Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Determinação dos potenciais toxicológicos em organismos aquáticos de resíduos de misturas de solventes orgânicos utilizados em laboratórios

Fábio Eduardo Penatti

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

Fábio Eduardo Penatti Geógrafo

Determinação dos potenciais toxicológicos em organismos aquáticos de resíduos de misturas de solventes orgânicos utilizados em laboratórios

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. VALDEMAR LUIZ TORNISIELO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Penatti, Fábio Eduardo

Determinação dos potenciais toxicológicos em organismos aquáticos de resíduos de misturas de solventes orgânicos utilizados em laboratórios / Fábio Eduardo Penatti. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015. 131 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

1. Toxicologia 2. Solventes 3. Resíduos 4. Efluentes 5. Organismos aquáticos I. Título

CDD 574.5263 P397d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

DEDICATÓRIA

A nossa vida está repleta de oportunidades e decisões. Durante todo o ciclo de um determinado período, a maneira que traçamos e escrevemos cada atitude de uma escolha efetuada, nos revela os desafios do caminho percorrido, porém, nos oferece também o melhor, o crescimento durante este percorrer.

Nesta fase da minha vida, que se iniciou na minha Graduação em Geografia, tive a oportunidade de tomar boas decisões felizes, e com isso consegui realizar um dos meus sonhos. Porém, nada teria se concretizado, se não existisse dois principais fatores que me influenciaram diretamente. O primeiro é uma pessoa que sempre me incentivou, e diretamente me ajudou durante essa jornada, o Sr. Paulo Silva, e o segundo está na figura da estrutura que me foi dada para desenvolver as duas principais pesquisas da minha carreira, que é a Bioagri Laboratórios (atualmente Mérieux Nutrisciences).

Portanto dedico este trabalho a estes dois fatores que até hoje tem me dado tantas alegrias na minha carreira profissional e também pessoal.

E aquilo que ele viu e ouviu isso testifica; e ninguém aceita o seu testemunho. Aquele que aceitou o seu testemunho, esse confirmou que Deus é verdadeiro. Jo 3:32-33

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, e meus pais por sempre me apoiarem em minhas decisões, e me incentivarem nos desafios que percorrem o meu caminhar.

A minha esposa Melly Elly, por sempre estar presente me dando todo apoio como uma verdadeira adjutora do lar. Aos meus filhos, Eduardo e Lucas, por quem me inspiro em cada respirar, e aprendo diariamente em cada passo.

Por todos os amigos que me ajudaram neste desafio, gostaria de agradecer especialmente ao meu orientador Prof. Valdemar, por tanta paciência e tempo desprendido durante todo o curso.

Agradeço também à Bioagri (atual Merieux NutriSciences) pelo apoio a este trabalho, e aos demais amigos: Celso Zaccaria, Andreza Pampolini, Josélia Sesso, Felipe Fusato, Lucas Mingatti, Alexander Betancourt, Adriano Doná, Felipe Colombi, Camila Gerdes, Paula Acedo, Everton Kestner, Andreza Ferreira, Sueli Silva, Gisele Marreto e Claudimir Penatti.

E por fim, e não menos importante aos parentes e amigos mais próximos que sempre me motivaram, e que, provavelmente sem eles, dificilmente iniciaria esta nova jornada: Gustavo Penatti, Vanessa Penatti, Bruna Caroline, Guilherme Zinsly, Richard Tranquilin, e todos irmãos da Célula, Daniel Borba, Marcelo Malta, André, Flavio Boaretto, Felipe Boaretto, Dimas Penatti e todos os demais que sempre estiveram próximos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Natureza da poluição	15
2.2 Poluentes químicos em corpos hídricos	19
2.2.1 Problemas causados pela contaminação de corpos hídricos	
por químicos orgânicos	23
2.2.2 Os solventes orgânicos em ambientes aquáticos	24
2.2.3 O uso dos solventes orgânicos em laboratórios de análises	
químicas	33
2.3 Análises comparativas sobre parâmetros e normas nacionais e	
internacionais que estabelecem limites de contaminação para águas	
superficiais e subterrâneas	40
2.4 Os estudos ecotoxicológicos como indicadores de	
contaminantes em ambientes aquáticos	44
2.4.1 Organismos-teste dos ensaios	
superficiais e subterrâneas	46
3 OBJETIVO GERAL	51
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
5 MATERIAIS E MÉTODOS	54
5.1 Determinação da CE ₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol,	
clorofórmio, diclorometano e suas misturas utilizando	
microcrustáceos	55
5.1.1 Cultura estoque / Água de manutenção teste	57
5.1.2 Soluções teste para <i>Daphnia magna</i> e <i>Daphnia similis</i>	59
5.1.3 Soluções teste para Ceriodaphnia dúbia	59
5.1.4 Procedimento experimental para os ensaios com <i>D. magna</i> e	
D. similis	59
5.1.5 Procedimento experimental para os ensaios com C. dúbia	61
5.2 Determinação da CL ₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol,	
clorofórmio, diclorometano e suas misturas do teste de toxicidade.	

aguda em <i>Danio rerio</i>	61		
5.2.1 Preparo das soluções			
5.2.2 Procedimento experimental para os ensaios com <i>D. rerio</i>	63		
5.3 Determinação da CL ₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol,			
clorofórmio, diclorometanos e suas misturas dos testes de toxidade			
crônica em larvas de <i>D. rerio</i>	65		
5.3.1 Procedimento experimental dos ensaios crônicos com larvas			
de D. rerio	65		
5.3.2 Controles de Referências	66		
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67		
6.1 Determinação da toxicidade aguda pela CE ₅₀ de acetonitrila,			
metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas em D. magna			
e D. similis	67		
6.2 Determinação da CL_{50} da toxicidade aguda dos solventes em D .			
rerio	73		
6.3 Determinação da CL ₅₀ de acetonitrila, metanol, clorofórmio,			
diclorometano e suas misturas que causa toxicidade crônica em			
larva D. rerio.	76		
6.3.1 Resultados dos ensaios com as larvas de <i>D.rerio</i>			
6.4 Determinação da CE ₅₀ em <i>C. dubia</i> dos solventes acetonitrila,			
metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas	79		
6.5 Análises comparativa entre os solventes de um mesmo ensaio			
com diferentes organismos			
6.6 Análise comparativa dos resultados entre os ensaios de			
organismos diferentes			
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS			
8 CONCLUSÃO	92		
REFERÊNCIAS	93		
ANEXOS	103		

RESUMO

Determinação dos potenciais toxicológicos em organismos aquáticos de resíduos provenientes de misturas de solventes orgânicos utilizados em laboratórios

Resíduos líquidos são comumente gerados como subprodutos das análises físico-químicas em laboratórios. Grande parte destes resíduos são compostos por solventes orgânicos, e em muitos dos processos analíticos, não possuem sistemas de gerenciamento para destinação correta destes resíduos, sendo assim escoados diretamente nos sistemas de esgoto, podendo, desta forma, causar impactos significativos ecossistemas aquáticos nos estabelecimentos. Diante destes problemas, o presente trabalho mostrou, por meio de análises da toxicidade dos solventes orgânicos, que os solventes acetonitrila, metanol, diclorometano e clorofórmio, testados nos organismos aquáticos: Daphnia magna, Daphnia similis, Ceriodaphnia dúbia e Danio rerio, possuem toxicidades diferentes ao se comparar os testes com os tratamentos individuais com os testados por meio de suas misturas. Os resultados de toxicidade aguda dos tratamentos dos solventes não halogenados individuais, ficaram na faixa de 5.000 mg.L-1 a 21.764 mg.L⁻¹, e os tratamentos com a mistura de solventes ficaram na faixa de 707 mg.L⁻¹ ¹ a 3.404 mg.L⁻¹, demonstrando que as misturas dos solventes halogenados com não halogenados potencializam a toxicidade em torno de 6 a 7 vezes, se comparados com a toxicidade dos ensaios com os tratamentos individuais. Da mesma forma, para os ensaios crônicos, as maiores concentrações com os solventes testados individualmente ficaram na faixa de 625 mg.L-1 a 1.562 mg.L-1, sendo que as misturas de todos os solventes, ficaram na faixa de 125 mg.L-1 a 312 mg.L-1, mostrando assim uma potenciação da toxicidade em torno de 5 vezes.

Palavras-chave: Microcrustáceos. Produtos. Peixes. Efluentes. Meio Ambiente

ABSTRACT

Determination of the toxicological potential in aquatic organisms for residues from organic solvent mixtures used in laboratories

Liquid wastes are commonly generated as by-products of physicochemical analyses in laboratories. Most of these residues are comprised of organic solvents, and in many analytical processes, there are no management systems for proper disposal of the wastes. Thus, they are drained directly into the sewer systems and might thus cause significant environmental impacts to the nearby aquatic ecosystems. Faced with these problems, this study has shown, through the toxicity of organic solvents analyses, the acetonitrile solvent, methanol, dichloromethane and chloroform, tested on aquatic organisms: Daphnia magna, Daphnia similis, Ceriodaphnia dubia and Danio rerio have different toxicities when compared to the tests with the individual treatments tested through their mixtures. The results of acute toxicity of individual treatments of non-halogenated solvents were in the range of 5.000 mg.L⁻¹ to 21.764 mg.L⁻¹. The treatments with mixtures of solvents were in the range of 707 mg.L⁻¹ to 3.404 mg.L⁻¹. These results show that mixtures of the halogenated solvents with non-halogenated potentiate the toxicity, approximately 6 to 7 times, compared to the toxicity tests with the individual treatments. Likewise, for the chronic studies the higher concentrations with solvents individually tested were in the range of mg.L⁻¹ to 1.562 mg.L⁻¹, and the mixtures of all solvents, were in the range of 125 mg.L⁻¹ to 312 mg.L⁻¹, showing a potentiation of toxicity around 5 times.

Keywords: Microcrustaceans. Products. Fishes. Effluents. Environment

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental vem despertando a sociedade para uma reflexão sobre os questionamentos que envolvem a continuidade da vida na Terra. Este pensamento torna o homem, a cada dia, mais consciente das mudanças que suas ações provocam no meio ambiente, especialmente se essas alterações influenciam diretamente as condições do entorno, prejudicando a sua própria qualidade de vida.

Os resíduos químicos de laboratório se caracterizam como poluentes por apresentarem riscos à saúde humana e ao meio ambiente (BRASIL, 2004). No caso de não serem manuseados de acordo com metodologias seguras, baseadas em legislações vigentes, podem se tornar potencialmente poluentes de solos, subsolos, águas superficiais e subterrâneas. Este fato pode levar essas atividades a uma situação de risco, ou até mesmo de perigo ambiental, podendo se converter em cenários de desastres ambientais de grande magnitude, com mudanças expressivas no meio ambiente afetado.

Muitas formas de interações do homem com o meio ambiente podem deteriorar efetivamente o equilíbrio do ecossistema. Uma delas provém diretamente da necessidade humana de consumo de bens materiais, sejam eles duráveis ou não-duráveis, que permitam uma vida confortável, independente dos danos causados pela sua produção. Entre estas ações, por exemplo, estão os rejeitos industriais gerados pelo uso de insumos destinados à produção de bens materiais. Parte desses rejeitos não recebe tratamento eficaz e preventivo relacionado aos impactos ambientais negativos. Dentre estes insumos estão os solventes orgânicos, utilizados em larga escala pela indústria, mas nem sempre destinados corretamente e legalmente.

Há grande diversidade de usos desses solventes, tais como domésticos, produção industrial, desengraxantes industriais, até análises químicas laboratoriais específicas. Os solventes orgânicos são usados também como principais meios diluentes para os diferentes processos de análises físico-químicas laboratoriais, principalmente quando estes ensaios envolvem substâncias-teste de compostos orgânicos, como, por exemplo, saneantes biodegradáveis, agrotóxicos, fármacos, entre outros. A maioria destes solventes tem um poder muito forte de interação com a água, de forma que sua presença no meio ambiente é praticamente imperceptível, se considerarmos que a sua solubilidade é alta em corpos hídricos e na umidade presente nos solos (POHANISH; GREENE, 1997). O grande problema enfrentado,

atualmente, é que as concentrações destes compostos encontrados em águas superficiais e subterrâneas, assim como nos solos, podem afetar consideravelmente o equilíbrio destes ecossistemas, dependendo do grau de toxicidade destes resíduos, principalmente se encontrados em soluções com mais de dois componentes.

Devido a esses fatos, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que enfoquem as principais consequências ambientais referentes ao contato dos resíduos líquidos, provenientes de análises físico-químicas laboratoriais, com os corpos de águas, como os estudos ou ensaios de toxicidade aquática. Ao se considerar que laboratórios de análises e pesquisas da área química, utilizam solventes como a principal forma de diluição de amostras, ou como fase de arraste em equipamentos, pode-se considerar que uma amostragem representativa da grande variedade destes produtos utilizados nos laboratórios é composta pela acetonitrila, metanol, diclorometano e clorofórmio. Diante desta afirmação, e considerando a importância do desenvolvimento de ensaios de toxicidade aquática com tratamentos utilizando estes solventes, pose-se constatar quais seriam os potenciais impactos destes produtos se descartados diretamente em corpos d'água.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Natureza da poluição

Os riscos ao meio ambiente, provenientes de agentes químicos, derivam de muitos processos industriais, comercialização de produtos, e também do setor de prestação de serviços, como é o caso dos laboratórios de análises químicas. Fontes de poluição são encontradas nesta categoria de serviço, quando os seus aspectos ambientais não são controlados e monitorados através de um sistema de gerenciamento ambiental. A partir deste fato, pode-se considerar que laboratórios, assim como as indústrias, podem alterar diretamente determinadas condições ambientais devido às suas instalações, uso de recursos naturais em seus processos, entre outras atividades. Devido a estas alterações, estas atividades são responsáveis por causar mudanças nos elementos constituintes do meio ambiente, a exemplo do ar, água, terra e seres vivos, por se caracterizarem como fontes de poluição efetivas ou potenciais. Segundo Christofoletti (1995), esta afirmação somente pode ser confirmada por meio de estudos sobre as alterações nas características quantitativas e qualitativas em diferentes geossistemas, e também por análises geográficas das organizações espaciais.

A poluição ambiental é considerada como a união de vários aspectos que podem causar a contaminação do ar, das águas, do solo, a descaracterização da paisagem, entre outras formas de degradação dos constituintes do espaço (FALLENBERG, 1980). Legalmente a poluição, de acordo com a Lei 6938/81, é definida como:

A degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente:

- a) prejudiquem a saúde, a segurança e o bem estar da população;
- b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;
- c) afetem desfavoravelmente a biota;
- d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;
- e) lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos (BRASIL, 1981, p. 1);

A poluição ao meio ambiente caracteriza-se quando o risco ambiental é consequência de potenciais perigos que estão presentes, não somente em eventos geofísicos, como terremotos ou inundações, mas também em fatos de origem humana, como os resíduos industriais, acidentes de transporte, dispersão de gases

poluentes, entre outras ameaças tecnológicas que também podem ser consideradas como fontes de poluição. Segundo dados do Sistema de Informações sobre Emergências Químicas (SIEQ) da CETESB, dos 8573 acidentes registrados em 2011, 4,4% foram causados por descarte de resíduos indevido; por outro lado, os acidentes envolvendo transporte de substâncias químicas estão na ordem dos 42,1% (PIOLI, 2011).

Nas atividades laboratoriais também possuem fontes poluidoras, pelo fato de que nelas manuseiam-se produtos químicos rotineiramente, para a geração de dados através dos resultados das análises. Após a finalização das análises, os produtos deste processo são descartados de acordo com um sistema de controle de resíduos. Caso este controle não exista, ou se não for eficiente, o laboratório pode se torna um poluidor em potencial, desde a geração dos resíduos, armazenamentos, transportes, até a sua destinação final.

De acordo com Fallenberg (1980), o crescimento populacional segue na mesma proporção do crescimento da geração de resíduos ou subprodutos originados de finais de processos industriais, descarte de efluentes doméstico, ou também a própria água utilizada na agricultura. Para este mesmo autor, dentro desta visão observa-se que os efeitos causados pela poluição da disposição ou descarte destes resíduos na natureza, possuem duas principais causas. A cultura moderna proporciona uma demanda de necessidades de produtos que acionam a produção, que desta forma, acionam vários processos produtivos (indústria e agricultura), dando origem às fontes de poluição. Por um outro lado, esta mesma sociedade, após o consumo destes produtos, também gera uma outra fonte de poluição, como a geração de efluentes e resíduos domésticos. Diante deste retrospecto, outro ponto importante que deve ser levado em consideração é quais são os atores que recebem os efeitos destas alterações no meio, sendo a própria sociedade, mas também outros indivíduos dos diversos tipos de ecossistemas atingidos em larga escala por estes poluentes (FALLENBERG, 1980).

Diante da atual conjuntura cultural da sociedade e do modelo produtivo, podese definir que a poluição dos ecossistemas está dividida em duas grandes ordens. A primeira ordem de poluição equivale aos aspectos naturais regidas pelas leis físicas da natureza no contexto da forma de sobrevivência da população, onde dificilmente seus impactos podem ser prevenidos. A segunda ordem é baseada nos impactos de acordos e decisões da própria sociedade diante da demanda de necessidades do seu estilo de vida. Este tipo de poluição está ligado à procedimentos técnicos, porém é negociável e pode ser prevenido (DUNGAN, 1972).

Mais precisamente a segunda ordem de poluição, que se relaciona ao impacto causado pelas fontes que tem como causa as próprias decisões e demandas da sociedade, neste ponto considera-se que os subprodutos gerados pelos processos produtivos são grupos de contaminantes mais expressivos e impactantes no meio natural (BURATINI; BRANDELLI, 2006). Para estes mesmos autores, para a Biologia estes subprodutos são considerados xenobióticos, por serem de difícil degradação por meios naturais e que a maioria foi sintetizado em laboratório, ou seja, são moléculas estranhas para os ecossistemas.

Desta forma, quando um produto ou composto xenobiótico é lançado em um ecossistema, como um corpo hídrico, por exemplo, ocorre uma interação complexa com este meio, devido a dinâmica de partição que possuem 3 fases:

- 1. Fase aquosa e a biota;
- 2. Fase aquosa e o sedimento;
- 3. O sedimento e a biota residente (BURATINI; BRANDELLI, 2006, p. 55).

Na abrangência destas 3 fases, de acordo com estes mesmos autores, a resposta do meio com relação à estas interações são diferentes, pois depende das características dos compostos, concentração e tempo de exposição ao meio. Diante das respostas do meio frente ao contato com as substâncias xenobióticas, pode ocorrer alterações bioquímicas ou fisiológicas em organismos individuais, mas também podem ocorrer mudanças mais severas atingindo níveis de toxicidade com uma amplitude que engloba toda a população de indivíduos expostos (BURATINI; BRANDELLI, 2006). A Figura 6 mostra o esquema de ação referente as substâncias xenobióticas, desde as organelas celulares até o ecossistema.

