5 minutos sendo o aparato limpo com álcool 70% v/v a cada troca de animal. Todo o período em que o animal permaneceu no campo aberto foi filmado, para posterior análise e registro de dados.

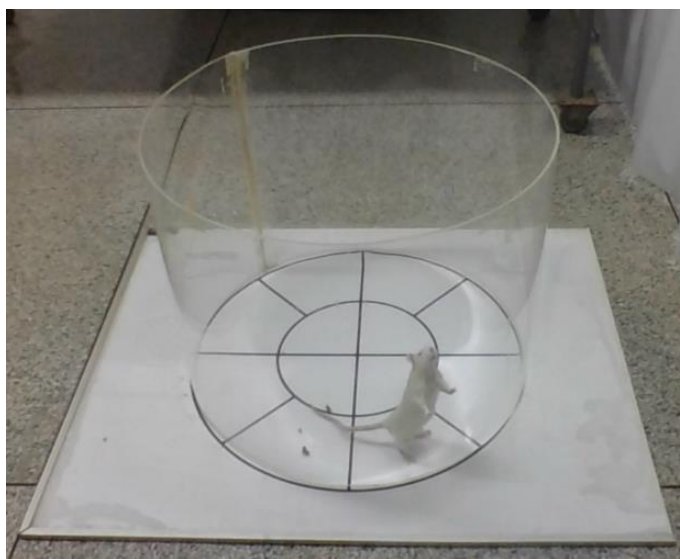


Figura 5 - Equipamento utilizado para o teste do campo aberto

Fonte: Autora, 2018.

4.2.2 Teste do rotarod

O teste foi realizado por meio de *rotarod* da marca Ugo Basile, modelo 7750 (Figura 6), permitindo avaliação do desempenho locomotor de cada animal, verificando alterações de equilíbrio e coordenação motora. Para realização do teste os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, a 25 cm acima do nível de referência, com uma taxa de rotação constante de 12 rotações por minuto (rpm). No dia anterior ao teste, os animais foram treinados durante 90 segundos por 3 vezes, e foi adotado o critério de exclusão do teste os animais que durante o treinamento não conseguiram andar na barra giratória. No dia do experimento, cada animal foi levado à barra de rolagem por 60 segundos, ocorrendo a limpeza do aparato com álcool 70% v/v a cada troca de animal, sendo avaliado o tempo até a primeira queda e o número de quedas durante o tempo de experimento.



Figura 6 - Equipamento Rotarod

Fonte: Autora, 2018.

4.2.3 Teste de indução de sono

O teste para avaliação de sono foi realizado através da indução de sono por barbitúrico, que correspondeu à administração de pentobarbital sódico 50 mg.kg⁻¹ (*Thiopentax®*, *Cristália*) por via intraperitoneal, avaliando-se o tempo (em segundos) decorrido entre a perda do reflexo postural e o tempo total de sono (Figura 7). Os resultados foram expressos em tempo de latência (perda do reflexo postural) e o

tempo total de sono de cada grupo experimental comparados ao grupo controle negativo.



Figura 7 - Animais durante a realização do teste de indução de sono

Fonte: Autora, 2018.

4.2.4 Parâmetros bioquímicos como provas de funções renal e hepática

A avaliação dos parâmetros bioquímicos de função renal e hepática ocorreu ao final de cada 7 dias de experimento, totalizando 21 dias. Um dia após o teste de indução de sono, os animais foram anestesiados com pentobarbital na dose de 50 mg.kg⁻¹ i.p, com subsequente coleta de amostra sanguínea, uma única vez, por punção intracardíaca. O sangue foi coletado em tubo seco, e o soro obtido por centrifugação, a 250 g por 15 minutos. Posteriormente o soro foi transferido para um microtubo seco, identificados e encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Ciências Farmacêuticas da UNAERP. Utilizando-se kits de diagnóstico padronizados (*Labtest®*) e analisador bioquímico automático (*Mindray BS-380*) foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: ureia, creatinina, como provas da função renal e aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e alanina aminotransferase (ALT ou TGP) como provas da função hepática.

4.3 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EFEITO ADVERSO NÃO OBSERVADO (NOAEL) E NÍVEL DO MENOR EFEITO OBSERVADO (LOAEL)

A metodologia para avaliação do risco segundo modelo de dose resposta foi baseada nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (2000).

Como mencionado anteriormente, o critério adotado para determinação das doses de CH a serem administrada nos animais foi a consideração da DL₅₀ do CH que corresponde a 480 mg.kg⁻¹, sendo considerado: 1/500 (0,96 mg.kg⁻¹.d⁻¹); 1/50 (9,60

mg.kg⁻¹.d⁻¹) e 1/5 (96,0 mg.kg⁻¹.d⁻¹) da mesma. Na Tabela 6 estão apresentadas as dosagens e as concentrações da solução de CH.