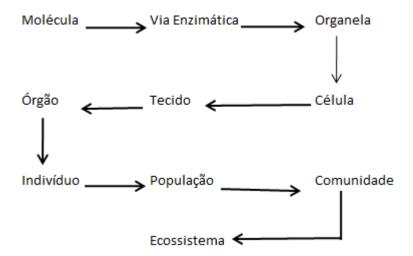


Figura 1 – Níveis organizacionais que podem se manifestar os efeitos dos poluentes (BURATINI; BRANDELLI, 2006, p. 55)

Os contaminantes gerados por subprodutos gerados pelos descartes de resíduos, em contato com o meio ambiente, apresentam perfis de impactos distintos, dependendo de sua composição. A persistência destas moléculas no ambiente pode definir o nível de impacto nas cadeias tróficas após a sua interação, devido à resistência destes compostos frente aos organismos decompositores. Nestes casos, os critérios estabelecidos de toxicidade de ensaios agudos ou crônicos, podem não detectar as consequências futuras dos efeitos de determinadas substancias no ambiente, como por exemplo os organoclorados (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

De acordo com Rand (1995) as misturas de produtos químicos que entram em contato com elementos da biota podem levar à alguns impactos negativos destas interações, geralmente por advir da conjunção de mais de dois contaminantes. Segundo este mesmo autor nos ambientes aquáticos, e também citado por Zagatto e Bertoletti (2006), os organismos podem estar expostos a misturas de muitas substâncias, que podem acarretar em vários tipos de efeitos:

- a. Efeitos sinérgicos: efeitos combinados de dois contaminantes é maior do que a soma dos efeitos individuais aplicados;
- Efeitos de potenciação: contaminante possui efeito tóxico somente quando aplicado com um outro contaminante;
- c. Efeitos antagônicos: existe uma interferência na ação tóxica dos contaminantes quando aplicados junto;

d. Efeitos aditivos: efeitos ocorrem quando existe uma adição dos contaminantes combinados resultando exatamente na soma dos efeitos quando aplicados individualmente.

2.2 Poluentes químicos em corpos hídricos

De acordo com Manning e Tiedmann (1995), no mundo são conhecidas aproximadamente 11 milhões de substancias químicas, porém estudos científicos que abordam os níveis de periculosidade são mínimos. Sem as informações necessárias dos reais efeitos na saúde humana e ao meio ambiente, fica difícil medir ou prever os efeitos dos impactos destes produtos, em caso de acidentes, por exemplo. Desta forma, diante deste retrospecto de falta de informações científicas de mensurabilidade dos impactos dos produtos químicos *in natura* no meio ambiente, os impactos do contato direto ou indireto das misturas destes produtos no solo ou na água, também são desconhecidos.

Como observado, um dos principais indicadores que mostram os potenciais toxicológicos no contato destes poluentes na natureza são os organismos aquáticos. De acordo com Baird (2002), a probabilidade de poluentes líquidos entrar em contato e contaminar águas superficiais e subsuperficiais é muito alta, principalmente em regiões tropicais devido à maior presença de chuvas, do que climas temperados, por exemplo. Diante desta afirmação, ao se observar a ocorrência do primeiro contato dos produtos *in natura* ou subprodutos (misturas) de características físicas líquidas ou sólidas com o solo durante um determinado período, estes compostos infiltram-se verticalmente entre as partículas agregadas sólidas do solo, até atingirem o lençol freático (BRADY, 1976).

Sendo o solo o primeiro meio de contato com estes resíduos, antes mesmo de serem escoados para um canal fluvial ou um lençol freático, consideramos que antes de alterar a vida aquática estes produtos impactam a microfauna presente nesta biota. Para Sisino (2000), nos solos acontecem continuamente complexas reações químicas, devido à presença de milhares de espécies de microorganismos, principalmente, no primeiro horizonte do solo. Portanto, a água que permeia este solo tem a força de carrear compostos tóxicos e, mesmo os que têm baixa solubilidade em água, "podem alcançar facilmente o lençol freático, atingindo longas distâncias e contaminando outros ambientes e elos da cadeia alimentar" (SISINO, 2000. p. 65).

Para Canter (1996), a poluição das águas superficiais pode ser evidenciada pelo escoamento de quantidades excessivas de substâncias específicas, por um período de tempo, com reconhecidos efeitos negativos para a qualidade da água. Portanto, nas águas superficiais, a contaminação por estes produtos é ocasionada pela entrada de poluentes escoados pelas águas das chuvas, lixiviados, transportados superficialmente de locais onde houve vazamentos, derramamentos ou descarte clandestino de resíduos líquidos ou sólidos, classificados como não inertes.

Como complemento do processo de contaminação descrito, é importante ressaltar que a solubilidade, pH, temperatura, constante de dissociação, volatilização, dissipação e lixiviação são os principais mecanismos que determinam o impacto destes contaminantes no meio ambiente (COELHO, 2001).

Portanto, os diferentes compartimentos do ecossistema, coluna d'água e materiais em suspensão ou sedimentos, dependem do tipo de descarga e das propriedades físicas e químicas do produto de origem, ou do subproduto originado por meio das misturas advindas dos processos produtivos. Os poluentes dos ecossistemas aquáticos podem ser agrupados em três categorias principais:

- Material flutuante (óleos e graxas), eles retardam o crescimento das plantas aquáticas pelo bloqueio da luz solar;
- Material em suspensão responsáveis pela formação de lodo que pode asfixiar as bactérias aeróbicas comprometendo os sedimentos, assim como a formação de gases e odores desagradáveis;
- Material em solução, como ácidos, álcalis, metais-traço e compostos xonobióticos, podem destruir a vida aquática e transformam a água em imprópria para qualquer uso (SELL, 1992).

Conhecidos os potenciais de contaminação das águas através dos variados grupos de poluentes existentes, pode-se agrupar as fontes de poluição em 3 grupos, a partir de sua distribuição espacial: águas residuárias urbanas, águas residuárias de origem agropecuária e águas residuárias industriais (FALLENBEG, 1980, p. 71):

De acordo com este mesmo autor, as águas residuárias urbanas, caracterizase por conter detritos orgânicos, restos de alimentos, sabões, detergentes, ou seja, uma fonte de carboidrato, gorduras, material proteico, fosfatos, bactérias etc. A quantidade de detritos, geralmente, é mensurada de acordo com a quantidade de habitantes presentes na mesma área, porém existe uma diferença entre a quantidade gerada de efluentes por habitantes de grandes centros urbanos, como capitas e regiões metropolitanas, se comparado com o volume despejado de habitantes de comunidades menores. Este fato ocorre devido à diferença de padrões de consumo de água e qualidade de vida dependente de um consumo mais elevado de recursos. Sendo assim, os habitantes de grandes centros urbanos podem gerar de 2 a 3 vezes a mais de efluentes domésticos do que os habitantes de cidades menores. Dentre os principais contaminantes das águas, em países de características tropicais, pode se destacar a bacteriana e as substâncias degradáveis por ação bacteriana (FALLENBERG, 1980):

- a. Contaminação bacteriana: água onde a principal componente de contaminação é de origem fecal com a presença de alguns microrganismos prejudiciais à saúde humana, dentre ele a *Eschericha coli*. No Brasil existem algumas discrepâncias com relação ao seu controle de limites de presença na água potável. Algumas referências permitem a presença de menos de uma bactéria a cada 100 ml de água, outras, possuem critérios de não admitir nenhuma presença independe do volume.
- b. Contaminação por substancias degradáveis por ação bacteriana: estes contaminantes são caracterizados por substâncias orgânicas, detergentes e produtos de limpeza. Esta categoria de poluentes provocam a proliferação acelerada de colônias de bactérias, dando origem ao fenômeno de eutrofização as águas.

A terceira fonte de grupos de poluentes é representada pelas águas ou efluentes industriais. De acordo com a CETESB (1992), esta fonte de poluentes agrega uma toxicidade caracterizada por substâncias orgânicas e inorgânicas presentes nos processos industriais de diversos segmentos produtivos.

O outro grupo observado presente nos efluentes ou águas industriais são os compostos inorgânicos, tendo como principais poluentes os metais pesados e seus derivados. Dentre esses metais, o cádmio, o mercúrio e o chumbo são os poluentes que mais causam impactos nos ecossistemas por meio de sua interação, e por possuírem características acumulativas nos organismos vivos e vegetais, trazendo assim, alterações representativas nas paisagens naturais, assim como lesões

severas em órgãos internos do homem, e até a morte. (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

De acordo com a norma técnica da CETESB (2011) que trata da avaliação de riscos de acidentes de origem tecnológica, a classificação dos gases e líquidos tóxicos possuem quatro níveis de toxicidade, que pode ser verificado na Tabela 1. Estes níveis remetem a concentração letal via respiratória para animais silvestres, como ratos e camundongos que são determinados por ensaios com metodologias específicas (CETESB, 2011).

Tabela 1 – Nível de toxicidade para resultados de ensaios agudos

Nível de toxicidade*	mg.L ⁻¹
4 – Muito tóxica.	C < 500
3 – Tóxica.	500 < C < 5000
2 – Pouco tóxica.	5000 < C < 50000
1 – Praticamente não tóxica.	50000 < C < 150000

Fonte: CETESB (2011)

Da mesma forma que a CETESB, a Tabela 2 estabelece parâmetros para o nivelamento das faixas de concentração de toxicidade para os ensaios com organismos específicos, a Environmental Protection Agency – EPA, possui uma classificação semelhante, especificamente para organismos aquáticos. Porém, de acordo com a publicação desta instituição, a fase analítica desta avaliação de risco é específica para estudos com o objetivo de classificar e nivelar a toxicidade de pesticidas para organismos aquáticos (EPA, 2014).

Tabela 2 – Categorias de ecotoxicidade para organismos aquáticos para pesticidas

	Ensaios agudos
	em organismos
Categoria de toxicidade	aquáticos
_	Concentração
	(mg.L ⁻¹)
Extremamente tóxico	<0.1
Muito tóxico	0.1 - 1
Moderamente tóxico	>1 - 10
Levemente tóxico	>10 - 100
Praticamente não tóxico	>100
Fonto: FDA (2014)	

Fonte: EPA (2014)

Os dados da Tabela 3, foram extraídos de uma publicação deste mesmo órgão, com base em estudos toxicológicos com aves, e que também possuem uma listagem específica que parametrizam as faixas de concentrações e estabelecem os níveis de toxicidade para estudos de dosagens por via oral, e abaixo de 50 mg.L⁻¹ são considerados extremamente tóxicos, e acima de 5000 mg.L⁻¹ são considerados praticamente não tóxicos (EPA, 2005).

Tabela 3 – Faixa de toxicidade para ensaios subagudos em aves

Categorias de toxicidade de ensaios subagudos com aves baseados na concentração média letal em mg.L⁻¹ por dia

< 50	Extremamente tóxico
50-500	Muito tóxico
501 - 1000	Moderamente tóxico
1001 – 5000	Levemente tóxico
> 5000	Praticamente não tóxico

Fonte: EPA (2005, p. 2)

Portanto, em linhas gerais, os poluentes são gerados através de sínteses naturais ou artificiais entre compostos químicos, como por exemplo, polissacarídeos, açucares, proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, solventes, entre outros derivados. Tendo em vista que o meio ambiente não possui a capacidade de transformar as milhares de substâncias tóxicas existentes, principalmente, em concentrações que atingem níveis acima do que a natureza pode assimilar, torna-se vital o desenvolvimento de ações voltadas à sua conservação.

2.2.1 Problemas causados pela contaminação de corpos hídricos por químicos orgânicos

Aproximadamente um terço de todos os compostos orgânicos produzidos têm como destino o meio ambiente, incluindo a água. Cerca de 700 compostos químicos, incluindo mais de 600 compostos orgânicos, muitos dos quais biologicamente ativos, têm sido detectados em amostras de água. O Brasil, desde a década de 70, destaca-se como um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas. Porém, o único dado que nos dá uma indicação da escala em que são aplicados no Brasil são os valores de pesticidas em linha de comercialização, a partir dos quais destaca-se a grande utilização de herbicidas. As culturas responsáveis por este elevado

consumo são principalmente soja, cana-de-açúcar, milho e arroz (PRIMEL et al., 2005).

No Brasil, existem algumas legislações que definem os valores de concentrações mínimas que permitem sua disposição direta nas águas superficiais. Dentre os grupos de moléculas presentes nestes valores, existem as inorgânicas, como os metais, e as orgânicas, incluindo as moléculas de pesticidas mais comuns, e alguns solventes orgânicos, assim como as de demandas químicas e bioquímicas de oxigênio. As duas principais normas que regem estes parâmetros são a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 357/2005 (alterada pela CONAMA 397/2008 e CONAMA 430/2011), e a portaria 518/2004 de potabilidade da água, substituída pela Portaria MS n. 2.914/2011 (BRASIL, 2004, 2005, 2008, 2011a, 2011b). A CONAMA 357/05, apesar das alterações, é a norma principal que classifica as águas de acordo com as concentrações de contaminantes presentes. Esta norma é utilizada como referência nas análises físico-químicas da água, principalmente para verificar a presença de algumas moléculas de pesticidas. A portaria 2.914/2011 é utilizada para avaliar se as concentrações de contaminantes são mínimas para classificar a potabilidade da água, ou seja, para consumo humano. Nesta norma a quantidade de parâmetros são maiores que a da CONAMA 357/05, e os seus parâmetros são agrupados em: inorgânicos, microbiológicos, orgânicos, praguicidas, desinfetantes, organolépticos, radioatividade entre outras.

2.2.2 Os solventes orgânicos em ambientes aquáticos

A periculosidade dos produtos químicos, de acordo com a sua frequência de utilização, é o que vai estabelecer o nível do risco ambiental proporcionado, assim como o seu grau de toxicidade e reatividade relacionadas ao meio ambiente. Dificilmente é possível estabelecer limites seguros de prevenção dos despejos destes contaminantes no meio, pois existe uma quantidade variada de produtos diferentes, e o grau de segurança para estes descartes depende de fatores como intensidade e magnitude de uso (PENATTI, 2009).

Na ocorrência do contato e interação de poluentes químicos no meio aquático, verifica-se, como consequência, o seu transporte e distribuição para outras áreas próximas. Durante este processo, e de acordo com as condições apresentadas pelo meio, é possível a degradação destas moléculas formando, assim, alguns metabólitos. Portanto, o movimento das substancias no meio aquático

depende de fatores e condições do ambiente para o transporte, e os efeitos das propriedades químicas dos contaminantes ao serem transportados (LYMAN, 1995).

A presença dos químicos orgânicos no meio ambiente, como os solventes, segundo Lyman (1995), mesmo em baixas concentrações, ocorre por uma ou duas formas de fases, a fase dissolvida e a fase sorvida. Este transporte é conduzido por meio de vários processos de transformação destes químicos como pode-se observar na Tabela 4 e na Figura 7. Porém, de acordo com este mesmo autor, este processo é dinâmico pois depende inteiramente das condições do meio, como temperatura, pH, concentração dos sólidos em suspensão, população microbiológica etc, assim como o próprio comportamento da água para a neutralização ou ionização das moléculas dos contaminantes.

Tabela 4 – Lista de fases e processos de transporte e transformação dos contaminantes orgânicos em corpos hídricos

Fase de Transferência e Transporte		Dissolução	Processo de transporte de massa de químicos para ambientes aquáticos por derreamento ou disposição imprópria de resíduos. Nestes casos, os orgânicos podem permanecer na superfície da água (ex. gasolina, óleo etc), em forma de coluna de água, disperso em colóides e no fundo do corpo hídrico na forma de sedimentos mais pesados. Ainda a taxa de dissolução, também depende, de outros fatores como, volume e local de disposição, concentração da mistura na água, temperatura, teor de solubilidade do químico na água e a presença de outros orgânicos
	Transferência	Sorção de sólidos	Processo que envolve a transferência de um químico de um estado dissolvido para o interior de uma partícula sólida. A sorção de solutos orgânicos em sólidos suspensos ou sedimentados na superfície da água, é muito importante no processo de transferência que afeta a bioavaliabilidade e toxicidade do químico.
	Tran	Volatilização	Muitos orgânicos podem facilmente ser transportados fora da superfície da água, através da interface ar-água, sendo assim um processo de transferência ligado às propriedades químicas e ambientais, por possuir a possibilidade de mistura entre o movimento de uma fina espessura do corpo hídrico com o ar de contato com a superfície da água, e pelo químico possuir uma alta partição água-ar, de acorodo com a lei da constante de Henrry.
			Fração que penetra diretamente na atmosfera pelo fluxo da contaminação química, podendo ocorrer uma deposição seca, pela formação de gases ou aerosóis, ou uma deposição úmida, que envolve o transporte na superfície da terra, pela neve, chuva etc

	Transporte	Transporte de massa	Processo de movimento dos químicos em uma coluna de água durante o próprio movimento do corpo hídrico. Estes movimentos criam turbulências e misturam os químicos por dispersão e dissolução.
		Sedimentação	Processo de partição química entre o dissolvido e uma partícula sorvida baseado no coeficiente da partição de sedimento para água.
	Tran	Difusão	Movimentos de moléculas sob a influência de um gradiente de concentrações, de uma área de alta concentração para uma área de baixa concentração. A difução na água é um processo
		Deposição de fundo	relativamente lento e é importante para a determinação da porosidade média dos sedimentos de fundo de deposição.
		Hidrólise	Processo de transformação química, no qual a molécula orgânica reage com a água formando
Transformação	Processo Abiótico	E .//!	uma nova ligação de carbono-hidrogênio desprendendo um carbono-X da molécula original
		Fotolise	Processo de quebra das moléculas orgânicas pela luz do sol nas superfícies das águas, solo, ou atmosfera, e outras superfícies, como as das plantas. As fotoreações podem ser predominantes em processos de muitos componentes no ar ou na água limpa que cria produtos de oxidação em larga escala, devido a água ser mais solúvel, baixa volatilidade, monos sujeito à ações microbiológicas.
ısfoı	<u> </u>		Reações de dissociações de químicos orgânicos em meio ácido ou alcalino.
Tran		Oxidação/ Redução	
	Processo Biótico		Tem como ocorrência no solo ou na água pelas condições aeróbicas ou anaeróbicas dos microorganismos, bactérias, fungos e algas. Porém na maioria das vezes as reações químicas
		Biodegradação anaeróbica	ocorrem na água por envolver a matéria orgânica na presença de micoorganismos intermediários.

Fonte adaptada pelo autor: Rand (1995).

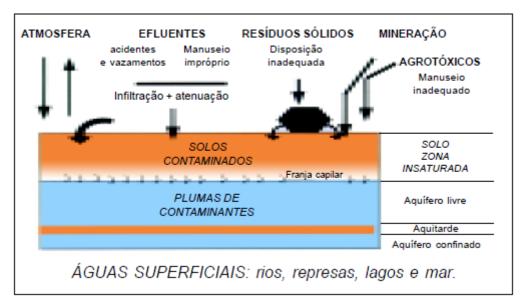


Figura 2 – Vias de transporte e acumulação de contaminantes em solos e águas Fonte: CETESB (2001)

Com relação aos problemas que estes produtos podem causar nos organismos presentes na água ou no solo, na Tabela 5 constam as informações dos principais solventes orgânicos utilizados em análises químicas, indústrias, e demais processos, devido ao fato de serem um dos grupos de produtos químicos mais utilizados em laboratórios. Estas informações foram extraídas de suas respectivas Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQs) (PENATTI, 2009).

Com base nas informações contidas na Tabela 5 pode-se analisar e avaliar quais produtos são considerados mais tóxicos ao entrarem em contato com o meio ambiente aquático. Estas informações são retiradas dos dados ecotoxicológicos oferecidos a partir dos parâmetros da *Concentração Letal Cinquenta* (CL₅₀), *Concentração Letal Mínima* (CLLo) e *Limite de toxicidade-Teste de Inibição da Multiplicação Celular* (L. Tox-T.I.M.V.C), dependendo da disponibilidade dos dados nestas fichas.

Com base nas informações desta mesma Tabela, pode-se constatar que o solvente tolueno é o qual possui maior potencial de impacto no ambiente aquático como demonstrada por concentrações letais em peixes da espécie *Lepomis macrochirus*. Outro organismo testado, e mostrado no quadro, foi a alga da espécie *Microsystis aeruginosa*, em que o solvente considerado mais tóxico foi o formaldeído, devido ao seu poder de inibir a multiplicação celular destas algas na

concentração de 0,39 mg.L⁻¹. Outros solventes também utilizados com frequência e que foram expostos os seus efeitos tóxicos nas mesmas diretrizes de exposição e com os mesmos organismos, foi a acetona, que oferece riscos aos peixes na concentração de 6.100 mg.L⁻¹ e às algas com 530 mg.L⁻¹, e o álcool etílico, que somente na concentração de 7.000 mg.L⁻¹ oferece riscos à espécie de peixes *Semolitus atromaculatus* e com 1.450 mg.L⁻¹ às algas. Com estas informações, pode-se considerar somente a toxicidade de alguns produtos nos meios mais representativos em testes de laboratório, mas, obviamente, não podemos estabelecer o impacto real em ecossistemas aquáticos em caso de contatos acidentais com estes produtos, pois é muito difícil simular tais testes, devido à imensa variedade de mecanismos de respostas que o meio natural oferece para este tipo de contato.

Tabela 5 – Informações ecotoxicológicas dos principais solventes orgânicos utilizados em laboratórios

Produto	Valor da CL ₅₀ em peixes (mg.L ⁻¹)	Valor do Limite de toxicidade em algas** (mg.L ⁻¹)
Acetona	6100	530
Acetonitrila	1.850	520
Álcool Isopropílico	11.130	1.000
Benzeno	36,6 em 24h (Lebistes reticulates)	1.400
Ciclohexano	57 em 24h (Lebistes reticulates)	Dados indisponíveis
Clorofórmio	102 (14 dias)	185
Diclorometano	294 Poecilia reticulata(14	Dosagem Letal = 125
Álcool Etílico	dias) > 7.000 Semolitus atromaculatus (24 h)	Scenedesmus SP 1.450
Eter de Petróleo	1 - 10	1 - 10
Formaldeído	Limite da toxicidade = 50 - 200 (tempo não determinado) (Lebistes reticulates)	0,39
Hexano	4 Carassius auratus (24 h)	Dados indisponíveis
Álcool Metílico	morte a 250, em 11 h (<i>Carassius auratus</i>)	Dados indisponíveis
Piridina	1.350 Limite da toxicidade em 24 h Gambusia affinis	28
Tetracloreto de Carbono	125 (96 h)*	105
Tolueno	24 *	105
Xileno	22 (96 h)*	Dados indisponíveis

Fonte: CETESB (2011; 2012); Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos – Labsynth teste em organismos aquáticos em geral

Nota 1: * toxicidade em peixes da espécie Lepomis macrochirus em uma exposição de 24 horas

Nota 2: ** limite da toxicidade em algas da espécie Microsystis aeruginosa

Outro ponto relevante relacionado aos impactos dos solventes orgânicos em meios aquáticos é a formação dos trihalometanos (THMs), mais precisamente

relacionados à solventes clorados nas águas superficiais. De acordo com Zarpelon e Rodrigues (2004), os THMs são constituídos por um grupo de compostos orgânicos derivados do metano (CH4) com a presença de átomos halógenos, como cloro, bromo ou iodo. Dentre estes compostos formados, pode-se citar solventes orgânicos utilizados em laboratórios, como clorofórmio, dibromoclorometano, entre outros. Porém, segundo estes mesmos autores devido aos complexos mecanismos de formação do THM, para a ocorrência destes compostos é necessário a presença de cloro livre e de precursores orgânicos, como o húmus, por exemplo, para que ocorra a reação de formação. Dentre os THMs formados a partir de reações bioquímicas na presença de metano, matéria orgânica e cloro, alguns estudos com roedores mostram que em algumas dosagens o clorofórmio possui, também, efeitos carcinogênicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO,1994).

Em um estudo sobre a retrospectiva da mortalidade por câncer relacionada à presença de THMs na água potável em regiões do norte da Itália, desenvolvido por Vincenti et al. (2004) mostrou que os dois principais compostos presentes na água foram o clorofórmio e o bromodiclorometano. De acordo com este estudo, a presença de um alto teor de clorofórmio na água potável está associado ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, como no estômago, pulmão, fígado, e até de mama, em homens e mulheres entre os anos de 1965 e 1999, com um leve aumento entre os anos de 1987 e 1999.

Como o uso do cloro para limpezas e desinfecções em geral são de utilidades padrões em qualquer lugar, principalmente para cloração da água, tornando-se, assim, possíveis a formação de THMs em qualquer parte do mundo que utilizam produtos à base de cloro em larga escala (ZARPELON & RODRIGUEZ, 2004). Um outro estudo efetuado na região de Kanpur na Índia (MISHRA; DIXIT; SRIVASTAVA, 2012) também mostrou a presença de clorofórmio na água subterrânea devido à formação de THM. De acordo com as análises, deste estudo, as concentrações foram encontradas abaixo do limite estabelecido pela WHO de 300 µg.L⁻¹, estando em uma faixa entre 14 µg.L⁻¹ a 17 µg.L⁻¹, como resultados analíticos efetuados entre Janeiro e Maio de 2009, em amostras com o teor de cloro que encontravam em torno de 14 mg.L⁻¹ a 17 mg.L⁻¹. Neste mesmo continente, em Taiwan, um estudo mostrou a relação entre a presença de THMs na água potável com o risco de câncer. De acordo com os autores do trabalho, os resultados mostraram que um alto risco de se adquirir câncer, principalmente quando ocorre a formação de clorofórmio,

devido ao seu contato por inalação. Outros THMs como diclorobromometano e clorodibromometano, os riscos de se adquirir a doença, é por via oral, absorção dermal, além dos riscos por inalação (WANG; DENG; LIN, 2007).

Com este mesmo enfoque, estudos também mostram a presença de THMs no continente norte americano. De acordo com a avaliação da presença destes compostos em três sistema de distribuição de água em Quebec no Canadá, *Saint-Foy, Lévis* e *Charlesbourg,* mostraram que as concentrações variam de acordo com o teor de cloração na água, temperatura e presença de plantas aquáticas (TOC – carbono orgânico) nos reservatórios (RODRIGUES; SÉRODES, 2001). Outro estudo importante sobre a presença de THMs na água potável do Canadá, foi desenvolvido por Rodriguez, Vinette e Bouchard (2002), que relataram a ocorrência destes compostos na água potável de uso doméstico, comercial e industrial da Grande Quebec. De acordo com os principais resultados deste estudo, que teve uma duração de 16 meses de coleta de amostras e análises laboratoriais, notou-se que as concentrações de THM na água mudam sazonalmente, de acordo com as estações do ano, e também com a localização do sistema de distribuição, sendo as concentrações encontradas nas amostras na faixa de 39 µg.L-1 a 112,7 µg.L-1, com faixas de cloro para a desinfecção da água, em torno de 2,3 mg.L-1 a 4,6 mg.L-1.

Assim como os estudos na América do Norte, mais precisamente no Canadá, revelaram a presença de THMs na água potável, no Brasil também pode-se destacar um estudo elaborado por Andreola (et al., 2005) no estado do Paraná. Segundo estes autores, o objetivo deste estudo foi de verificar a presença de THMs em uma estação de tratamento de água e a relação da concentração encontrada com a quantidade de matéria orgânica ao longo do processo e em dois períodos do ano, o chuvoso e de estiagem. Os resultados das análises verificaram que as concentrações de THMs no período chuvoso foi maior do que a encontrada no período de estiagem estando na faixa de 10 µg.L-¹ a 60 µg.L-¹, variando de acordo com os pontos de amostragem. Esta diferença é devido ao fato de que no período chuvoso a presença de matéria orgânica advindo do húmus (decomposição da matéria orgânica vegetal) é maior do que o outro período analisado, com a presença de uma carga de cloro maior no período de estiagem, comparado ao período chuvoso.

2.2.3 O uso dos solventes orgânicos em laboratórios de análises químicas

De acordo com o manual de química experimental elaborado por Chrispino (1997, p. 7): "Laboratório é um local selecionado que oferece condições para que o experimentação científica desenvolva uma para comprovar conhecimentos expostos teoricamente". Existem laboratórios com diversas funções na sociedade, e que se encontram nas três linhas principais de pesquisas científicas: exatas, biológicas e humanas. Para Lainha (2003), a sociedade, os laboratórios exercem a função de buscar respostas e provas científicas que possibilitem melhorias para o bem estar da população. Nestes locais são realizadas experiências, análises e pesquisas, com o objetivo de apresentar resultados de interesses coletivos ou individuais, assim como de melhorar a qualidade dos produtos utilizados pela população, além de exames clínicos, avanços tecnológicos, entre outros.

Os laboratórios de análises químicas estão inseridos na linha de pesquisa das ciências exatas e biológicas. Nestes locais são efetuadas atividades que exigem a prática de reações, transferência de substâncias de diversos tipos de produtos, processos químicos etc. Estas atividades devem ser desempenhadas com técnicas, boas práticas e proteção à saúde do operador, para que os riscos presentes nestes processos não comprometam a sua integridade física e os resultados adquiridos (SILVA; CARREIRA, 2003; BRASIL, 2008).

Segundo Silva e Carreira (2003), cuja opinião foi exposta em um curso sobre gerenciamento de resíduos em laboratórios, os resíduos gerados pelos laboratórios são subprodutos das análises, que podem conservar ou potencializar as características dos produtos químicos que os originaram, podendo assim causar danos diretos ou indiretos ao solo, água ou ar. Portanto, o uso de solventes orgânicos para a efetivação de algumas análises, assim como a destinação dos resíduos gerados por estes produtos, deve ser realizado com técnicas específicas de segurança, para que não comprometa a saúde da equipe laboratorial, e evitando, ao máximo, riscos potenciais ao meio ambiente, devido à periculosidade e toxicidade dos compostos dos resíduos.

Com relação aos estudos sobre os resíduos gerados em laboratórios de análises físico-químicas, considera-se que a geração de resíduos é um dos principais aspectos ambientais desta atividade (SILVA; CARREIRA, 2003). Os subprodutos gerados pela maioria das análises físico-químicas, e que são gerados

pela diluição com solvente orgânico de algum tipo de amostra, são encontrados no estado físico líquido, com as mais complexas composições químicas. Estes mesmos subprodutos, que também podem ser chamados de resíduos líquidos de laboratório, possuem uma classificação de resíduos perigosos de classe I, segundo a NBR 10004 (ABNT, 2004a). Além do uso desta norma para a classificação dos resíduos, é importante frisarmos que a mesma é complementada por outras normas que orientam sobre os procedimentos de amostragens de extratos lixiviados, extratos solubilizados e de resíduos sólidos, como a NBR 10005, NBR 10006 e NBR 10007 (ABNT, 2004b, 2004c, 2004d).

De acordo com a NBR 10004 (ABNT, 2004a), a periculosidade de um resíduo está presente nas suas propriedades físicas, químicas ou infecto-contagiosas, o que oferece riscos à saúde pública e/ou ao meio ambiente. Tendo em vista que a geração destes resíduos é proveniente de dois tipos principais de produtos que possuem estas propriedades, ou seja, para mistura de solventes orgânicos com amostras de componentes orgânicos, como os agrotóxicos, podemos inferir que estes compostos mantêm as suas características ou potencializam os seus riscos. Os resíduos que têm como principais componentes solventes orgânicos podem apresentar toxicidade, inflamabilidade, reatividade e corrosividade, sendo classificados, portanto, como resíduos perigosos, dependendo das suas características e do estado químico em que se encontram. A maioria dos solventes utilizados em análises físico-químicas tem características de inflamabilidade e toxicidade (CHRISPINO, 1994; CETESB, 2003).

De acordo com uma breve pesquisa em sistemas de gerenciamento de resíduos de alguns laboratórios de universidades e empresas do país, pode-se constatar que os principais solventes orgânicos utilizados para efetuar análises físico-químicas são: acetona, álcool etílico, álcool isopropílico, álcool metílico, benzeno, ciclohexano, cloreto de etila, clorofórmio, diclorometano, éter de petróleo, fenol, formaldeído, hexano, éter etílico, tetracloreto de carbono, tolueno e xilenos (CRHISPINO, 1994; PACHECO et al., 2003; MACHADO, 2005; BIOAGRI LABORATÓRIOS, 2005; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", 2002; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2005). Segundo Pohanish e Greene (1997), em um estudo sobre a periculosidade dos solventes para a saúde humana e meio ambiente, muitos solventes orgânicos são derivados de petróleo e podem dissolver outros

derivados orgânicos, tais como óleos, gorduras, plásticos e resinas. Para Braga (2002), a propriedade de dissolver outros compostos orgânicos também se encontra nas amostras a serem analisadas, que se apresentam com um nível maior de toxicidade e, consequentemente, potencializam a periculosidades dos solventes. Como exemplo, podemos citar os agroquímicos da família dos organoclorados e organofosforados, que ainda são bastante utilizados nas lavouras brasileiras, gerando contaminações constantes em canais fluviais, lençóis freáticos, solos e ar.

Ao final de cada processo de análise laboratorial, envolvendo o uso de soluções contendo, por exemplo, solventes orgânicos, ácidos, bases, sais e substâncias-teste com características orgânicas, forma-se um composto de resíduo específico, e de difícil identificação, devido à variedade no uso das concentrações das soluções dos compostos usados, e na diversidade de moléculas analisadas. Portanto, considera-se que os resíduos gerados em laboratórios são de características complexas, porém gerados em baixa escala. Gerbase (2005), em seu artigo sobre gerenciamento de resíduos de laboratório, afirma que estes resíduos diferenciam-se dos gerados em unidades industriais devido a esta diversidade na sua composição.

Na Tabela 6 pode-se observar as descrições resumidas da toxicidade de alguns solventes utilizados em laboratórios, e também os que foram utilizados como objeto de estudo desta pesquisa.

Tabela 6 - Relação de riscos dos principais solventes e substâncias orgânicas utilizadas em análises físico-químicas

utilizadas em analises físico-químicas							
Substância Química	Riscos à Saúde Humana	Riscos ao Meio Ambiente					
Acetonitrila	O seu vapor é irritante para os olhos, nariz e garganta, se inalado causa dificuldade respiratória. Exposição por curto tempo:	Os vapores são mais pesados que o ar e podem se deslocar por grandes distâncias.					
Álcool Isopropílico	irritante moderado para as membranas mucosas, pele e olhos; Exposição prolongada: ressecamento da pele, deformações no feto e câncer.	Vapores explosivos e líquido inflamável; ataca plásticos e borracha.					
Álcool Etílico	Na forma desidratada causa irritação no nariz e olhos; Em contato mais prolongado causa irritações gastrintestinais, dores de cabeça, problemas no fígado, deformações no feto e câncer.	Vapores inflamáveis e explosivos a altas temperaturas; Perigoso à vida aquática em altas concentrações.					
Álcool Metílico	Rapidamente absorvido causando dores de cabeça, confusões, câimbras, tonturas; tóxico moderado se inalado; causa cegueira e morte se ingerido.	Gases venenosos gerados em sua queima; Vapores inflamáveis e explosivos a altas temperaturas.					
Benzeno	Em altas dosagens ou exposição por longos períodos pode causar depressão das funções da medula óssea, hemorragia, depressão do sistema nervoso central; teratogênico e cancerígeno.	Os vapores são mais pesados que o ar e podem se deslocar a uma considerável distância.					
Ciclohexano	Em altas dosagens ou exposição por longos períodos pode causar irritação da pele e das mucosas, depressão, excitabilidade e convulsões	O vapor pode explodir, se a ignição for em áreas fechadas.					

Substância Química	Riscos à Saúde Humana	Riscos ao Meio Ambiente
Éter de petróleo	Irritante para a pele, olhos, nariz, garganta e pulmões; perigoso ao sistema nervoso central; efeito narcótico; causa queimaduras na pele; pode causar doenças no coração.	Altamente volátil; líquido altamente inflamável; os vapores podem causar ignição instantânea.
Tolueno	Exposição aguda: depressão no sistema nervoso central, irritante para os olhos, nariz, garganta e trato respiratório. Exposição prolongada: ressecamento e rachadura da pele; possíveis problemas crônicos no fígado; hemorragia; alterações genéticas.	Poluente prioritário; Altamente volátil; Vapores podem entrar em ignição; Gases venenosos com a sua queima; Toxicidade aguda para peixes em ambientes aquáticos.
Xileno	Irritante para olhos, nariz e garganta; na inalação de pequenas amostras pode causar problemas respiratórios; na absorção da pele em altas concentrações pode causar sonolências, náuseas, vômitos e dores abdominais; Problemas no fígado e rins; Pode causar alterações no ciclo menstrual, riscos de ataque cardíaco e deformações no feto.	Líquido altamente volátil, inflamável e instável em altas temperaturas; A sua queima gera gases e vapores tóxicos; prejudicial à vida aquática em baixas concentrações.