Tabela 6 - Grupos de animais, critério de cálculo da dose com referência do Cloro Hidrato à DL₅₀ de 480 mg.kg⁻¹ e concentração da solução a ser administrada e cálculo da dose diária

Grupo (n=6)	Critério para o cálculo da dose (DL ₅₀ = 480 mg.kg ⁻¹)	Concentração de CH (mg.L ⁻¹)	Peso corpóreo médio dos ratos (g)	Volume ingerido (ml.d ⁻¹)	Dose diária (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)
A	Controle negativo	0	188 ± 11,7	0,97 - 1,35	0
B	1/500 DL ₅₀ = 0,96	172 e 220	187 ± 11,7	0,97 - 1,35	0,96
C	1/50 DL ₅₀ = 9,60	1800 e 2400	198 ± 7,7	0,97 - 1,35	9,60
D	1/5 DL ₅₀ = 96,0	16800 e 22000	191 ± 11,6	0,97 - 1,35	96,0

Para análise e avaliação de risco à saúde, foi observada a dose resposta e os resultados foram plotados com a proporção de animais que apresentaram respostas aos testes do campo aberto, rotarod e indução de sono em função da dose administrada de CH (mg de CH por kg de peso corpóreo por dia).

4.4 CÁLCULO DO VALOR MÁXIMO PERMITIDO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORO HIDRATO EM ÁGUA POTÁVEL

A partir dos resultados obtidos nos ensaios com os animais, foi determinado o valor da dose do NOAEL e LOAEL para os parâmetros analisados, em seguida foi calculado a Ingestão Diária Tolerável (IDT) mg.kg⁻¹.d⁻¹, conforme a Equação 1.

$$IDT = \frac{NOAEL}{FI} \quad (1)$$

Em que:

IDT: ingestão diária tolerável (mg.kg⁻¹.d⁻¹);

NOAEL: Nível de Efeito Adverso Não Observado (mg.kg⁻¹.d⁻¹);

FI: Fator de incerteza (100 para uso de NOAEL e 1000 para uso de LOAEL)

O fator de incerteza (FI) adotado foi multiplicado por 10 considerando variabilidade entre espécies; multiplicado por 10 considerando variabilidade intraspécies e multiplicado por 10 para explicar o uso de um LOAEL em vez de um NOAEL, o último apenas quando necessário (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

A Equação 2 foi empregada para determinação do VMP de CH (mg.L^{-1}) em água potável baseado na ingestão de 2 L de água por dia por um período de vida de 70 anos e peso corpóreo médio de 60 kg, utilizando valores de referência recomendados pela Organização Mundial da Saúde (2000).

$$\text{VMP} = \frac{\text{IDT} \times \text{mc} \times \text{f}}{\text{C}} \quad (2)$$

Em que:

- VMP: Valor Máximo Permitido (mg.L^{-1} CH);
- IDT: Ingestão Diária Tolerável ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$);
- mc: Massa Corporal (60 kg);
- f: Fração ou porcentagem da IDT associada a ingestão de água (valor adotado de 80% ou 0,8, considerando o consumo total de água, uma vez que a exposição ao CH para a população em geral vem principalmente do consumo de água potável após a desinfecção com cloro);
- C: consumo de água de 2,0 L por dia.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos em cada teste foram submetidos a análise de variância (ANOVA 2-vias) seguida pelo *post-hoc* de Turkey utilizando o software *Graph Pad Prism* (7.0) ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão apresentados os resultados de teste de recuperação e estabilidade da solução de CH, resultados dos bioensaios com a determinação de NOAEL e LOAEL e avaliação de risco à saúde através do cálculo de VMP.

A solução de CH que foi preparada na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ teve sua concentração confirmada através do teste de recuperação, utilizando diluições e extração líquido-líquido em MTBE (Tabela 7), segundo o INMETRO (2007) a aceitação de recuperação está entre 70 e 120%.

Tabela 7 - Resultados de testes de recuperação da extração líquido-líquido e cálculo da porcentagem de recuperação

Concentração teórica ($\mu\text{g/L}$ de CH)	Concentração obtida ($\mu\text{g/L}$ de CH)			Média	DP	Recuperação (%)
10	12,23	7,17	9,30	9,57	2,54	95,67
50	55,14	50,66	53,41	53,07	2,26	106,14
100	98,15	108,91	100,19	102,42	5,72	102,42

Dentre as diluições preparadas, os resultados de recuperação de CH foram satisfatórios dentro da faixa de 70 a 120%. Esse resultado é importante, de modo a garantir a confiabilidade e reprodutibilidade das doses empregadas nos diferentes bioensaios realizados.