Substância Química	Riscos à Saúde Humana	Riscos à Saúde Humana
Acetona	Em altas concentrações pode causar problemas crônicos nos olhos, nariz e irritação na garganta. Em inalação prolongada pode causar dores de cabeça, tonturas, fraqueza e problemas no sistema nervoso central; Em exposição prolongada pode causar problemas no fígado, rins, cérebro e sistema nervoso central.	Odor característico; Líquido incolor e inflamável; vapores podem causar explosões em áreas enclausuradas; perigoso à vida aquática em altas concentrações.
Clorofórmio	Em altas dosagens ou exposição por longos períodos pode causar depressão respiratória e do miocárdio, parada cardíaca, lesão hepática; É presumivelmente cancerígeno.	Decompõe produzindo gases tóxicos.
Éter etílico	Em altas dosagens ou exposição por longos períodos pode causar Irritação na pele e nas mucosas, parada respiratória.	Os vapores são mais pesados que o ar e podem se deslocar a uma considerável distância.
Fenol	Em altas dosagens ou exposição por longos períodos pode causar corrosão na pele, oligúria, hematúria, albuminúria, vômitos, alucinações, delírios, cefaléias e convulsões crônicas. Em altas dosagens ou exposição por longos períodos pode causar dermatite, irritação bronquiônica, conjuntivite; É presumivelmente	Libera vapores inflamáveis quando aquecido, que podem formar misturas explosivas com o ar.
Formaldeído	cancerígeno.	Produz vapores tóxicos.

Substância Química	Riscos à Saúde Humana	Riscos à Saúde Humana		
Tetracloreto de carbono	distúrbios visuais e delírios, coma, oligúria, tosse. É presumivelmente	Forma gases venenosos de fosgênio (cloreto de carbonila) quando exposto a chama aberta.		
Diclorometano	•	Produz gases venenosos. A decomposição dos produtos gerados no fogo pode produzir substancias tóxicas.		
Hexano	Irritante para o nariz e garganta. Se inalado pode causar náusea e tonturas.	O vapor pode explodir, se a ignição for em área fechada.		

Fonte: Pohanish e Greene (1997, p. 35-37); Chrispino (1994, p. 46-51); Ficha de Segurança (CETESB, 2011; CETESB, 2012)

Devido à esta complexidade dos compostos dos resíduos líquidos de laboratórios, e da variabilidade contínua desta composição, dificilmente se pode estabelecer uma dosagem mínima padrão das concentrações permitidas para o lançamento *in natura* em corpos de água. Portanto, para avaliar qual o nível de toxicidade das composições oriundas das análises de laboratórios contendo solventes orgânicos e demais moléculas, é necessário obter um conhecimento prévio dos principais produtos que originaram, ou que fazem parte em maior concentração destes resíduos. Isto é possível através de dados informados, geralmente, pelo fornecedor dos produtos, ou presentes nas fichas de segurança dos produtos. Porém muitas das informações, principalmente relativas a toxicidade dos produtos, são relacionados aos testes com organismos típicos da região de origem do produto, tendo em vista que a maioria dos solventes orgânicos, desta pesquisa, são importados.

2.3 Análises comparativas sobre parâmetros e normas nacionais e internacionais que estabelecem limites de contaminação para águas superficiais e subterrâneas

De acordo com as fontes nacionais e internacionais, pode-se ter como referência os principais órgãos e instituições que estabelecem parâmetros de referência. Estes valores servem para se estabelecer um comparativo com os resultados deste trabalho.

A necessidade da definição destes parâmetros se deve ao fato de que a maior exposição humana a estes fatores leva a problemas de saúde em função da ingestão e consumo de água ou alimentos contaminados por resíduos nos solos, água superficial ou subterrânea (CANTER, 1996). No Brasil, o Ministério do Meio Ambiente, através do seu órgão regulamentador, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabeleceu os parâmetros de concentrações aceitáveis para descarga de efluentes em corpos de água, de acordo com as classes de contaminantes, pela Resolução CONAMA n. 430 de 13 de maio de 2011, que substituiu a resolução CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005. No artigo 16 desta resolução são definidos os efluentes que podem ser lançados de forma direta ao serem escoados diretamente para algum receptor de corpos de água, a exemplo de rios, lagos, mares etc., ou indiretamente, quando antes de escoarem para um corpo de água atingem outro meio, como o solo (BRASIL, 2005, 2011). Na Tabela 54 pode-se observar as classes de contaminantes, e os parâmetros limites para descarga dos efluentes, de acordo com esta resolução. De forma geral, a análise da Tabela 6 demonstra que esta resolução não oferece parâmetros suficientes para estabelecer um comparativo referente aos componentes presentes em muitos efluentes industriais, assim como os presentes nos resíduos de laboratórios, assim como para as próprias amostras de solventes desta pesquisa. Segundo Goldstein (1988) a existência de grande quantidade de substâncias que são lançadas no meio ambiente pelas indústrias faz-se necessário o estabelecimento de padrões de referência de um número maior de substâncias para um controle mais efetivo da poluição das águas.

Verifica-se que a listagem presente nesta Resolução possui somente as classes de compostos resultantes da mistura de substâncias presentes em efluentes provenientes de processos industriais. Quando determinados efluentes apresentam cargas de poluentes não reativas, como por exemplo, compostos orgânicos

sintéticos ou solventes orgânicos, também conhecidos como Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs), como alcoóis ou acetonas, esta resolução não possui valores de referência, como é o caso da maioria dos resíduos líquidos ou subprodutos gerados em laboratórios.

Tabela 7 - Parâmetros de aceitação para lançamento de efluentes em corpos de água

LANÇAMENTO DE EFLUENTES PARÂMETROS INORGÂNICOS VALORES (mg.L-1)				
Arsênio	VALORES (mg.L ⁻¹)			
	0,5			
Bário	5,0			
Boro Cádaria	5,0			
Cádmio	0,2			
Chumbo	0,5			
Cianeto	1,0			
Cianeto	0,2			
Cobre	1,0			
Cromo hexavalente	0,1			
Cromo trivalente	1,0			
Estanho	4,0			
Ferro	15,0			
Fluoreto	10,0			
Manganês	1,0			
Mercúrio	0,01			
Níquel	2,0			
Nitrogênio amoniacal	20,0			
Prata total	0,1			
Selênio total	0,3			
Sulfeto	1,0			
Zinco total	5,0			
Benzeno	1,2			
Clorofórmio	1,0			
Dicloroeteno	1,0			
Estireno	0,07			
Etilbenzeno	0,84			
fenóis totais	0,5			
Tetracloreto de carbono	1,0			
Tricloroeteno	1,0			
Tolueno	1,2			
Xileno	1,6			

Fonte: CONAMA 430/11 (BRASIL, 2011)

Pela interpretação desta resolução, entende-se que compostos que possuem moléculas que não são parametrizadas nesta listagem, não podem ser escoados para corpos hídricos de águas superficiais (BRASIL, 2011). Desta forma, entende-se que alguns solventes orgânicos de menor toxicidade, como etanol, acetona, e até

mesmo o metanol, se comparado às moléculas orgânicas presentes nesta resolução, a restrição referente ao seu escoamento, como efluentes para águas superficiais, é maior do que as próprias moléculas presentes nesta Tabela, por não ser permitida a presença de moléculas em efluentes quando não são citadas nos valores de referência desta resolução, independentemente de sua concentração. Além deste fato, para as empresas que desejam verificar o grau de toxicidade dos seus compostos, ou qual tratamento deverá ser aplicado, torna-se necessária tomar como referência parâmetros internacionais, como os presentes nas normas da Environmental Protection Agency (EPA) ou da União Europeia (UE). desde que aceitos e aprovados pelos órgãos reguladores nacionais.

Porém, para casos específicos, de acordo com o art. 6 e art. 18 da Resolução 430 do CONAMA, é possível estabelecer uma concentração máxima de escoamento, desde que seja desenvolvido uma análise técnica junto ao órgão ambiental competente, mediante a um estudo ambiental adequado com a garantia de que o efluente não possua efeitos tóxicos ao corpo receptor. Para se seguir este caminho é necessário levar em consideração os critérios de ecotoxicidade estabelecido por este órgão, por meio de resultados de ensaios ecotoxicológicos realizados em organismos de pelo menos dois níveis tróficos, e com a apresentação do cálculo da Concentração do Efluente no Corpo Receptor (CECR), os métodos de ensaio, e a frequência do monitoramento (BRASIL, 2011).

Diante do observado, considera-se que as Tabelas que padronizam os valores orientadores estabelecidos por órgão ambientais das respectivas Unidades da Federação (UFs), que no caso do Estado de São Paulo é representado pela CETESB, não servem como base para se comparar as concentrações máximas que podem ser escoadas quando os resíduos líquidos de laboratório contenham compostos presentes nestas listas, e que fazem parte do objeto desta pesquisa, ou até mesmo outros compostos que não são contemplados nas listagens nacionais, e que também fazem partes das amostras nos ensaios realizados neste trabalho, como são os casos do metanol e acetonitrila. Desta forma, por falta de referência de parâmetros, e pelo fato de que os resíduos líquidos, quando não são coletados dentro de um sistema de gerenciamento de resíduos adequado para laboratório, e os mesmos são descartados diretamente nos sistemas de esgoto, estes descartes são escoados para águas superficiais, mesmo quando os municípios não possuem sistema de tratamento de esgoto. A dificuldade ainda aumenta, pelo fato de que as

listagens que limitam o escoamento dos efluentes para corpos hídricos, possui uma quantidade de parâmetros menor do que os valores orientadores de descarga em solo e águas subterrâneas. Como modo de exemplificar a carência de parâmetros para moléculas orgânicas nas listagens nacionais, tanto quanto para escoamentos superficiais para corpos hídricos, como para infiltrações no solo e água, a Tabela 54 mostra um comparativo entre as listagens do CONAMA, da CETESB e da EPA.

Na Tabela 7 verifica que os solventes orgânicos presentes nos ensaios deste trabalho, de forma geral, somente os clorados ou halogenados estão presentes nas listagens brasileiras, sendo o clorofórmio como referência para verificação dos limites de concentração para a disposição nos corpos hídricos. Com relação aos solventes não halogenados, que nesta Tabela são representados pelo metanol e acetonitrila, não existem referências nacionais de valores máximos para as concentrações presentes em efluentes ou resíduos líquidos, sendo necessário, nestes casos, a elaboração de estudos incluindo ensaios ecotoxicológicos com aval dos órgãos ambientais reguladores, como foi demonstrado alguns exemplos de ensaios por teste trabalho. Assim, tomando como base algumas demandas aqui levantadas, e o avanço das pesquisas, inovações, e com isso, o uso de cada vez mais produtos a base de solventes que pelos quais não possuem referência de escoamento, evoca-se a necessidade de se estabelecer modelos aceitos cientificamente e padronizados para o desenvolvimento de estudos para se estabelecer concentrações seguras de disposição destes compostos, de forma que minimize os impactos dos mesmos nos ecossistemas envolvidos. Esta proposta segue uma tendência global de adoção de listas orientadoras com valores de referência para ações de monitoramento da qualidade ambiental, e avaliações de risco referentes aos produtos químicos e seus compostos, que não possuem base nos parâmetros das legislações nacionais (CETESB, 2001).

2.4 Os estudos ecotoxicológicos como indicadores de contaminantes em ambientes aquáticos

O uso dos testes ecotoxicológicos como indicadores de ambientes contaminados contribuem para a observação dos efeitos adversos causados por contaminantes antrópicos nos ecossistemas aquáticos. Estes testes representam um cenário de organismos típicos destes ecossistemas alinhados com um potencial efeito tóxico causado por poluentes (PLAA, 1982 apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Portanto, segundo estes mesmo autores, a ecotoxicologia possui a função de avaliar os impactos adversos dos contaminantes em um determinado habitat ou ecossistema.

No entanto para poder mensurar os efeitos adversos causados por poluentes em um determinado ambiente, são realizados ensaios ecotoxicológicos específicos, determinados por normas técnicas ou referências aceitas pelo meio científico nacional ou internacional. De uma forma geral estes ensaios caracterizam-se pela exposição de organismos típicos dos ambientes à serem pesquisados com várias concentrações de amostras da substância estudada, e por um determinado período de tempo do ciclo de vida do organismo testado (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

De acordo com Aragão e Araújo (2006, p.118) os ensaios de toxicidade servem, principalmente, para:

- determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos, dentre outros;
- estabelecer critérios e padrões de qualidade das águas;
- estabelecer limites máximos de lançamentos de efluentes líquidos em corpos hídricos
- avaliar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental;
- avaliar a qualidade das águas;
- avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias;
- avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos;
- subsidiar programa de monitoramento ambiental;
- estimar os impactos provocados em acidentes ambientais.

Dentre os vários tipos de testes realizados em laboratórios, o mais comum e de maior representatividade são ensaios de efeitos letais de toxicidade aguda. Este teste mostra qual a concentração da amostra possui o potencial de causar a mortalidade nos organismos testados (FONSECA, 1991). No Brasil, estes testes estão sendo empregados para o monitoramento de efluentes industriais, com o objetivo de verificar o teor do impacto ambiental de determinados ramos industriais

(MAGALHAES; FERRAO FILHO, 2008). Outro tipo de utilização deste ensaio é para a certificação de produtos químicos, como agrotóxicos, para a comercialização no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 1996).

Além dos ensaios de efeitos letais, a ecotoxicologia possui, também, como instrumento de medição, os ensaios de efeitos subletais ou crônicos. Estes ensaios consistem em determinar se o poluente causa algum tipo de distúrbio fisiológico ou comportamental a longo prazo, sendo assim, a avaliação de efeitos adversos menos severos. Estes efeitos adversos podem ser observados, por exemplo, no crescimento, ou na reprodução do organismo (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Porém, inserido a estes conceitos, para a comprovação tóxica de uma determinada substância através dos estudos ecotoxicológicos, é necessário a seleção dos organismos conforme a sua representatividade em determinado meio. De acordo com Jeffrey (1987 apud LAMEIRA, 2012), os organismos somente podem ser definidos de acordo com a sua resposta às questões, ou alterações ambientais.

2.4.1 Organismos-teste dos ensaios

Muitos organismos podem ser testados em sistemas de laboratórios para obtenção dos potenciais toxicológicos dos poluentes, porém no Brasil, as orientações para a escolha destes organismos são determinadas por normas específicas, ou no caso do estado de São Paulo, determinados por normas ou publicações como a da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. De acordo com o guia técnico sobre produtos químicos da CETESB (CETESB, 2008) o critério mais utilizado é a escolha de organismos representantes de diferentes níveis tróficos. O Quadro 1 mostra os principais organismos determinados pela CETESB para o desenvolvimento dos estudos ecotoxicológicos.

Algas	Scenedesmus quadricauda		
	Chlorella pyrenoidosa		
	Microcystis aeruginosa		
Micro-crustáceos	Daphnia pulex		
	D. magna		
Crustáceos	Camarão: Gammarus lacustris (água		

	continental); <i>Crangon</i> (água
	marinha); <i>Palaemonet</i> es (água
	marinha)
Moluscos	Mexilhão: <i>Mytilus edulis</i>
	Ostra: Crassostrea virginica
Peixes (águas continentais)	Gambusia affinis Carassius auratus Pimephales promelas Lebistes reticulatus ("Guppy") Lepomis macrochirus ("Bluegill") Poecilia reticulata ("Guppy")
Peixes (águas marinhas)	Menidia beryllina

Quadro 1 – Lista de organismos para avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias no meio aquático (CETESB, 2014)

Apesar das orientações da CETESB com relação à escolha dos organismosteste para os ensaios ecotoxicológicos, normalmente os ensaios são conduzidos de acordo com uma norma de referência vigente. Para cada tipo de teste, sendo agudo ou crônico, os organismos são selecionados se acordo com o determinado nestas normas de referência. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, é a entidade de classe que publica as normas de referências utilizadas nos laboratórios (ABNT, 2014).

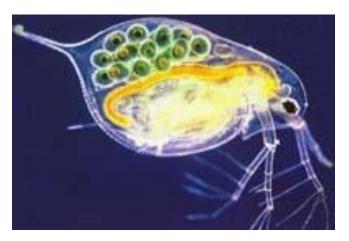
De acordo, com Domingues e Bertoletti (2006), a seleção das espécies deve seguir alguns princípios básicos como a sensibilidade, possibilidade de manutenção para cultivo em laboratório, acessibilidade, entre outros. Portanto, alguns animais de pequeno porte, de ciclo de vida curto, são altamente recomendáveis, como os cladóceros, *Daphnia ou Ceriodaphnia*, assim como algumas espécies de peixes, como o *D. rerio* e o *Pimephales promelas*. Segundo estes mesmos autores, outro critério importante é a disponibilidade de organismos para testes em qualquer período do ano, como é o caso das espécies citadas, sendo de grande utilização nos estudos ecotoxicológicos convencionais.

Os organismos da família Daphnidae e da ordem das Cladoceras são representadas, por exemplo, pelas espécies *D. similis e C. dúbia*, amplamente utilizadas em testes ecotoxicológicos agudos e crônicos. De acordo com Aragão et al. (2003), a CETESB adotou como organismos padrão a *D. similis* para os ensaios

agudos de ecotoxicidade, para a determinação da concentração efetiva 50 – CE₅₀ em efluentes.

Diante do observado com relação aos organismos testes, as espécies do gênero *Daphnia*, ou pulgas d'água, possuem a principal função de alimentos de peixes. Para cultivo em laboratório, e pela sua maior disponibilidade e poder de adaptação em outros ambientes, as espécies mais utilizadas são a D. *simlis* e *D. magna*, as quais não são típicas do Brasil. Outra questão importante na escolha dos dafinídeos em testes de toxicidade, é a sua representatividade nas respostas das alterações do seu ecossistema através de um agente externo, devido à sua alta sensibilidade em seu habitat (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

A *D. similis* é uma espécie planctônica e filtradora. A sua presença em águas continentais brasileiras é ocasional, porém representa os ecossistemas aquáticos de clima tropical. Outra espécie bastante utilizada em ensaios ecotoxicológicos é a *C. dúbia*, que tem como principal característica ser cosmopolita, por ser encontrada em todos os tipos de águas continentais (LAMEIRA, 2012 *apud* JACONETTI, 2005; ARMENGOL, 1978; HETERS & BERNADI, 1987).