Além disso, a solução preparada de CH na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi analisada periodicamente para determinação do prazo de validade e/ou estabilidade para a utilização nos bioensaios. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8 e na Figura 8. Este procedimento teve por objetivo verificar se a concentração da solução de CH é persistente à degradação e o resultado deverá indicar a periodicidade de preparo da solução a ser ministrada aos animais.

Foi adotado o tempo de estabilidade máxima de 11 dias como medida de prevenção, visto que o tempo total de experimento foi de 21 dias e observou-se uma tendência de decaimento nos valores de concentração da solução entre 17 e 20 dias. Em decorrência disso, a solução foi preparada duas vezes, uma no início do experimento e outra no 11º dia. Assim, somente soluções com no máximo 11 dias de preparação foram usadas nos experimentos, garantido novamente a exatidão das doses utilizadas nos bioensaios.

Tabela 8 - Resultados de Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) média (n=3) e desvio padrão (DP) da solução de CH com $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, em função do tempo para os limites de recuperação da extração entre 70 a 120%

Data	T (d)	Resultado (triplicata)			média	DP
		a	b	c		
07/05/2018	0	125,08	-	101,6	113,34	17
08/05/2018	1	-	101,05	103,36	102,205	2
10/05/2018	3	-	124,58	100,15	112,365	17
14/05/2018	7	100,84	108,83	99,54	103,07	5
16/05/2018	9	101,85	-	119,7	110,775	13
18/05/2018	11	115,72	103,04	106,34	108,367	7
22/05/2018	15	131,57	138,17	133,86	134,533	3
24/05/2018	17	125,42	107,64	-	116,53	13
28/05/2018	21	102,1	93,25	-	97,675	6
04/06/2018	28	87,34	76,48	91,56	85,127	8

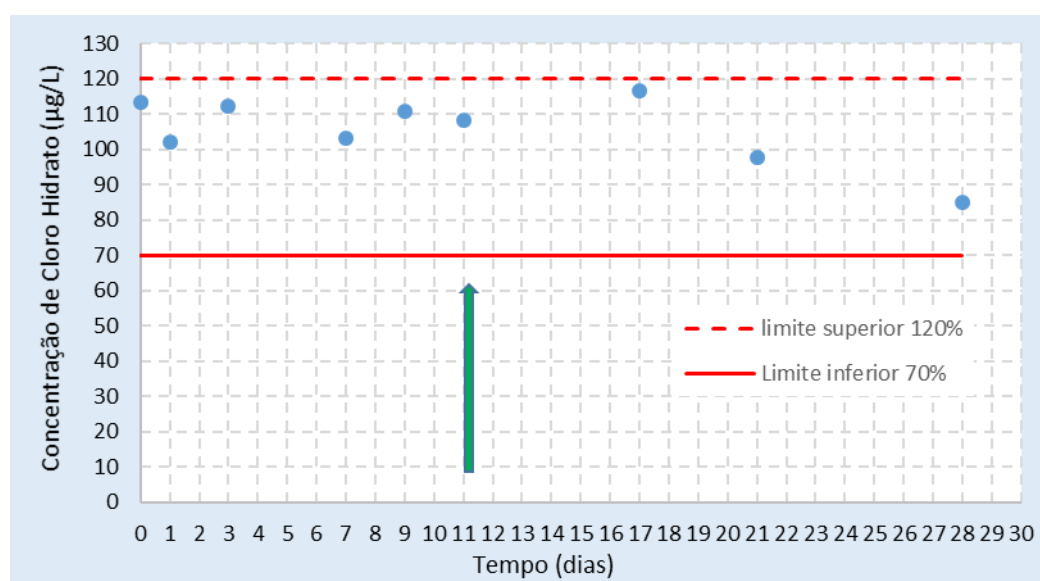


Figura 8 - Resultado de estabilidade da solução de CH

Fonte: Autora, 2018.

5.1 RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO

Os resultados do teste do campo aberto estão subdivididos em observação da frequência de cruzamentos entre quadrantes (*crossing*), frequência de levantamentos (*rearing*) e frequência de autolimpeza (*grooming*) dos animais observados durante o experimento (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados de médias e desvio padrão expressos em números de cruzamentos (crossing), levantamentos (rearing) e autolimpeza (grooming) dos animais submetidos ao modelo do campo aberto