Fonte:http://www.acquaconsulting.com.br/servicos/laboratorio/ensaios-de-toxicidade/

Figura 3 - Daphnia similis



Fonte:http://www.geochembio.com/biology/organisms/daphnia/ Figura 4 - *Daphnia magna*



Fonte:http://mblaquaculture.com/content/ organisms/daphnids.php Figura 5 – *C. dúbia*

Outra espécie amplamente utilizada nos ensaios ecotoxicológicos, e que também segue os critérios de representatividade e de fácil cultivo e reprodução em laboratório, é o peixe da espécie *D. rerio* também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra. Este ovíparo pode chegar no máximo 4,5 cm de comprimento e com habitats em águas doces de clima tropical, onde os ovos são depositados em um curto espaço de tempo e no período da manhã (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006). De acordo com as normas da ABNT 15088 (2011) e ABNT 15499 (2007), esta

espécie pode ser utilizada em estudos agudos, assim como as suas larvas podem ser utilizadas em estudos crônicos. De acordo com Silveira, Shneider e Hammes (2012), além da sua utilização em estudos ecotoxicológicos, estes peixes também podem ser utilizados em pesquisas biomédicas, por possuírem uma excelente homologia aos vertebrados comumente utilizados, e pelo fato de possuírem facilidade na sua manutenção, podem, também, ser aplicados em estudos comportamentais de toxicidade, genéticos, e inclusive ajudar na descoberta de diversas doenças humanas.



Fonte: http://www.noldus.com/animal-behavior-research/solutions/zebrafish

Figura 6 - D. rerio

3 OBJETIVO GERAL

Determinar a toxicidade dos solventes metanol, acetonitrila, clorofórmio e diclorometano, e suas misturas, referente aos resultados comparativos dos ensaios agudos e crônicos em microcrustáceos e peixes.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilidade) em *D. similis* no período de 48 horas, utilizando como tratamentos acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano e suas misturas.
- Determinar a Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilidade) em *D. magna* no período de 48 horas, utilizando como tratamentos acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano e suas misturas.
- Determinar a Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) do agente tóxico que causa efeito crônico (imobilidade) em *C. dubia* no período de 168 horas, utilizando como tratamentos acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano e suas misturas.
- Determinar a Concentração Letal 50 (CL₅₀) do agente tóxico que causa efeito agudo (morte) em *D. rerio* em um período de 96 horas de exposição, utilizando como tratamentos acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano e suas misturas.
- Determinar a Concentração Letal 50 (CL₅₀) do agente tóxico que causa efeito crônico (morte) em *D. rerio* em um período de 168 horas de exposição, utilizando como tratamentos acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano e suas misturas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento das análises laboratoriais desta pesquisa foram utilizados quatro tipos de solventes orgânicos em meio aquoso como substancia teste: acetonitrila, metanol, diclorometano e clorofórmio. Estes compostos foram analisados em diferentes concentrações e misturados de acordo com as formas de geração relacionada aos processos analíticos. Estas concentrações foram determinadas através de testes preliminares das avaliações de toxicidade aguda e crônica em *D. rerio*, *D.similis*, *D.magna* e *C. dubia*, seguindo as seguintes misturas:

- Acetonitrila e metanol (50/50)
- Diclorometano e clorofórmio (50/50);
- Acetonitrila, metanol, diclorometano e clorofórmio (25/25/25/25);

No Quadro 2 estão as informações referentes à certificação da qualidade destes produtos retirados dos certificados de qualidade de cada produto (TEDIA, 2012a, 2012b, 2012c; MERCK, 2011).

Substancia – teste/ Concentração	Certificado	Nº CAS	Lote/ Validade	Marca	Fórmula Molecular
Acetonitrila/ 99,99%	AS1122	75-05-8	1202016R/ 21/02/2017	Tedia	H H-C-C≡N H
Metanol/ 99,95%	MS1922	67-56-1	1202080R/ 15/02/2017	Tedia	H H—C—OH H
Diclorometano/ 99,99%	DA1431	75-09-2	1202501R/ 16/03/2014	Tedia	CI CI H
Clorofórmio/ 99,2%	1.02445.100	67-66-3	K43006245/ 31/12/2014	Merck	H-CCC
Dicromato de Potássio/ 100%		7778-50- 9	K40417764/ 30/09/2014	Merck	K2 Cr2 O7

Quadro 2 – Lista de informações dos solventes Fonte: Tedia (2012a, 2012b, 2012c) e Merck (2011))

Cabe lembrar, que ao todo foram efetuados 35 ensaios, com 7 tipos de amostras diferentes em 5 espécies de organismos típicos de água doce superficial. Mesmos já tendo efetuadas as análises dos ensaios individualmente, assim como os comparativos entre os ensaios, considera-se de suma importância esboçar uma análise comparativa geral com objetivo de explanar o efeito toxicológico de cada espécie frente às amostras testadas e suas peculiaridades.

5.1 Determinação da CE₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas utilizando microcrustáceos

Os ensaios de toxicidade aguda para os organismos *D. similis e D. magna* foram conduzidos conforme a norma de referência ABNT NBR 12713, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia ssp* (ABNT, 2004b), e tendo como base estrutural de qualidade da condução dos

ensaios os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) da Norma NIT-DICLA-035-Jul/2009, Rev. 01 (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2009).

O teste de toxicidade crônica tem como princípio a exposição de *C. dubia* jovens à diferentes concentrações das amostras, em condições padronizadas no método padrão utilizado. Portanto, o procedimento aplicado para a condução destes testes permitem determinar, no final do período de exposição de 7 dias, o número médio de jovens produzidos por fêmea e o número de fêmeas adultas sobreviventes. Com estes dados, calcula-se o valor de CENO (Concentração de Efeitos Não Observados), CEO (Concentração de Efeitos Observados) e VC (Valor Crônico).

Todos as etapas destes ensaios foram conduzidas de acordo com a norma de referência ABNT NBR 13373, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia ssp* (Crustácea, Cladocera), seguindo os mesmos os Princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL) (INMETRO, 2009; ABNT, 2005).

Dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelos princípios de Boas Práticas de Laboratórios aplicadas a todos os ensaios efetuados nesta pesquisa, os solventes utilizados como substâncias teste possuem características que comprovam a sua qualidade para sua utilização nos ensaios (INMETRO, 2009). Baseando-se deste mesmo princípio, a substância de referência, dicromato de potássio, que compõe as cartas de controle para a comprovação da garantida da qualidade dos procedimentos aplicados nestes ensaios, também seguem estes mesmos padrões de qualidade.

Com relação aos reagentes utilizados para o preparo dos meios utilizados nos ensaios, foi utilizada a metodologia conforme a ABNT NBR 12713 (2004e). Para os ensaios com *D. magna* são utilizados o Meio M4 (água de cultivo de *D. magna*) e para os ensaios com *D. similis* utilizados o meio MS (água de cultivo de *D. similis*).

Com relação à obtenção dos resultados, os valores da CE₅₀ 24 e 48 horas dos organismos expostos com os solventes e substâncias de referência, foram determinados através do método estatístico Trimmed Spearman- Karber (MONTANA STATE UNIVERSITY, 1977).

5.1.1 Cultura Estoque / Água de Manutenção Teste

Inicialmente, antes de se determinar as condições de cultivo e manutenção dos organismos teste dos ensaios de toxicidade aguda, foi necessária a aquisição dos exemplares dos microcrustáceos. Para esta aquisição foram avaliados os locais com garantia e certificação da qualidade das espécies, sendo, desta forma, obtidos na Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB). Os organismos testados de *Ceriodaphnia* ssp foram obtidos da Carolina Biological Supply Company - Burlington, Carolina do Norte (EUA), e mantido em cultura em condições específicas.

Após estas aquisições, as culturas estoque de *D. similis* e *D. magna* foram mantidas em condições ideais para o cultivo e reprodução, para o início e durante a condução dos ensaios. As salas de culturas foram climatizadas com temperaturas controladas de 20 ± 2 °C, e ambientalizadas com luminosidade com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com intensidade luminosa de $1000 \pm 20\%$ lux.

A alimentação das culturas foi efetuada diariamente com suspensão algácea conforme descrito abaixo:

A renovação dos meios foi efetuada com uma periodicidade de duas vezes por semana, durante o período da condução dos testes.

Além de garantir as condições ideais para a manutenção das culturas, de acordo com Pennak (1989), é necessário que as culturas permaneçam em condições morfológicas também ideais. Portanto, os organismos utilizados apresentavam as seguintes características, apresentando uma idade de 6 a 24 horas:

- Daphnia similis: Comprimento de até 3 mm e margem do pós-abdômen não sinuosa.
- Daphnia magna: Comprimento de até 5 mm e margem do pós-abdômen sinuosa

Com relação às condições da água utilizada nos testes preliminares e definitivos, foram mantidas as seguintes condições durante o período dos ensaios:

a. Condições – faixas dos preliminares e definitivos para D. similis

Meio MS

pH: 7,4

Dureza: 42 mg.L⁻¹ CaCO₃

Oxigênio dissolvido: aprox. 8,0 mg.L⁻¹

Temperatura: 20,8°C

Condutividade: 422 µS.cm⁻¹

b. Condições – faixas dos preliminares e definitivos para *D. magna*

Meio M4

pH: 7,0

Dureza: 217,3 mg.L⁻¹ CaCO₃

Oxigênio dissolvido: aprox. 8,0 mg.L⁻¹

Temperatura: 20,9°C

Condutividade: 437 µS.cm⁻¹

c. Condições – faixas dos preliminares e definitivos para C. dubia

Meio MS

pH: 7,5 a 8,5

Dureza: 40 a 48 mg.L⁻¹ CaCO₃

Oxigênio dissolvido: aprox. 8,0 mg.L-1

Temperatura: aprox. 25°C

Para obtenção dos organismos de *C. dubia*, conforme a norma de referência, ou seja, com idade de 6 a 24 horas, vinte e quatro horas antes do início dos ensaios, foram retirados dos vasos, contendo fêmeas ovadas, todos os organismos jovens

desta idade. Após este processo as fêmeas foram alimentadas com a suspensão algácea, de forma que cada organismo disponha de aproximadamente 3 x 10⁶ células. No dia seguinte foram retirados todos os jovens nascidos neste período (ABNT, 2010).

Durante a condução dos testes as culturas foram mantidas em recipientes de vidro com capacidade para 2,5 L, com aproximadamente 2,0 L de meio M4 para *D.magna* e meio MS para *D. similis* e *C.dubia*.

Para os cálculos do CENO, CEO e o VC dos ensaios foram utilizados o programa estatístico TOXTAT 3.5 (WEST; GULLEY, 1996), onde se calcula a diferença entre a sobrevivência dos organismos controle e a concentração teste, obtendo-se, desta forma, a reprodução dos organismos controle e a concentração teste.

5.1.2 Soluções teste para D. magna e D. similis

A solução estoque dos solventes utilizados no teste preliminar e definitivo dos estudos com *D. similis* e *D. magna* foi preparada a partir das pesagens abaixo, em seguida diluída em M4, e completado para um volume total de 100 ml. As concentrações finais dos testes preliminares e definitivos e, demais soluções encontram-se no Anexo A (ABNT, 2004b).

5.1.3 Soluções teste para C. dubia

As concentrações das soluções utilizadas nos organismos foram preparadas de modo que ficassem na faixa de 10000 mg.L⁻¹ a 2000 mg.L⁻¹, tendo como referência a toxicidade da amostra obtida nos testes preliminares.

A solução estoque dos solventes para o teste preliminar e definitivo foi preparada a partir das pesagens descritos no Anexo A e solubilizadas em água reconstituída, e completadas a um volume final de 500 ml, assim como as concentrações finais, também se encontram neste anexo.

5.1.4 Procedimento experimental para os ensaios com *D. magna* e *D. similis*

O teste foi conduzido em sistema estático, ou seja, sem renovação da solução teste, durante o período do teste (48 horas). Os procedimentos de condução dos ensaios foram estabelecidos com base na norma de referência ABNT NBR 12713 (ABNT, 2004e).

Os organismos foram distribuídos aleatoriamente nos recipientes, sempre levando em consideração escolhas dos microcrustáceos, que possuíam as condições ideais determinadas por Penak (1991).

Após a verificação e preparo das condições para o ensaio, os parâmetros foram avaliados. Na periodicidade de 24 horas e 48 horas, os resultados da imobilidade foram registrados no final de cada período, levando em consideração que a imobilidade registrada era aplicada somente para os animais que não se moviam em um período de 15 segundos de observação.

No teste definitivo, as condições de exposição dos organismos, e as características do sistema como um todo dos ensaios foram iguais dos testes preliminares. Porém, com relação às concentrações e réplicas foram diferentes, onde a quantidade de organismos foi um total de 25, sendo 5 recipientes com concentrações distintas com 5 organismos cada recipiente e 2 réplicas. As concentrações nominais para cada ensaio referente aos solventes da pesquisa aplicados à *D.magna e D. similis* estão descritas no Anexo A.

O controle de qualidade foi de acordo com cartas controle emitidas a cada 10 ensaios com o padrão de referência de dicromato de potássio, onde a faixa aceitável deve permanecer de 0,61 mg.L⁻¹ a 0,71 mg.L⁻¹ conforme OECD (2004). As figuras 7 e 8 demonstram as curvas dos resultados da carta controle com ensaios efetuados durante o período de março de 2014 a agosto de 2012 e março de 2014 de *D. similis* e *D. magna*.

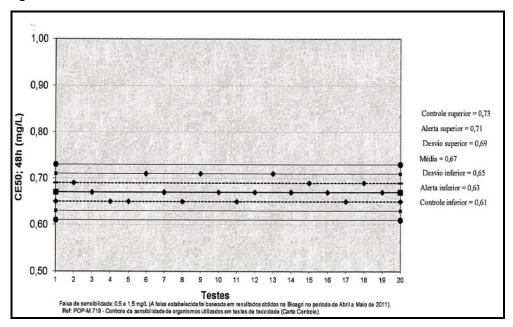


Figura 7 – Carta controle para D. similis

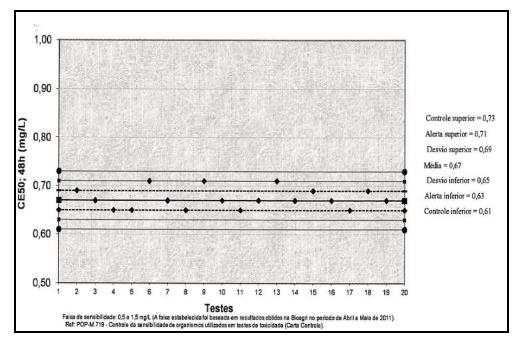


Figura 8 – Carta controle para *D. magna*

5.1.5 Procedimento experimental para os ensaios com C. dúbia

As soluções dos testes das amostras de solventes foram diluídas em meio MS, conforme item 5.3, onde cerca de 20 mL de cada solução foram transferidas e distribuídas nos frascos de testes. Desta forma foram preparadas 10 réplicas por concentração e expostos 1 organismo em cada frasco para o início do teste.

Após a inclusão dos organismos nos frascos, as amostras foram incubadas em sala específica com temperatura controlada para $25 \pm 2^{\circ}$ C, com fotoperíodo de 16h de luz e 8 horas escuro. Após 3 dias do início dos testes as soluções contendo os organismos foram trocadas por soluções novas da mesma concentração e contendo os mesmos nutrientes, assim como as condições de pH, temperatura e concentração de oxigênio foram medidos sendo que ficaram dentro das faixas aceitáveis.

A Figura 8 apresenta a carta de controle referentes aos resultados efetuados com cloreto de sódio para garantir a validade do sistema teste. Os resultados devem permanecer nas faixas de 0,09 mg.L⁻¹ a 0,19 mg.L⁻¹, tendo como referência a OECD (2004).

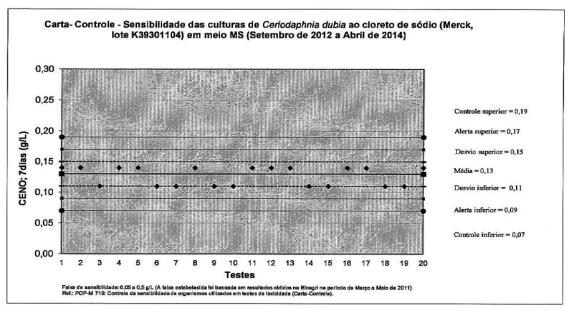


Figura 9 – Carta controle de resultados de ensaios com cloreto de sódio

5.2 Determinação da CL₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas do teste de toxicidade aguda em *D. rerio*

Os ensaios com estes organismos foram desenvolvidos conforme a norma de referência ABNT NBR 15088, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (ABNT, 2011), assim como os outros estudos desta pesquisa. Com relação à estrutura de qualidade para os ensaios, também foram efetuados dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelos princípios de Boas Práticas de Laboratórios (INMETRO, 2009). A substância de referência utilizada para compor as cartas de controle também foi o dicromato de potássio, seguindo conforme estabelecido na ABNT NBR 15088, com um valor de 1,06 mg.L⁻¹ (intervalo de confiança 95% = 0,93 a 1,21 mg.L⁻¹), para a comprovação da viabilidade de uso do sistema teste (ABNT, 2011).

O sistema teste para os ensaios de toxicidade dos solventes desta pesquisa foi preparado para a exposição da espécie *D. rerio* nas amostras destes solventes, para a determinação da Concentração Letal 50 (CL₅₀) em 96 horas de exposição. Com relação aos cálculos dos resultados e análises estatísticas dos dados, também foi utilizado o software Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1977).

No Quadro 3 segue as informações do certificado de qualidade do material de referência, dicromato de potássio (MERCK, 2013).

Substancia -	Certificado	Nº CAS	Lote/	Marca	Fórmula
teste/			Validade		Molecular
Concentração					
Dicromato de Potássio/ 100%		7778- 50-9	K42728964 / 30/set/2016	Merck	K2 Cr2 O7

Quadro 3 – Lista de informações do dicromato de potássio (MERCK, 2013)

5.2.1 Preparo das soluções

A solução estoque dos solventes para o teste preliminar foi preparada a partir das pesagens estão descritas no Anexo B e solubilizadas em água deionizada, e completadas a um volume final de 500 ml. Para a homogeneização, o balão foi agitado por 1 minuto. Neste mesmo anexo encontram-se também as tabelas das soluções e concentrações finais dos testes preliminares e definitivos.

5.2.2 Procedimento experimental para os ensaios com *D. rerio*

Os peixes foram alimentados diariamente até 24 horas antes do início dos testes, e durante o tempo de exposição à substância teste, os peixes não foram alimentados, conforme ABNT NBR 15088/11 (ABNT, 2011).

A vidraria foi lavada com uma solução de detergente comercial neutro, logo após o enxágue foi aplicado uma solução de ácido nítrico 3%, novamente ela foi enxaguada, e colocada para secar com auxílio de acetona comercial. No caso destes ensaios, além das vidrarias de preparo das soluções estoque, foram utilizados beckers de aço de 3 litros, que passou pelo mesmo processo de lavagem e preparo, antes da sua utilização.

Na fase inicial do preparo dos materiais e soluções, destaca-se também o processo de utilização da água de diluição que foi preparada a partir da água distribuída pelo Serviço Municipal de Água e Esgoto (SEMAE), desclorada, com dureza entre 85,68 e 86,70 mg.L⁻¹ em CaCO₃ e pH entre 7,6 e 7,8.Os parâmetros da água, oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), pH, temperatura (°C), e dureza (mg de CaCO₃.L⁻¹), foram analisados no início do teste e a cada renovação da solução teste, e estavam dentro dos limites aceitáveis.

Ao início do manejo do sistema teste, os peixes foram transferidos do aquário de aclimatação para um recipiente plástico contendo água de diluição, e

posteriormente para os recipientes utilizados nos testes com o auxílio de um puçá com rede de nylon. O teste preliminar foi conduzido em sistema estático, enquanto o teste definitivo foi conduzido em sistema semi-estático, com renovação diária da solução teste.

Neste teste a temperatura foi mantida entre 21°C e 25°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz a cada 24 horas. Juntamente com os testes definitivos, foram conduzidos um teste controle somente com a água utilizada nos ensaios, para verificação da normalidade do meio. A mortalidade e dados de efeitos sub-letais foram registrados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas contados a partir do início dos testes.

Para a obtenção dos resultados, foi necessário quantificar a mortalidade cumulativa dos peixes (*D. rerio*) nas diferentes concentrações da substância teste, sendo registrada no período de exposição de 24, 48, 72 e 96 horas apresentada na Tabela 34.

Após a concentração dos testes, e a faixa de toxidade dos solventes desta pesquisa nos organismos, foram aplicados os testes definitivos utilizando 10 peixes, com as concentrações nominais de acordo com o Anexo A.

Para o controle de qualidade dos testes, são emitidas cartas de controle com o uso do dicromato de potássio como padrão de referência. A faixa que os resultados devem se apresentar está entre 90 mg.L⁻¹ a 170 mg.L⁻¹, tendo como referência a OECD (2004). Este teste foi efetuado juntamente com o teste definitivo para verificação da sensibilidade do sistema teste. Após a realização destes controles, o teste definitivo do controle foi conduzido utilizando 10 peixes em cada concentração teste, com as concentrações nominais de 100; 180; 320; 560 mg.L⁻¹ e controle, com duração de 24 horas. A Figura 9 mostra os resultados destes ensaios no período entre março de 2013 a agosto de 2014.

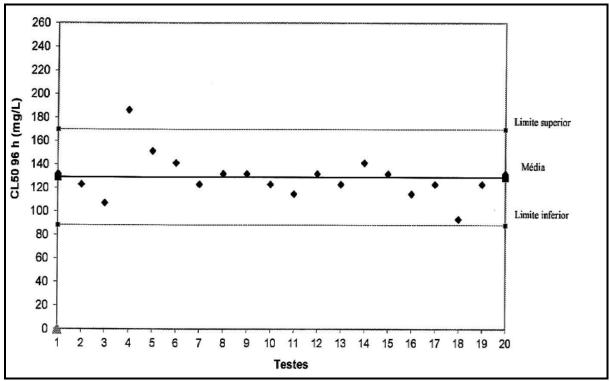


Figura 10 - Carta controle de resultados de ensaios com dicromato de potássio para *D. rerio*

Para o uso de animais foi seguido protocolo interno específico de controle de uso de animais vertebrados, onde esta utilização somente pode ser efetuada mediante a uma avaliação e a aprovação por meio da emissão de um Parecer do Comitê de Ética de Uso de Animais da Biogari. A cópia deste parecer está no Anexo D.

5.3 Determinação da CL₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometanos e suas misturas dos testes de toxidade crônica em larvas de *D. rerio*

Para este estudo foram utilizadas larvas da espécie *D. rerio*, com um estágio de eclosão das larvas de 24 horas. O sistema teste foi obtido de desovas de matrizes reprodutoras mantidas no Laboratório de Biologia Aquática da BIOAGRI Laboratórios Ltda., e com o uso do dicromato de potássio como material de referência, semelhante ao item 5.2. Para a expressão dos resultados foram utilizados os cálculos estatísticos para avaliar os efeitos tóxicos nos organismos, conforme o teste de Fisher, e calculado por meio de software específico TOXTAT (WEST; GULLEY, 1996).

A solução estoque dos solventes para o teste preliminar e definitivo foi preparada a partir das pesagens descritas nas tabelas do Anexo B, com a utilização das mesmas concentrações do teste agudo de *D. rerio*, e solubilizadas em água deionizada. Neste mesmo anexo, estas as soluções e concentrações finais deste ensaio. Para o preparo destas soluções os balões de preparo foram agitados por 1 minuto. A água utilizada para os ensaios foi deionizada e retirada de equipamentos com controle de limpeza e manutenção.

A água de diluição (deionizada) foi preparada a partir da água distribuída pelo Serviço Municipal de Água e Esgoto (SEMAE), sendo desclorada, com dureza entre 85,68 e 86,70 mg.L⁻¹ em CaCO₃ e pH entre 7,6 e 7,8. Os parâmetros que garantem que a água não interfere nos resultados dos testes, como, oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), pH, temperatura (°C), e dureza (mg de CaCO₃.L⁻¹), foram analisados no início do teste e a cada renovação da solução teste, apresentando resultados dentro dos limites aceitáveis.

5.3.1 Procedimento experimental dos ensaios crônicos com larvas de *D. rerio*

Os reprodutores foram mantidos em aquários e alimentados diariamente com Artemia sp adultas e ração comercial para peixes TetraMin Tropical Flakes com 48% de proteína. Foram mantidas e controladas as condições ambientais, tais como temperatura da água, fotoperíodo e qualidade da água em níveis adequados aos animais.

De acordo com o objetivo deste estudo, que foi avaliar os efeitos letais e subletais dos solventes em larvas de *D. rerio*, para avaliar a toxicidade crônica, foi conduzido um teste preliminar para determinar a faixa de toxicidade da substância teste. De acordo com os resultados desse teste foi conduzido o teste definitivo, com as concentrações nominais da substância teste já apresentadas em capítulo anterior, e os seus respectivos controles, com a utilização de 10 larvas por concentração, distribuídas em 4 réplicas. Para o monitoramento dos ensaios, os dados de mortalidade, efeitos sub-letais e comportamentais foram registrados a cada 24 horas, durante o período de 7 dias de teste.

Primeiramente, as larvas foram transferidas dos vasos para os recipientes do teste através de pipetas Pasteur. Após esta transferência foi efetuado um teste preliminar em sistema semi-estático por 7 dias, com renovação diária da solução

teste. Foram adicionadas amostras de solventes contidos em recipientes de teste com 10 larvas de peixe por concentração (ABNT, 2007).

Em função da faixa de toxicidade do teste preliminar, foi conduzido o teste definitivo utilizando as concentrações presentes na Tabela 35, distribuídas em 4 repetições, ou seja, 40 larvas por repetição (ABNT, 2007). Para o controle de qualidade dos resultados, foi conduzido paralelamente um ensaio somente com água de diluição.

Com relação aos padrões de condições ambientais e físico-químicas, nos testes, a temperatura foi mantida em 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água foram medidos a cada renovação da solução teste em uma das repetições de cada concentração e no controle. Somente a dureza foi medida a cada nova diluição de amostra (ABNT, 2007).

Durante o teste definitivo, as larvas de peixes foram alimentadas com uma suspensão concentrada de náuplios de *Artemia* recentemente eclodida (com menos de 48 horas de idade sem alimentação - ABNT, 2007). O número de organismos mortos e as respostas subletal/comportamental foram registradas a cada 24 horas, sendo que as larvas mortas foram removidas em cada avaliação.

5.3.2 Controles de Referências

Para a garantia da qualidade e verificação da eficácia da aplicação deste procedimento com relação à norma de referência, foi conduzido um teste com a substância de referência, dicromato de potássio. Este foi conduzido como mencionado acima para o teste definitivo, porém com as concentrações nominais de 18; 32; 56; 100; 180 mg.L⁻¹ e controle, com duração de 168 horas. Este teste é efetuado também para avaliar a sensibilidade dos peixes a cada lote de criação.

A Figura 10 mostra o gráfico que estão compilados os resultados das cartas de controle de julho de 2012 a janeiro de 2015, onde os resultados devem permanecer entre 70 mg.L⁻¹ a 200 mg.L⁻¹ (OECD, 2004).

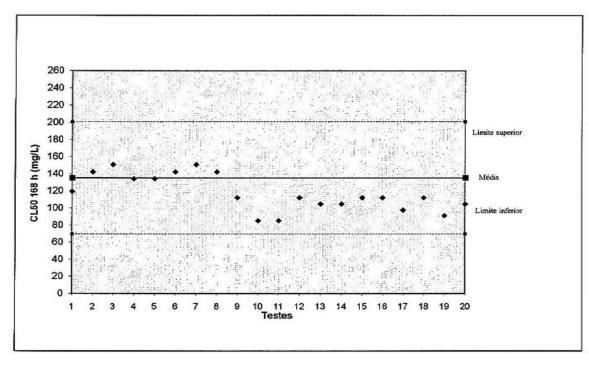


Figura 11 - Carta controle de resultados de ensaios com dicromato de potássio com larva de *D. rerio*

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da toxicidade aguda pela CE₅₀ de acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas em *D. magna e D. similis*

Os resultados de imobilidade dos organismos do teste com dicromato de potássio estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Número de *D. similis* imóveis em 24 Horas de exposição durante o teste com a substância de referência

		Número	de organismos	imóveis		
Concentração _		24 horas				
(mg.L ⁻¹)	а	b	С	d	% de imobilidade total em 24 horas	
2,4	5	5	5	5	100	
1,8	5	5	5	5	100	
1,0	2	2	2	2	40	
0,56	0	0	0	0	0	
0,32	0	0	0	0	0	
Controle	0	0	0	0	0	

Nota 1: a, b, c e d = réplicas contendo 5 organismos cada

Portanto, o valor obtido de CE_{50} 24 horas para substância de referência, dicromato de potássio, foi 1,06 mg.L⁻¹ (intervalo de confiança 95% = 0,93 a 1,21 mg.L⁻¹), mostrando assim, a viabilidade de uso do sistema teste (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984).

No teste definitivo, o número de organismos imóveis em 24 e 48 horas para cada concentração teste e o controle estão apresentados na Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Número de organismos imóveis em 24 e 48 horas de exposição aos solventes durante o teste definitivo em D. magna

Número de organismos imóveis Concentração teste (nominal) METANOL/ METANOL/ DICLOROMETANO/ ACETONITRILA/ % de DICLOROMETANO CLOROFÓRMIO ACETONITRILA **METANOL** ACETONITRILA imobilidade imobilidade imobilidade imobilidade imobilidade CLOROFÓRMIO imobilidade CLOROFÓRMIO/ imobilidade DICLOROMETANO total em 48 horas ABCD А В C D ABCD ABCD А В C D А В C D ABCD (mg.L-1) 5 5 100000 5 5 5 5 100 5 5 5 5 100 5 5 100 50000 5 5 5 5 100 5 5 5 5 100 5 5 5 5 100 25000 2 3 3 3 55 3 3 4 3 65 3 2 3 3 55 12500 1 0 1 1 1 0 1 2 15 1 1 1 1 0 6250 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 5000 0 0 0 0 0 0 5 5 100 5 5 100 5 100 5 5 100 2500 3 4 70 5 5 5 5 100 4 3 70 2 2 2 2 40 1250 20 5 5 5 5 100 0 0 0 0 0 0 0 625 0 0 80 4 4 4 4 0 0 312,5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 Controle 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 Resultado da 21763 555 19614 1894 21022 2176 2679 CE50(mg.L-1) Desvio mg.L⁻¹ 18000 - 2631316172 - 237891569 - 2287 448 - 574 17248 - 25622 1888 - 25082301 - 3118

Nota 1: a, b, c e d = réplicas contendo 5 organismos cada

 $(\pm 95\%)$

Tabela 10 - Número de organismos imóveis em 24 e 48 horas de exposição aos solventes durante o teste definitivo em *D. similis*

															Ν	lúm	ero	de	orga	anisr	nos	s im	ιόνε	is											
Concentração teste (nominal)	ACI	ЕТО	NITR	RILA	% de imobilidade total em 48 horas		1	ΛΕΤ <i>Α</i>	ANOL	% de imobilidade total em 48 horas	DIC	LORG	OMET	ANO	% o imobili total 48 ho	dade em	CLO	ROFÓI	RMIO	% d imobilio total 48 ho	dade em		ETAN(TONIT		% de imobilida total er 48 hora	n	DICLOI CLOF	ROMET ROFÓR		% c imobili total 48 hc	dade em	ACE CLO	IETANO TONIT ROFÓ DROMI	RILA/	% de imobilidade total em 48 horas
(mg.L-1)	Α	В	С	D		Α	. E	C	D	_	Α	В	С	D		Α	В	С	D		Α	В	С	D		Α	В	С	D		Α	В	С	D	
20000	5	5	5	5	100	5	- 5	5	5	100											5	5	5	5	100										
10000	4	4	3	4	75	3	3	3	3	60	5	5	5	5	100						1	1	2	1	25										
5000	2	1	1	2	30	1	2	: 1	1	25	5	5	5	5	100	5	5	5	5	100	0	0	0	0	0	5	5	5	5	100	5	5	5	5	
2500	0	0	0	0	0	0	C	0	0	0	5	5	5	5	100						0	0	0	0	0	5	5	5	5	100	3	3	2	3	
1250	0	0	0	0	0	0	C	0	0	0	3	3	3	3	60						0	0	0	0	0	3	2	2	2	45	0	0	0	0	
1000																5	5	5	5	100															
625											1	2	1	2	30											0	0	0	0	0	0	0	0	0	
500																5	5	5	5	100															
312,5											0	0	0	0	0											0	0	0	0	0	0	0	0	0	
250																5	5	5	5	100															
156,2											0	0	0	0	0																				
125																3	4	3	4	70															
62,5																0	0	0	0	0															
31,25																0	0	0	0	0															
Controle Resultado	0	0	0	0	0	0	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
da CE50(mg.L- 1) Desvio mg.L ⁻¹		į		830, 7 – 8					7845, 06 –	,84 9608				47,1 - 11	66				304,5 61 - 3					5422 54 - 2	,11 20062				565,83 8 - 18				3	3404,3 192 - 3	

Diante dos resultados observados nestes dois ensaios, pode-se verificar que os solventes dos grupos não halogenados possui, devido às suas características químicas, um efeito toxicológico menor do que os resultados apresentados pelos solventes do grupo dos halogenados, e que os resultados entre as espécies testadas, *D. similis* e *D. magna*, também apresentaram resultados diferentes devido à diferença da sensibilidade dos organismos.

Observou-se, também, que os solventes acetonitrila e metanol, testados individualmente, apresentaram os resultados de 6.830,2 mg.L⁻¹ e 7.845,8 mg/L, respectivamente para *D. similis*, e 21.763,8 mg.L⁻¹ e 19.614,6 mg.L⁻¹, respectivamente para *D. magna*. Ao se comparar a toxicidade entre estes dois solventes, a acetonitrila, para estes ensaios e nestas condições, causou uma toxidade ligeiramente maior do que o metanol, para os organismos *D. similis*, porém para *D. magna* a toxicidade é semelhante.

Para os resultados dos solventes do grupo dos halogenados para *D. similis*, a CE₅₀ do diclorometano foi de 947,1 mg.L⁻¹ e do clorofórmio de 304,5 mg.L⁻¹. Para *D. magna* os resultados foram de 1.894,6 mg.L⁻¹ e 555,8 mg.L⁻¹, respectivamente, para estes mesmos solventes. Estes resultados mostram, assim, uma toxidade maior do clorofórmio frente ao diclorometano.

Além dos resultados dos ensaios de solventes testados individualmente, as misturas entre os solventes halogenados, não halogenados e a mistura de todos, também apresentaram resultados peculiares frente às suas características químicas. A mistura entre acetonitrila e metanol (50/50) apresentou uma CE₅₀ de 15.422 mg.L⁻¹ para *D. similis* e 21.022 mg.L⁻¹ para *D. magna*. Para a mistura de clorofórmio e diclorometano os resultados foram de 1.565,8 mg.L⁻¹ para *D. similis* e 2.176 mg.L⁻¹ para *D. magna*.

Um estudo semelhante à esta pesquisa, porém com testes efetuados com efluentes industriais com amostras de extrato solubilizado de resíduos classe 2 provenientes de indústrias de diferentes ramos, foi realizados por Rodrigues (2005) que utilizou 18 amostras, e mostrou que a maioria das amostras apresentou-se uma toxicidade superior do que à classificação inicial de classe IIA e IIB, com valores do fator de toxicidade variando entre 64 a 128 para *D. magna*, e 256 para *V. fischeri*, assim, seriam necessárias ser encaminhadas para aterro Classe 1, devido aos resultados tóxicos demonstrados pelos ensaios nestes organismos.

Nesta mesma linha de pesquisa, com objetivo de avaliar os possíveis impactos que podem causar algumas moléculas de metais, fenóis, surfactantes, entre outras, ao contato com as águas dos rios, Maranho (2012) realizou coletas de amostras da fauna bentônica do Rio Corumbataí. Os testes realizados foram analisados para verificar as características físico-química das águas, mas também a toxicidade crônica em *C. dúbia.* Nos estudos com as amostras de água deste rio, os resultados demonstraram que houve uma degradação em alguns trechos devido aos indicadores apresentados pelos testes com *c.* dúbia, e também, além destes testes realizados, em algumas amostras foram encontradas a presença de fenol em concentrações variadas.

Em ensaios ecotoxicológicos efetuados diretamente com a água e o sedimento do rio Corumbataí, Jardim (2004) utilizou organismos do filo dos cnidárias *Hydra attenuatta*, e das cladóceras *D. magna* e *D. similis*, também para determinar a toxicidade crônica e aguda das amostras de águas e sedimentos nestes organismos. Os resultados encontrados, mostraram que existe uma heterogeneidade com relação aos locais de amostragens, onde a toxicidade foi identificada somente nas amostragens próximas aos municípios de Analândia, Rio Claro, Corumbataí e Piracicaba.