Parâmetro	Grupo (dias)	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)			
		Controle Negativo	0,96	9,60	96,0
<i>Crossing</i>	7	42,5 ± 11,8	34,50 ± 5,2	43,5 ± 13,9	25,7 ± 6,0
	14	28,8 ± 7,6	31,2 ± 11,1	32,3 ± 16,7	36,8 ± 18,2
	21	27,5 ± 17,1	30,2 ± 9,0	38,4 ± 16,7	27,8 ± 10,2
<i>Rearing</i>	7	16,5 ± 5,6	15,3 ± 7,5	11,8 ± 5,0	10,8 ± 3,6
	14	12,8 ± 4,8	12,8 ± 7,2	14,5 ± 4,5	12,3 ± 7,1
	21	10,8 ± 9,4	16,5 ± 6,1	17,6 ± 10,0	13,8 ± 4,8
<i>Grooming</i>	7	2,5 ± 1,5	3,3 ± 2,4	2,7 ± 0,8	4,0 ± 0,6
	14	3,4 ± 0,9	2,0 ± 1,1	2,2 ± 1,2	3,8 ± 1,9
	21	2,0 ± 0,6	3,5 ± 2,7	2,8 ± 1,1	2,7 ± 1,2

Em relação aos parâmetros analisados para o teste do campo aberto, a ANOVA mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos (7, 14 e 21 dias) nas doses 0,96; 9,60 e 96,0 mg.kg⁻¹.d⁻¹ em comparação ao controle negativo e entre as doses. Isto indica que o CH nas doses aqui administradas pelo tempo de até 21 dias não interferiu na locomoção e atividade exploratória dos animais.

5.2 RESULTADO DO TESTE DO ROTAROD

Este teste permitiu avaliar a performance motora dos animais com a finalidade de detectar alterações de equilíbrio e coordenação que se deem por sedação, relaxamento muscular e/ou impedimento locomotor potencialmente induzidas pelas diferentes doses do CH (ROSLAND et al., 1990). Ao se colocar o animal sobre a barra giratória a uma velocidade constante pode-se verificar o tempo até a primeira queda

(Tabela 10) e o número total de quedas (Tabela 11), por meio da capacidade do animal em equilibrar-se sobre a mesma.

Tabela 10 - Resultados do tempo médio e desvio padrão (em segundos) até a primeira queda no teste do Rotarod

Grupo (dias)	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)			
	Controle Negativo	0,96	9,60	96,0
7	40,4 ± 11,7	41,2 ± 20,7	37,8 ± 20,5	42,2 ± 20,2
14	46,0 ± 22,3	52,5 ± 9,7	48,2 ± 18,9	32,4 ± 18,2
21	44,4 ± 16,2	51,0 ± 12,6	32,2 ± 13,3	51,4 ± 13,2

Para os resultados do tempo decorrido até a primeira queda, o ANOVA seguido pelo teste de Tukey mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais nas diferentes doses ou mesmo com o controle negativo em nenhum dos períodos de tempo avaliados (7, 14 e 21 dias).

Tabela 11 - Resultados de médias e desvio padrão expressos em número de quedas dos animais submetidos ao teste do Rotarod

Grupo (dias)	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)			
	Controle Negativo	0,96	9,60	96,0
7	1,3 ± 0,8	0,8 ± 1,2	0,7 ± 0,5	1,0 ± 1,6
14	1,0 ± 1,5	0,7 ± 0,8	0,8 ± 1,3	1,4 ± 1,1
21	0,6 ± 0,6	0,4 ± 0,6	1,4 ± 0,6	0,6 ± 0,9

Em relação ao número total de quedas a ANOVA mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o controle negativo para as diferentes doses e tempos de observação.

Isto indica que ao menos nas doses testadas e nos tempos de observação utilizados, o CH não produz alterações significativas na performance locomotora dos animais, mesmo os tratados por 21 dias. Estes resultados corroboram aqueles obtidos no teste do campo aberto, independentemente das diferentes características, sensibilidades e especificidades de cada método/teste.

5.3 RESULTADO DO TESTE DE INDUÇÃO DE SONO

O teste de indução de sono por barbitúrico possui a finalidade de verificar a atividade depressora de diferentes compostos sobre o Sistema Nervoso Central

(SNC) (CARLINI, 1979). Compostos que deprimem o SNC, geralmente, aumentam o tempo total de sono produzido pelo pentobarbital, podendo também diminuir o tempo até a perda do reflexo postural e entrada no sono, caracterizando assim potenciais efeitos sedativos e/ou hipnóticos (NORUP, 2002). A medição destes dois últimos parâmetros é mais específica neste teste do que a medida indireta do mesmo fornecida pelo teste do rotarod ou mesmo campo aberto.

Sendo assim, os resultados da indução de sono por barbitúrico estão subdivididos em mensuração da latência, onde foi considerado o tempo (em segundos) até a perda do reflexo postural (Tabela 12) e tempo (em segundos) total de sono dos animais (Tabela 13).

Tabela 12 - Resultados de médias e desvio padrão do tempo (em segundos) até a perda do reflexo postural dos animais submetidos ao teste de indução do sono

Grupo (dias)	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)			
	Controle Negativo	0,96	9,60	96,0
7	293 ± 91	323 ± 59	307 ± 32	272 ± 16
14	620 ± 10	298 ± 93*	390 ± 163*	196 ± 64*
21	433 ± 13	344 ± 43	328 ± 19	256 ± 107*

* Diferença estatisticamente significativa

Em relação ao tempo (em segundos) até a perda do reflexo dos animais, a ANOVA mostrou que houve uma diferença estatisticamente significativa no controle negativo do grupo de 14 dias (620 s ± 10 s), pela qual se verificou um decaimento no tempo até a perda de reflexo quando este grupo foi comparado aos grupos experimentais nas três diferentes doses (298 s ± 93 s; 390 s ± 163 s; 196 s ± 64 s). Também houve diferença significativa entre o controle negativo do grupo de 21 dias (433 s ± 13 s) comparado a ao grupo experimental na dose de 96 mg.kg⁻¹.d⁻¹ (256 s ± 107 s), assumindo-se então o efeito depressor no SNC causado pelo CH e de acordo com estes dados.

Tabela 13 - Resultados de médias e desvio padrão do tempo (em segundos) total de sono dos animais submetidos ao teste de indução do sono

Grupo (dias)	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)			
	Controle Negativo	0,96	9,60	96,0
7	2865 ± 968	2124 ± 238	3200 ± 693	2539 ± 819
14	2940 ± 540	2840 ± 399	2190 ± 368	3342 ± 482
21	1773 ± 919	1569 ± 103	2189 ± 101	2923 ± 1041

Em relação ao tempo (em segundos) total de sono dos animais, a ANOVA mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa no tempo total de sono dos animais dos diferentes grupos submetidos ao teste de indução de sono.

5.4 RESULTADO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA PROVAS DE FUNÇÕES RENAL E HEPÁTICA

A Tabela 14 apresenta os valores médios e desvios padrão das determinações de AST, ALT, ureia e creatinina que são parâmetros bioquímicos marcadores da função renal e hepática. Quando os mesmos estão aumentados em relação ao controle negativo, isto pode indicar alterações funcionais de fígado e rins, muito embora sem precisar com exatidão o nível de comprometimento do órgão (MARTIN et al.,1981).

Tabela 14 - Resultados de médias e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos analisados

Parâmetro (Unidade)	Grupo (dias)	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)			
		Controle Negativo	0,96	9,60	96,0
AST (U/L)	7	104,2 ± 20,3	122,0 ± 32,9	173,3 ± 121,6	102,0 ± 40,2
	14	108,7 ± 35,5	156,8 ± 50,8	125,0 ± 46,5	132,2 ± 49,6
	21	85,3 ± 5,3	116,5 ± 20,9	102,0 ± 38,9	119,0 ± 54,3
ALT (U/L)	7	50,3 ± 19,7	55,5 ± 25,6	47,7 ± 16,6	35,2 ± 13,2
	14	43,2 ± 6,9	51,0 ± 12,5	39,7 ± 7,1	47,0 ± 9,2
	21	43,5 ± 5,3	43,3 ± 7,1	40,5 ± 8,7	45,3 ± 9,1
Ureia (mg/dL)	7	36,0 ± 5,4	36,5 ± 5,3	37,7 ± 4,2	35,5 ± 2,7
	14	34,3 ± 3,1	40,2 ± 9,2	39,7 ± 9,2	39,4 ± 4,7
	21	39,5 ± 7,2	40,5 ± 6,3	43,8 ± 6,4	44,2 ± 6,4
Creatinina (mg/dL)	7	0,50 ± 0,04	0,61 ± 0,09	0,52 ± 0,06	0,47 ± 0,06
	14	0,51 ± 0,06	0,54 ± 0,07	0,48 ± 0,06	0,51 ± 0,03
	21	0,48 ± 0,05	0,49 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,48 ± 0,05

Para os resultados referentes a atividade das transaminases hepáticas AST/ALT e dos marcadores de função renal ureia e creatinina, a ANOVA indicou não existir uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle negativo.