Semelhante à esta abordagem, foi conduzido um estudo com amostras com a presença de propranolol, um ativo de fármacos utilizado para controle de doenças cardíacas como a angina e a hipertensão. Os ensaios foram realizados com *Ceriodaphnia silvestri* para se estudar a toxicidade crônica e aguda nestes organismos. Os resultados encontrados mostraram que uma concentração muita baixa deste ativo na água, tanto a destilada como a reconstituída, possui um alto potencial de causar efeitos tóxicos agudos causando a mortalidade dos organismos, estando a concentração desta toxicidade nas faixas em torno de 2,6 mg/L a 2,8 mg/L, um valor de toxicidade muito maior se comparado aos solventes dos ensaios agudos desta pesquisa, por exemplo, que ficaram na faixa de 300 mg.L-1 a 6800 mg.L-1, aproximadamente (ROSA, 2008).

Tendo como base os resultados dos ensaios de toxicidade aguda para microcrustáceos desta pesquisa verifica-se que a mistura dos solventes não halogenados possui uma toxicidade de aproximadamente 10 vezes menor do que a mistura dos solventes halogenados. O resultado das misturas entre os quatros solventes, com adições em partes iguais (25%.), foi de 3.404,4 mg.L⁻¹ para *D. similis* e 2.679,4 mg.L⁻¹ para *D. magna*, sendo este um resultado mais próximo da mistura entre

os solventes halogenados, clorofórmio e diclorometano. Desta forma, pode-se inferir que, se ocorrer uma contaminação de solventes halogenados em misturas de solventes não halogenados, os efeitos toxicológicos podem sofrer uma alteração, tendo em vista que a comparação entre os resultados da mistura entre os solventes não halogenados, com mistura entre os quatro solventes foi de aproximadamente 10 vezes para *D. magna* e 5 vezes para *D. similis*.

Destaca-se que somente com estes dados não é possível confirmar a potencialização ou adição destes efeitos toxicológicos para outras concentrações, diferentes das que foram testadas neste trabalho, devido ao fato de que as concentrações testadas com a misturas dos solventes foram conduzidas em partes iguais, ou seja, 50% para testes com dois solventes e 25% para testes com quatro solventes.

6.2 Determinação da CL₅₀ da toxicidade aguda dos solventes em *D. rerio*

A mortalidade dos peixes em 24 horas de exposição nas diferentes concentrações de dicromato de potássio no teste de referência está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Mortalidade cumulativa do peixe *D. rerio* durante o período de exposição à substância de referência (dicromato de potássio)

Concentração nominal (mg.L ⁻¹)	Número de peixes mortos no período teste (24 horas)
Controle	0
100	0
180	2
320	8
560	10

Tabela 12 – Número de indivíduos mortos de *D. rerio* durante o período de exposição aos solventes durante o teste definitivo

0									Núm	nero	de p	oeixe	es m	orto	s no	per	íodo	tes	te (h	oras	s)							
Conc. nominal (mg.L ⁻¹)		Met	anol		Α	ceto	onitri	ila	Α		onitri anol		Dic	clord	omet	ano	C	lorc	fórm	nio		clord			С	Met loro	nitri anol fórm met	/ io/
Tempo (h)	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
50000	10								10																			
25000	10								10																			
12500	2	2	0	0					3	1	3	1																
10000					10																							
6250	0	0	2	1					0	1	0	0																
5000					1	0	3	0																				
3125	0	0	0	0					0	0	0	0																
2500					1	0	0	0																				
1250					0	0	0	1																				
1000													10								10				10			
625					0	0	0	0																				
500													0	0	0	0	10				0	0	3	5	0	0	0	0
250													0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0
125													0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62,5													0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0
31,25																	0	0	0	0								
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Resultado																												
da		10	153			EO	000			0.	173			7	07			2	29			2	07			7	07	
CL50(mg.L -1)		10	153			50	100			92	113			,	07			3	29			3	07			,	07	
Desvio mg.L ⁻¹ (±95%)	75	542 -	136	68	35	511 -	- 61	98	76	08 -	- 117	795	Nã	ăo a	plicá	ivel	2	289	– 37	6	:	233	- 40	6	Nã	io a	plicá	ıvel

Apresentando semelhantes níveis toxicológicos dos produtos testados nos microcrustáceos, de acordo com os dados das Tabelas 9 e 10, verifica-se, assim, que para a espécie de *D. rerio* a acetonitrila causou uma toxicidade duas vezes maior do que o metanol, com os resultados de 5000 mg.L⁻¹ e 10.153 mg.L⁻¹, respectivamente. No teste da mistura entre estes solventes não halogenados, o resultado de 9.473 mg.L⁻¹, assemelha-se ao resultado do solvente metanol, sendo assim, não caracterizando uma potenciação da toxicidade desta mistura, mas evidenciando um efeito antagônico.

Os resultados apresentados pelos testes com solventes halogenados, o clorofórmio mostrou-se com a toxicidade maior do que o diclorometano nas amostras testadas individualmente, seguindo a mesma dinâmica dos resultados com os microcrustáceos. Entre os resultados, a CL₅₀ do clorofórmio foi de 329,9 mg.L⁻¹ e do diclorometano foi de 707,1 mg.L⁻¹, ou seja, a toxicidade do clorofórmio foi

aproximadamente três vezes maior do que o diclorometano, nas condições destes ensaios.

Portanto, ao se observar os resultados dos testes com a mistura destes solventes, a CL₅₀ praticamente foi a mesma da amostra de clorofórmio com 307,8 mg.L⁻¹, desta forma, nenhum efeito antagônico ou de potenciação (RAND, 1995) foi observado, tendo em vista que a toxicidade do diclorometano não interferiu na toxicidade aguda do clorofórmio em *D. rerio*. De acordo com a OSHA (2011) se a mistura for diluída por uma substância de concentração tóxica menor do que a outra, e a mistura não se apresentar mais tóxica, significa que a mistura não teve alteração das suas características toxicológicas, não caracterizando a presença de algum efeito.

A mistura entre os quatro solventes usados em partes iguais de 25%, e assim solubilizados de acordo com as concentrações determinadas nos testes preliminares, verifica-se que ao se comparar com as misturas entre os solventes não halogenados, com a CL₅₀ de 9.473 mg.L⁻¹ e dos halogenados com a CL₅₀ de 307,8 mg.L⁻¹, a amostra dos solventes não halogenados sofreu uma potenciação de um pouco mais de 10 vezes na sua toxicidade, quando misturados em partes iguais com solventes não halogenados. Desta forma, assim como observado os resultados com os microcrustáceos, pode-se afirmar que caso haja mistura entre solventes halogenados e não halogenados com outras concentrações, o potencial toxicológico da mistura dos solventes não halogenados podem sofrer efeitos aditivos.

Dados retirados de ensaios semelhantes a estes de estudos da WHO (1993, 1994, 1996, 1997) e Federal Environmental Agency (2014) com *P. promelas* mostra estas mesmas características toxicológicas referentes a estes solventes testados individualmente. Para os ensaios nas condições específicas destas instituições, os resultados da CL₅₀ dos solventes não halogenados acetonitrila e metanol ficaram na faixa de 1.000 mg.L⁻¹ a 1.700 mg.L⁻¹, e 19.000 mg.L⁻¹ a 30.000 mg.L⁻¹, respectivamente, mostrando assim uma maior toxicidade da acetonitrila frente ao metanol. Nas condições dos ensaios apresentados por estas instituições, os solventes clorofórmio e diclorometano apresentaram toxicidade semelhantes dos observados nesta pesquisa, estando em uma faixa de 100 mg.L⁻¹ a 130 mg.L⁻¹ , e 300 mg.L⁻¹ a 510 mg.L⁻¹, respectivamente, também confirmando a maior toxicidade do clorofórmio se comparado ao diclorometano. Com relação a estudos efetuados

com misturas entre solventes, não foram encontrados dados de estudos para análises comparativas.

Em um estudo semelhante à este, foi efetuado ensaios ecotoxicológicos em peixes pacu (*Piractus mesopotamicus* Holmerg) e paulistinha (*D. rerio*) para se determinar a toxicidade aguda do ativo de agrotóxico fipronil presente na água do rio Corumbataí. De acordo com os resultados ocorreu uma diferença na toxicidade das amostras entre as duas espécies, onde para o pacu a CL₅₀ ficou em 1,04 mg.L⁻¹ e para o paulistinha a CL₅₀ ficou em 0,34 mg.L⁻¹ (CELLA, 2009).

Outro trabalho desenvolvido por Masutti (2004), tendo como foco a presença de metais em águas, foi avaliada a distribuição dos metais Cr e Cu sobre ecossistemas aquáticos lênticos em diversas espécies, entre elas *D.similis, C. dúbia* e *Oreochromis niloticus* (peixe). Este trabalho mostrou que os metais apresentaram um efeito negativo em amostras de águas de acordo com suas variáveis como oxigênio, clorofila, materiais em suspensão e outros, sendo assim os efeitos do Cr se mostraram mais agressivos que Cu.

Relacionado a este mesmo tema, um outro trabalho abordou a toxicidade de produtos químicos em água, que avaliou a contaminação do *Long Lake* dos Estados Unidos por cloreto de vinila, tricloroetileno e dicloroetileno, próximo à New Brighton/ Minesota. Este trabalho, elaborado pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2008), concluiu que as concentrações encontradas neste ecossistema estavam em torno de 700 μg.L⁻¹ a 1000 μg.L⁻¹, onde os limites aceitáveis são de 40 μg.L⁻¹ a 50 μg.L⁻¹. De acordo com a instituição responsável pelos estudos, estes solventes, em determinadas concentrações, possuem efeitos carcinogênicos e podem entrar em contato direto com os seres humanos por meio de atividades de lazer neste local.

6.3 Determinação da CL₅₀ de acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas que causa toxicidade crônica em larva *D. rerio*

6.3.1 Resultados dos ensaios com as larvas de *D. rerio*

A mortalidade cumulativa de *D. rerio* nas diferentes concentrações dos solventes testados foi registrada diariamente, e encontra-se na Tabela 37.

Os dados referentes aos ensaios de toxicidade crônica em larvas de peixes da espécie *D. rerio*, apresentadas nas Tabelas 38 e 39, demonstram quais foram as maiores concentrações cujos efeitos não foram observados (CENO). A importância desta informação, segundo Capizzi et al. (1985 apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006), é que encontrar estas concentrações demonstram a variabilidade de interesse biológico, como sobrevivência, reprodução, crescimento, etc. Para este autor, esta variabilidade somente pode ser calculada por testes de hipóteses utilizando, além do CENO (Concentração de Efeitos Não Observados), o CEO (Concentração de Efeitos Observados), sendo que com o cálculo destes valores pode ser encontrado o valor crônico (VC), também apresentado na Tabela 13 (BAILER; ORIS, 1993).

Tabela 13 – Número de mortalidade de D. rerio durante o período de exposição à substância teste no teste definitivo

																												N	lúme	ero de	e lan	vas r	norta	as na	s dif	feren	es c	once	ntra	ções	test	е																									_
																																Co	ncen	traçã	io no	omina	al (m	g/L)																													
												Ac	eto	nitrila	а																					Meta	nol																			Ac	etoni	rila/ N	∕letar	nol							
				625				12	50				250	00			50	000			1	0000)		1	562,	5			312	5			625	50			1250	00			2500	00			5000	00			312	5			6250)			2500			250	000			500	000	
Dias	Controle	R	1 F	2 F	3 F	84	R1	R2	R3	R4	4 R	1 F	R2	R3	R4	R1	R2	R3	8 R4	1 R1	1 R	2 R	3 R	4 R	1 R	2 R	3 F	R4 F	R1	R2 F	3	R4	R1	R2 I	R3	R4	R1	R2 I	R3	R4 F	R1 I	R2 I	R3	R4	R1	R2 I	R3	R4	R1	R2 I	R3 I	R4 F	R1 F	R2 F	R3 F	R4 F	R1 R	2 R3	8 R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
1	0	C)))	0	0	0	0	0	1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	3	3	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
2	0	C)))	0	0	0	0	0	1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1 :	2 1	2	10	10	10	10	10	10	10	10
3	0	C)))	0	0	0	0	0	1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0 .	10	10 '	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0 1	10 1	0 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
4	0	C)))	0	0	0	0	0	1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0 .	10	10 '	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0 1	10 1	0 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
5	0	C)))	0	0	0	0	0	1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0 .	10	10 '	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0 1	10 1	0 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
6	0	C)))	0	8	6	7	7	10	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3	5	4	4	10 1	10 1	10 1	10 1	10 1	0 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
7	0	C)))	0	8	6	7	7	1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10) 1	0 10) 1	0 0) (0 (0	0 .	10	10 '	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3	5	4	4 1	10 1	10 1	10 1	10 1	10 1	0 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CENO(mg/L))										6	325																								1562	2,5																					562,5	;								
CEO(mg/L)											1	250)																							312	25																					3125									

																							Núm	ero d	le lar	vas r	nortas	nas	difer	entes	cond	centra	ações	teste																					
																										Cor	centr	ação	nom	inal (r	ng/L)																							
										Dic	cloro	meta	ano																Clor	ofórm	io														Dic	loron	netan	/ Clo	rofóri	nio					
			62	,5			12	25			25	50			500)		1	000			31,	,25			62				125			25	0			500			62,	5			125			25	0			500			10	000
Dias	Controle	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2 F	R3 F	R4 R	1 R2	2 R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3 R	4 R1	1 R2	2 R3	R4	R1	R2	R3 R	4 R	1 R2	R3	R4	R1	R2	R3 F	R4 F	R1 F	2 R	3 R4	₽ R1	R2	R3	R4 I	R1 F	R2 R	3 R4	₽ R1	R2	R3 F
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 10) 10	10	10	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0 (0 0	10	10	10 '
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 10) 10	10	10	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0 (0 0	10	10	10 1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0 10) 10	10	10	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0) 10	0 2	7	5	1	0	1	0	1	0 1	0	0	0	0	0	2	0 '	1 2	10	10	10 '
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 10) 10	10	10	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0) 10	0 2	7	5	1	0	1	0	1	0 1	0	0	0	0	0	2	0 '	1 2	10	10	10 '
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 10) 10	10	10	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (0	0	0	0	0	0) 10	0 2	7	5	1	0	1	0	1	0 1	0	0	0	0	0	2	0 '	1 2	10	10	10 1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4	3	9	10	9 ′	10 10) 10	10	10	0	0	0	0	0	0	0 0	0 (3	1	1	3	3	3	3 10	0 10	10	10	1	0	1	0	1	0 1	0	0	0	0	0	10 '	10 1	0 10	10	10	10 1
7	0	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	10	10 1	10 ′	10 10) 10	10	10	1	0	1	0	1	1	1 1	I 0	3	1	1	10	10	10 1	0 10	0 10	10	10	1	0	1	0	1	0 1	0	5	6	5	6	10 '	10 1	0 10	10	10	10 '
CENO(mg/L)										62,	5																		6	62,5																	12	25							
CEO(mg/L)										125	5																			125																	25	0							

				Núm	nero	de la	ırvas	mort	as n	as d	ifere	ntes	conc	entr	açõe	s tes	ste				
							C	once	ntraç	ão n	omir	nal (r	ng/L)							
						Α	ceto	nitrila	/ Me	etanc	l/Dic	loror	neta	no/ (Cloro	fórmi	0				
			13	25			2	50			5	00			10	00			20	00	
Dias	Controle	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10
3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	2	2	2	2	0	1	1	10	10	10	10
4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	2	2	2	2	0	1	1	10	10	10	10
5	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	2	2	2	2	0	1	1	10	10	10	10
6	0	0	0	0	0	4	4	2	2	5	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10
7	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CENO(mg/L)	·									12	5										
CEO(mg/L)										25	0										

- 1 1 4 4				A .		
1/1 clade	 Resultados de 	ne aneaine d	a taviaidada	cronica am	larvae da l	l) raria
Tabbia IT -	- เงษอนแลนบอ น	us chisalus u	c luxicidade	Citilica Cili	iai vas uc i	J. I GIIO

				Solvente	es (mg.L ⁻¹)		
Organismos	Acetonitrila	Metanol	Diclorometano	Clorofórmio	Acetonitrila/ Metanol (50/50)	Diclorometano/ Clorofórmio (50/50)	Acetonitrila/ Metanol/ Diclorometano/ Clorofórmio (25 al)
CENO	625	1562,5	62,5	62,5	1562,5	125	125
CEO	1250	3125	125	125	3125	250	250
VC	884	2210	88,4	88,4	2210	177	177

Os intervalos de confiança para este estudo variam entre 99,95% para mais ou para menos com relação aos resultados apresentados na Tabela 14. Nesta tabela, pode-se constatar que os efeitos de toxicidade mantiveram-se semelhantes aos resultados encontrados nos ensaios agudos, ou seja, os solventes não halogenados demonstraram-se menos tóxicos que os halogenados. Porém, por se tratar de ensaios de toxicidade crônica, os resultados do CENO referente aos testes com os solventes clorofórmio e diclorometano foram os mesmos, sendo de 62,5 mg.L-1. Com relação às misturas, o CENO referente aos testes dos solventes não halogenados, se apresentou com o mesmo resultado do metanol testado individualmente, e os resultados dos solventes halogenados foi ligeiramente maior dos mesmos testados individualmente, caracterizando-se, desta forma, como um efeito aditivo. Nestes ensaios, cabe destacar que o resultado referente à mistura de todos os solventes apresentou-se semelhante à mistura de clorofórmio e diclorometano com uma concentração de 125 mg.L⁻¹. Ao se comparar com o CENO dos testes com a mistura dos solventes não halogenados, demonstra-se que essa mistura potenciou os efeitos tóxicos crônicos dos solventes não halogenados em torno de 10 vezes, podendo assim, agir de forma diferenciada nos possíveis impactos aos ecossistemas aquáticos, referentes a reprodução, crescimento, desenvolvimento, etc, de alguns organismos deste ecossistema.

6.4 Determinação da CE₅₀ em *C. dúbia* dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas

As Tabelas com os registros dos testes com as amostras de solventes e suas misturas para a determinação da toxicidade crônica em *C. dúbia*, conforme a CE₅₀, estão no Anexo C.