Um estudo de efeitos bioquímicos do CH com 7 dias de exposição, Poon et al., (2000) constataram alterações funcionais de fígado, porém as doses utilizadas pelos autores correspondem à 5, 43 e 375 mg.kg⁻¹.d⁻¹ sendo o LOAEL identificado na dose de 5 mg.kg⁻¹.d⁻¹. Por outro lado, George et al., (2000) observaram alterações e lesões no fígado de ratos apenas em exposição mais tardia, com 104 semanas de administração de CH nas doses 7,4; 37,4 e 162,6 mg.kg⁻¹.d⁻¹ em ratos e 13,5; 65 e 146,6 mg.kg⁻¹.d⁻¹ em camundongos. Isto mostra as variações/flutuações globais dos

dados obtidos, ainda que por métodos bastante semelhantes, sobretudo no que se trata do tempo de exposição ao CH. Além disso, é sempre preciso levar em conta outros fatores contribuintes, como certa imprecisão inerente aos métodos/medida e/ou variações intra e interespecies, como conhecidas.

5.5 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EFEITO ADVERSO NÃO OBSERVADO (NOAEL) E DO NÍVEL DO MENOR EFEITO OBSERVADO (LOAEL)

Com base nos experimentos realizados, foi possível a determinação dos valores do NOAEL e do LOAEL em alguns dos parâmetros analisados.

No teste de indução de sono o LOAEL foi identificado na dose de $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Dessa maneira, para o parâmetro avaliado não foi possível estabelecer o valor de NOAEL, em decorrência do valor de LOAEL corresponder a menor dose experimental empregada.

Nesse sentido, diversos trabalhos encontrados na literatura relatam efeitos na menor dose de administração do CH. Entretanto, tais trabalhos estão baseados na análise de diferentes parâmetros e testes, como por exemplo, alterações de peso, lesões de órgãos, motilidade espermática, imunidade humoral, parâmetros bioquímicos e, dentre outros, mas que não exatamente específicos para ação do CH no SNC, como medido por sedação, hipnose e/ou mesmo impedimento locomotor (DANIEL et al., 1992; GEORGE et al., 2000; KAUFFMANN et al., 1982; KLINEFELTER et al., 1995; POON et al., 2002; POON; NADEAU; CHU, 2000; SANDERS et al., 1982).

De fato e por exemplo, em um estudo realizado com camundongos ao avaliar os efeitos do CH ao sistema imunológico foi obtido o LOAEL na menor dose de administração ($16 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$) valor 17 vezes maior que o LOAEL de $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ identificado no presente trabalho (KAUFFMANN et al., 1982).

É importante ressaltar que na literatura não foram encontrados testes de avaliação comportamental e locomotora para avaliar os efeitos do CH no contexto de risco à saúde (cálculo do VPM). Desse modo, o presente estudo vem contribuir com a aplicação de diferentes modelos experimentais animais, que possam ser mais específicos para a ação fim do CH, com a finalidade de estabelecer valores de NOAEL e LOAEL abaixo dos encontrados na literatura atualmente, que conseqüentemente ao serem empregados na realização do cálculo do VMP de CH, resultou um VMP mais restritivo e seguro. Além disso, o cálculo de VPM a partir de bioensaios diversos ajuda a completar e dirimir inconsistências que levem em conta diferentes arranjos e

condições experimentais, abastecendo a literatura científica de informações consistentes.

5.6 CÁLCULO DO VALOR MÁXIMO PERMITIDO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORO HIDRATO EM ÁGUA POTÁVEL

Considerando o valor de NOAEL em $9,60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para o cálculo do VMP, o valor obtido foi de $2,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH, valor acima do recomendado pela OMS. Portanto, recomenda-se que em futuros trabalhos sejam empregadas doses intermediárias ou menores que as utilizadas nesse trabalho e, sobretudo, por um período de tempo maior de exposição ao CH, de modo que algumas flutuações experimentais observadas neste trabalho preliminar possam ser dirimidas.

O valor de LOAEL foi obtido na menor dose experimental deste estudo, $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, resultando em um VMP de $0,023 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH. Isto está em conformidade com o VMP de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ definido pela Austrália e Nova Zelândia para o CH (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004), e destaca-se que este valor é 5 vezes mais restritivo que o VMP para THM citado na legislação do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em vista disso, o menor valor do NOAEL em estudos de CH como SPD foi estabelecido por Poon et al. (2002) na dose de $1,9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e LOAEL $19,8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, que quando utilizados esses valores para o cálculo do VMP obtém-se um valor 23 vezes maior que o VMP de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ proposto nesse estudo. Além disso, o menor valor de LOAEL encontrados em estudos de CH relacionado à água potável foi estabelecido por Poon et al. (2000) na dose de $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, que ao ser empregado para o cálculo do VMP obtém-se o valor de $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$, valor também acima (6 vezes) do VMP de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ proposto nesse estudo.

Portanto e conforme recomendação da OMS (2000), basta apenas um efeito adverso observado para que possa ser posta em prática a realização da avaliação de risco.

6 CONCLUSÃO

Considerando os dados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- A estabilidade da solução de CH apresentou uma tendência de decaimento nos valores de concentração da solução entre 17 e 21 dias após a sua preparação. Nesse trabalho, foi adotado como medida de prevenção para garantia da exatidão de doses, o tempo de 11 dias como sendo o tempo máximo de uso da solução a ser administrada aos animais nos diferentes testes empregados;
- Foi identificado o NOAEL do CH na dose de $9,60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.
- Foi identificado o LOAEL do CH na dose de $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.
- Considerando o valor encontrado de NOAEL na dose de $9,60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ utilizado para o cálculo do VMP, obteve-se o valor de $2,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH.
- Considerando o valor de LOAEL do CH encontrado na dose de $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ o VMP obtido foi de $0,023 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH, valor próximo ao $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ estabelecido pela Austrália e Nova Zelândia.
- Destaca-se que o VMP de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH é 5 vezes mais restritivo que o VMP de $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ para THM citado na legislação do Brasil.
- Nesse trabalho foi obtido VMP de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH, ou seja, uma pessoa pode ingerir água potável diariamente contendo até $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH durante toda a vida (média de 70 anos) sem que o mesmo ofereça riscos à sua saúde.
- Sugere-se a realização de novos trabalhos com a administração de doses de CH por um período mais longo, de modo a estabelecer definitivo e inequívoco este valor.

REFERÊNCIAS

- BELLAR, T. A.; LICHTENBERG, J. J.; KRONER, R. C. The Occurrence of Organohalides in Chlorinated Drinking Waters. **Journal - American Water Works Association**, v. 66, n. 12, p. 703–706, 1974.
- BENSON, R. **Toxicological review of chloral hydrate**. Washington, DC: USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2000.
- BLACK, K. E.; BE, P. R. Rate and extent NOM removal during oxidation and biofiltration. **Water Research**, v. 52, p. 40–50, 2014.
- BUDAVARI, S. **The Merck index: an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals**. 12. ed. New Jersey: Whitehouse Station, 1996.
- BUTIÃO, D. F. **Formação de subprodutos orgânicos halogenados da desinfecção em águas de piscinas**. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2011.
- CANTOR, K. P. et al. Drinking water source and chlorination byproducts in Iowa. III. Risk of Brain Cancer. **Brain Cancer and Drinking Water Source**, v. 150, n. 6, p. 552–560, 1999.
- CARLINI, E. A. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25–31, 1979.
- DABROWSKA, A.; NAWROCKI, J. Controversies about the occurrence of chloral hydrate in drinking water. **Water Research**, v. 43, n. 8, p. 2201–2208, 2009.
- DANIEL, F. B. et al. Ninety-Day Toxicity Study of Chloral Hydrate in the Sprague-Dawley Rat. **Drug and chemical toxicology**, v. 15, n. 3, p. 217–232, 1992.
- DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. **Florações de algas e de cianobactérias: Suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento**. 1. ed. São Carlos: LDiBe, 2010.
- EDZWALD, J. K. **Water Quality e Treatment: A Handbook on Drinking Water**. 6^a ed. New York: American Water Works Association (AWWA), 2011.

EIKEBROKK, B.; VOGT, R. D.; LILTVED, H. NOM increase in Northern European source waters : discussion of possible causes and impacts on coagulation / contact filtration processes. **Water Science and Technology: Water Supply.**, v. 4, n. 4, p. 47–54, 2004.

ESTEVEES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FERNANDES NETO, M. DE L.; SARCINELLI, P. DE N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitaria Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 69–78, 2009.

FORSBERG, C. Will an increased greenhouse impact in Fennoscandia give rise to more humic and coloured lakes? **Hydrobiologia**, v. 229, p. 51–58, 1992.

GEORGE, M. H. et al. Carcinogenicity of Chloral Hydrate Administered in Drinking Water to the Male F344/N Rat and Male B6C3F1 Mouse. **Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 4, p. 610–618, 2000.

HEALTH CANADA. **Guidance on Chloral Hydrate in Drinking Water**. Ottawa, Ontario: Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, 2008.

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian drinking water quality—Summary table** Water, air and climate change bureau, healthy environments and consumer safety branch, 2017.

HESPANHOL, I. A inexorabilidade do reúso potável direto. **Revista DAE**, v. 63, n. 198, p. 63–82, 2015.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Rio de Janeiro, 2007.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Principais Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

- KAUFFMANN, B. M. et al. Humoral and Cell-Mediated Immune Status of Mice Exposed to Chloral Hydrate. **Environmental Health Perspectives**, v. 44, p. 147–151, 1982.
- KLINEFELTER, G. R. et al. Preliminary screening for the potential of drinking water disinfection byproducts to alter male reproduction. **Reproductive Toxicology**, v. 9, n. 6, p. 571–578, 1995.
- KORTH, A. et al. NOM increase in drinking water reservoirs – relevance for drinking water production. **Water Science and Technology: Water Supply.**, v. 4, n. 4, p. 55–60, 2004.
- LYKINS, B. W.; KOFFSKEY, W. E.; PATTERSON, K. S. Alternative Disinfectants for Drinking Water Treatment. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, n. 4, p. 745–758, 1994.
- MARRENGULA, F. A. **Avaliação da filtração direta descendente no tratamento de efluente de estação de tratamento de esgoto para reúso não potável.** Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2016.
- MARTIN, D. W.; HARPER, H. A.; MAYES, P. A. **Review of biochemistry.** [s.l.] Lange Medical Pub, 1981.
- MCEVOY, G. K. **American Hospital Formulary Service Drug Information 99.** 40. ed. Bethesda, MD.: American Society of Health-System Pharmacists, 1999.
- MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Secretaria do Meio ambiente Ciência e Tecnologia do Distrito Federal.**, v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011.** Brasil, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de consolidação nº5, de 28 de Setembro de 2017.** Brasília, DF, Brasil, 2017. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html>. Acesso em: 9 ago. 2018
- NORUP, P. W. Sleeping disturbances and pharmacological/nonpharmacological

interventions in old people. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina**, v. 57, n. 1, p. 530–534, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Programa Internacional de Segurança Química: Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2000.

PASCHOALATO, C. F. P. R. **Efeito da pré-oxidação, coagulação, filtração e pós-cloração na formação de subprodutos orgânicos halogenados em águas contendo substâncias húmicas**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2005.

PASCHOALATO, C. F. P. R.; TRIMAILOVAS, M. R.; DI BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 313–322, 2008.

POON, R. et al. Subchronic toxicity of chloral hydrate on rats: a drinking water study. **Journal of Applied Toxicology**, v. 22, p. 227–236, 2002.

POON, R.; NADEAU, B.; CHU, I. Biochemical effects of chloral hydrate on male rats following 7-day drinking water exposure. **Journal of Applied Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 455–461, 2000.

ROOK, J. J. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. **Water Treat. Exam.**, v. 23, p. 234–243, 1974.

ROSÁRIO, G. DO. **Monitoramento do potencial de formação de subprodutos orgânicos halogenados em mananciais para o controle da etapa de pré oxidação nas estações de tratamento de água**. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2012.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam Attenuates Morphine Antinociception Test-Dependently in Mice. **Pharmacology e Toxicology**, v. 66, n. 5, p. 382–386, 1990.

SADIQ, R.; RODRIGUEZ, M. J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: A review. **Science of the Total Environment**, v. 321, n. 1–3, p. 21–46, 2004.

SANDERS, V. M. et al. Toxicology of chloral hydrate in the mouse. **Environmental Health Perspectives**, v. 44, p. 137–146, 1982.

SINGER, P. C. Control of Disinfection By-Products in Drinking Water. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, n. 4, p. 727–744, 1994.

STEVENS, A. A. et al. Chlorination of Organics in Drinking Water. **Journal - American Water Works Association**, v. 68, n. 11, p. 615–620, 1976.

THOMPSON, T. et al. **Chemical Safety of Drinking-Water: Assessing Priorities for Risk Management**. Geneva: World Health Organization, 2007.

UMBUZEIRO, G. DE A. **Avaliação de risco toxicológico**. Workshop: Estratégias para definição de critérios ambientais para proteção da saúde humana e do ecossistema: Substâncias Químicas. **Anais...**Jundiaí: 2009

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION. **Toxicological review of Chloral Hydrate**. Washington, DC, 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual**, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **How EPA Regulates Drinking Water Contaminants**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwregdev/how-epa-regulates-drinking-water-contaminants#decide>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chloral Hydrate in Drinking-water**. 3. ed. [s.l.] Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2005.

ANEXO A

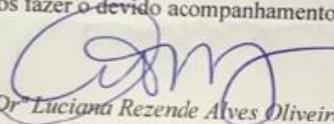


Ribeirão Preto, 7 de maio de 2018.

Prezado(a) Pesquisador (a) Dr^a Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada ‘**AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE DO CLORAL HIDRATADO EM ÁGUA POTÁVEL**’, registrada sob o nº 01/2018”, e sob a responsabilidade do (a) **pesquisador (a) Dr^a Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UNAERP, em reunião realizada em 18/04/2018.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.


Prof^a Dr^a Luciana Rezende Alves Oliveira

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Ribeirão Preto

Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa
Vigência da Autorização: a partir de 18/04/2018
Espécie / Linhagem / Raça: Ratos Wistar Norvegicus
Nº de Animais: 120
Peso / Idade: 200g
Sexo: H
Origem: Biotério da Unaerp