Na Tabela 15 pode-se observar os valores a partir da expressão dos resultados. Seguindo a mesma premissa referente às afirmações de Capizzi et al. (1985 apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) utilizada na análise dos dados dos resultados dos ensaios de toxicidade crônica em larvas de *D. rerio* da Tabela 36,

constata-se, também, na Tabela 47, os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *C. dúbia.* O CENO referente aos testes com *C. dubia* com os solventes acetonitrila, metanol e as suas misturas em partes iguais, apresentaram resultados iguais de 1.250 mg.L⁻¹, com uma diferença 10 vezes maior do que os resultados com diclorometano e clorofórmio testados individualmente, que obteve um resultado de 125 mg.L⁻¹. Ao se comparar os resultados da mistura de todos os solventes com o valor de 312,5 mg.L⁻¹, com os resultados da mistura dos solventes não halogenados, confirma-se a semelhança dos resultados dos ensaios crônicos com larvas de peixes, onde ocorreu uma potenciação de 4 vezes maior dos efeitos, se comparados aos resultados da mistura somente com os solventes não halogenados.

Tabela 15 – Resultados da toxicidade crônica para *C. dúbia* com solventes e suas misturas

Amostras de Solventes	Expr	essão dos Resu	ıltados (mg/L)
Amostras de Solventes	CENO	CEO	VC
Acetonitrila	1250	2500	1768
Metanol	1250	2500	1768
Acetonitrila/ Metanol	1250	2500	1768
Clorofórmio	125	250	177
Diclorometano	125	250	177
Clorofórmio/ Diclorometano	312,5	625	442
Acetonitrila/ Metanol/ Clorofórmio/ Diclorometano	312,5	625	442

Os intervalos de confiança para este estudo variam entre 99,95% para mais ou para menos com relação aos resultados apresentados na Tabela 15.

6.5 Análises comparativa entre os solventes de um mesmo ensaio com diferentes organismos

De acordo com OECD (2000), os ensaios com misturas tratam-se de testes com substancias de multicomponentes, por compreenderem misturas complexas das substancias individuais. Ainda de acordo com a publicação deste órgão, existem dois tipos de soluções, as totalmente solúveis, e as parcialmente solúveis, onde as amostras com estas características desta pesquisa, levando em consideração as concentrações trabalhadas, todas foram totalmente solúveis, confirmando, assim, que as soluções não tiveram formação de corpo de fundo, não necessitando a

comprovação das concentrações testadas por outros equipamentos de análise de teor como cromatógrafos, ou espectrofotômetros.

Os resultados finais, e a determinação da CE₅₀ nos ensaios, podem ser verificados na Tabela 16 para análise dos efeitos toxicológicos dos solventes testados individualmente e suas misturas. Constam nesta Tabela os resultados da CE₅₀ de cada amostra, sendo as amostras de solventes testadas isoladamente, assim como as suas misturas nos organismos, *D. similis e D. magna*. Em uma análise comparativa inicial entre os organismos, pode-se verificar que a *D. similis* apresentou uma sensibilidade maior aos solventes do que a *D. magna*. Dentro do observado, verificou-se que a CE₅₀ dos ensaios dos solventes individuais para *D. similis* ficaram na faixa entre 6.000 mg.L⁻¹ a 8.000 mg.L⁻¹, para os solventes não halogenados, e 300 mg.L⁻¹ a 1.600 mg.L⁻¹ para os solventes halogenados. Para *D. magna* a faixa dos resultados diferenciou-se para 19.000 mg.L⁻¹ a 22.000 mg.L⁻¹ para os halogenados.

Outro ponto importante que deve ser considerado, entre a diferença da doseresposta dos dois sistemas teste, foi o resultado dos ensaios com a mistura em partes iguais (50/50) entre os solventes halogenados e não halogenados. Com os resultados dos solventes não halogenados, verificou-se que a CE50 para a *D. similis* foi maior com a mistura dos solventes, sendo que as concentrações letais praticamente dobraram com relação a CE50 dos organismos testados com os solventes individuais. No caso da *D. magna* a CE50 da mistura dos solventes mantiveram-se, praticamente, na mesma faixa dos resultados dos solventes testados individualmente. Com relação aos solventes halogenados a CE50 para a *D. similis* foi maior com a mistura dos solventes, sendo que as concentrações letais apresentaram-se com um valor bem acima da faixa da toxicidade do teste com diclorometano isolado, ou seja, sendo acima de 1.500 mg.L-1. Da mesma forma ocorreu com o teste da *D. magna*, a CE50 da mistura dos solventes mantiveram-se, praticamente, na mesma faixa dos resultados do solvente diclorometano testado individualmente, entre 1.800 mg.L-1 e 2.200 mg.L-1.

Tabela 16 - Resultados da CE₅₀ dos Ensaios Ecotoxicológicos em microcrustáceos

			;	Solventes (mg.L ⁻¹)		
Organismos	Acetonitrila	Metanol	Diclorometano	Clorofórmio	Acetonitrila/ Metanol (50/50)	Diclorometano/ Clorofórmio (50/50)	Acetonitrila/ Metanol/ Diclorometano/ Clorofórmio (25 al)
D. similis	6830,2	7845,8	947,1	304,52	15422	1565,83	3404,36
D. magna	21763,8	19614,6	1894,65	555,83	21022	2176, 38	2679,43

Diante destes resultados foi possível avaliar, também, se nestes testes a toxicidade das misturas dos solventes aumentou, se comparados com os resultados dos testes com eles isolados, ou se ocorreu somente um efeito antagônico. Portanto, ao se observar os resultados da CE₅₀ da mistura nestes ensaios, que se apresentou na faixa 15.400 mg.L⁻¹ a 21.100 mg.L⁻¹ para acetonitrila e metanol, e 1.500 mg.L⁻¹ a 2.200 mg.L⁻¹ para diclorometano e clorofórmio, não se pode afirmar que ocorreu uma potenciação nas amostras da mistura dos solventes, se comparados com os resultados dos solventes testados isoladamente. No caso da *D. similis*, a amostra com a mistura dos solventes apresentou um efeito toxicológico menor se comparados aos ensaios com os solventes testados individualmente. Desta forma, considera-se que ocorreu um efeito antagônico, pois a mistura influenciou no resultado se comparado aos testes com os produtos isoladamente, porém com o valor de toxidade menor.

Da mesma forma ocorreu para os ensaios com a *D. magna*, onde verificou-se que os valores da toxicidade da mistura de todos os solventes mantiveram-se semelhantes aos valores do teste individual do solvente diclorometano. Mas comparando-se com os resultados do teste com clorofórmio, observa-se que o resultado com a amostra de todos os solventes misturados apresentou um efeito toxicológico menor para este organismo.

Para a mistura entre os solventes halogenados e os não halogenados, tendo a sua divisão de concentrações em partes iguais entre os quatro solventes testados, observou-se que ao compararmos com os resultados da mistura total, somente com a mistura dos solventes halogenados, pode-se considerar que não ocorreu nenhum efeito, pois os resultados mantiveram-se praticamente na mesma faixa de toxicidade, ou seja, entre 1.500 mg.L⁻¹ a 3.500 mg.L⁻¹ para *D. similis*, e 2.000 mg.L⁻¹

a 2.700 mg.L⁻¹ para *D. magna*. Desta forma, pode-se verificar que as misturas dos solventes clorados potencializam o efeito tóxico dos solventes não halogenados, resultando em uma potenciação da toxicidade para *D. similis* de 4,5 vezes, comum resultado inicial de 15.422 mg.L⁻¹ da mistura entre os solventes não halogenados, e para uma concentração final de 3.404 mg.L⁻¹ da mistura entre os solventes não halogenados com os halogenados. Semelhantemente para *D.magna*, o aumento do potencial foi de 7,8 vezes, ou seja, de uma concentração de 21.022 mg.L⁻¹ para a mistura somente com solventes não halogenados, a mistura com todos os solventes a concentração da toxicidade ficou em 2.679 mg.L⁻¹.

De acordo com o que foi apresentado por estes ensaios, é possível, também, estabelecer uma análise comparativa com os dados da toxicidade do diclorometano e clorofórmio para *D. magna* presentes nas suas fichas técnicas de segurança. Nesta ficha os resultados da CE₅₀ constam, respectivamente, de 1.682 mg.L⁻¹ e 79 mg.L⁻¹, utilizando a metodologia DIN 38412 (MERCK, 2013), estando, portanto, semelhante a CE₅₀ apresentada por este trabalho neste mesmo organismo, que foi de 1.894 mg.L⁻¹, com a amostra de diclorometano. No caso do clorofórmio, o resultado foi de 555,8 mg.L⁻¹, porém a metodologia e as condições dos ensaios foram diferentes dos resultados apresentados pelas fichas de segurança. No caso dos testes com *D. similis*, não foram encontrados estudos recentes para traçar outras avaliações comparativas de acordo com esta referência.

Ao se comparar os resultados destes ensaios com os valores de referência da publicação dos Critérios de Saúde Ambiental sobre Segurança Química da Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO, 1993; WHO, 1997), a CE₅₀ para *D.magna* do produto metanol e acetonitrila é de >10.000 mg.L⁻¹. Com estes dados observa-se que os valores apresentados por este trabalho estão próximos, sendo a CE₅₀ 21.763 mg.L⁻¹ para acetonitrila e 19.614 mg.L⁻¹ para o metanol.

Em estudos mais recentes com ensaios da toxicidade de diclorometano e clorofórmio em microcrustáceos, efetuados pela Agência Ambiental Alemã (UBA 2014), mostraram que quando os organismos são submetidos a ensaios com outras metodologias, porém em condições de exposição semelhantes, apresentam resultados semelhantes. De acordo com esta instituição alemã, os testes efetuados com *D. magna* demonstraram uma toxicidade de 758 mg.L⁻¹ para diclorometano, e 220 mg.L⁻¹ para clorofórmio. Considera-se que estando em condições semelhantes,

e com um mesmo tempo de exposição referentes a esta pesquisa, os resultados apresentaram-se semelhantes, devido à proximidade dos resultados.

6.6 Análise comparativa dos resultados entre os ensaios de organismos diferentes

Após a análise dos dados dos ensaios toxicológicos, onde pode-se traçar um comparativo entre os solventes testados individualmente e suas misturas, neste item analisou-se a comparação dos resultados dos ensaios toxicológicos com *D. rerio, D. similis* e *D. magna.* Nesta análise, o principal fato constatado foi que os resultados dos testes das misturas dos solventes mostraram mudanças nos efeitos toxicológicos dos mesmos. Para os resultados da mistura dos solventes do mesmo nível trófico, e em diferentes organismos, os efeitos, de forma geral, foram considerados antagônicos, porém, quando as misturas envolveram os solventes de categorias diferentes, halogenados e não halogenados, os efeitos toxicológicos dos solventes halogenados sobrepuseram-se as dos solventes não halogenados.

A Tabela 16 mostra os resultados de três ensaios de toxicidade aguda de três organismos diferentes com os solventes, sendo dois microcrustáceis, D. similis e D. magna, e um de peixe, sendo o D. rerio. Nesta Tabela, verifica-se que a CL₅₀ dos ensaios de toxicidade aguda em microcrustáceos e peixes, revelam uma linearidade, ao se comparar as concentrações dos testes das amostras individuais dos solventes não halogenados, estando na faixa de 5.000 mg.L⁻¹ e 19.614 mg.L⁻¹, e os halogenados, com as concentrações entre 1.894 mg.L⁻¹ e 307 mg.L⁻¹, com as misturas das mesmas categorias, que apresentaram concentrações maiores, na faixa de 307 mg.L⁻¹ a 2.176 mg.L⁻¹, para o diclorometano e clorofórmio, e 9.473 mg.L⁻¹ ¹ a 21.022 mg.L⁻¹, para acetonitrila e metanol. Especificamente, para os resultados das misturas das mesmas categorias (solventes não halogenados e dos halogenados), somente o resultado de 6.830 mg.L⁻¹ e 7.845 mg.L⁻¹ com a *D. similis* que ficou caracterizado um efeito antagônico, devido ao fato de que sua mistura apresentou-se com uma CE₅₀ de 15.422 mg.L⁻¹ . Para os demais ensaios ficou caracterizado que as misturas não interferiram nos resultados, apresentando os resultados semelhantes ao do metanol, com a CE₅₀ de 21.022 mg.L⁻¹ e 9.473 mg.L⁻¹, para *D. magna* e *D. rerio*, respectivamente, e a CL50dos solventes halogenados foram semelhantes à do diclorometano, referente os resultados de 2.176 mg.L⁻¹ para *D. magna*, e semelhante ao clorofórmio, de acordo com a CE₅₀ de 307 mg.L⁻¹ para *D. rerio*. Para a mistura entre os quatro solventes, os resultados com o organismo *D. similis*, também apresenta um resultado diferente com relação aos outros dois organismos, a CE₅₀ encontrada neste teste de 3.404 mg.L⁻¹ ficou equivalente ao dobro dos resultados encontrados para a mistura de diclorometano e clorofórmio que é de 1.565 mg.L⁻¹.

Tabela 17 – Comparativo dos resultados da CE₅₀ dos organismos dos ensaios agudos

0		Re	esultados d	a CE ₅₀ dos e	ensaios ag	gudos	
Organismos testados/ Unidade (mg.L-1)	Acetonitrila	Metanol	Acetonitrila/ Metanol	Diclorometano	Clorofórmio	Diclorometano/ Clorofórmio	Acetonitrila/ Metanol/ Clorofórmio/ Diclorometano
D.similis	6830	7845	15422	947	304	1565	3404
D.magna	21763	19614	21022	1894	555	2176	2679
D.rerio	5000	10153	9473	707	329	307	707

Como parte da análise dos resultados, e ao se comparar a toxicidade dos solventes entre dois organismos, na Tabela 18 constata-se que a *C. dubia* e as larvas de *D. rerio*, mesmo distintos, os resultados são semelhantes. Quando se verifica a relação entre os resultados dos solventes não halogenados testados individualmente e suas misturas, assim como os solventes halogenados individuais e misturados, e a mistura em partes iguais dos quatro solventes, é possível observar que a toxicidade é menor na faixa dos não halogenados apresentando o CENO na faixa de 625 mg.L⁻¹ e 1562,5 mg.L⁻¹, que pelo qual aumenta em pelo menos 10 vezes para os solventes halogenados, estando o CENO em uma faixa de 125 mg.L⁻¹ a 312,5 mg.L⁻¹, e quando ocorre a mistura, mesmo tendo 50% de solventes não halogenados, verifica-se que a presença dos não halogenados não interferem representativamente na toxicidade dos halogenados, onde ocorre uma leve redução da toxicidade, para uma faixa de 125 mg.L⁻¹ a 312,5 mg.L⁻¹.

Tabela 18 – Comparativo dos resultados de CENO e CEO entre organismos

-		Express	ão dos R	esultados	(mg.L ⁻¹)	
Amostras de Solventes	Ce	eriodaphi	nia	Larv	a de D. i	rerio
Corventes	CENO	CEO	VC	CENO	CEO	VC
Acetonitrila	1250	2500	1768	625	1250	884
Metanol	1250	2500	1768	1562,5	3125	2210
Acetonitrila/ Metanol	1250	2500	1768	1562,5	3125	2210
Clorofórmio	125	250	177	62,5	125	88,4
Diclorometano	125	250	177	62,5	125	88,4
Clorofórmio/ Diclorometano	312,5	625	442	125	250	177
Acetonitrila/ Metanol/ Clorofórmio/ Diclorometano	312,5	625	442	125	250	177

Ao se comparar estas mesmas espécies expostas aos solventes halogenados, mesmo sendo a sensibilidade aos contaminantes diferente entre os organismos, nesta exposição, observou-se uma proximidade entre as concentrações que surtiram os efeitos toxicológicos nos dois organismos. Fato semelhante, ocorre, mesmo quando as misturas de solventes halogenados são solubilizados às misturas dos solventes não halogenados, onde os resultados permaneceram próximos aos mesmos resultados das misturas entre os solventes halogenados. Portanto, o que pode-se salientar na análise deste gráfico, é a diferença dos efeitos toxicológicos entre os organismos, quando expostos aos solventes não halogenados, e as suas semelhanças diante da resposta de exposição perante os solventes halogenados.

Como mostra a Tabela 19, a *D. similis*, é a única espécie que apresentou resultados diferentes se comparado aos outros organismos, pois, de acordo com os resultados, esta espécie apresentou uma CE₅₀ muito semelhante entre os solventes acetonitrila e metanol, onde as demais apresentaram a CE₅₀ da acetonitrila sempre menor do que a do metanol. Outro ponto a ser destacado é que foi a única à apresentar efeito antagônico na mistura entre os solventes não halogenados. A *D. magna* apresentou uma sensibilidade toxicológica semelhante a *D. similis*, quando comparados aos ensaios com os solventes não halogenados, onde os resultados da CE₅₀ também apresentou-se semelhante, não sendo caracterizado nenhum tipo de efeito antagônico ou de potenciação.

Tabela 19 – Resultados dos ensaios toxicológicos comparativos entre os organismos

SOLVENTES	D. similis (mg.L ⁻¹)	D. magna (mg.L ⁻¹)	<i>D. rerio</i> (mg.L ⁻¹)	Ceriodaphnia (mg.L ⁻¹)	Larva de D. rerio (mg.L ⁻¹)
				CENO	CENO
Acetonitrila	6830	21763	5000	1250	625
Metanol	7845	19614	10153	1250	1562
Acetonitrila/ Metanol	15422	21022	9473	1250	1562
Diclorometano	947	1894	707	125	62,
Clorofórmio	304	555	329	125	62
Diclorometano/ Clorofórmio	1565	2176	307	312	125
Acetonitrila/ Metanol/ Clorofórmio/ Diclorometano	3404	2679	707	312	125

No gráfico da Figura 11, pode-se analisar, através de uma abordagem geral, os comparativos dos resultados de todos os ensaios relacionados a todos os organismos expostos.

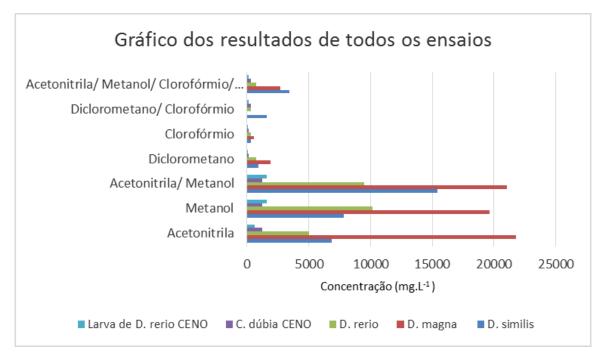


Figura 11 - Gráfico dos resultados de todos os ensaios

Nos ensaios com *D. rerio* a acetonitrila se apresentou com uma toxicidade maior do que a do metanol, da mesma forma, o clorofórmio em relação ao

diclorometano. Nos testes com as misturas, os resultados com os solventes não halogenados foi semelhante ao do metanol, e para os halogenados o resultado foi semelhante ao mais tóxico, no caso o clorofórmio. Na mistura dos quatro solventes, o resultado foi semelhante à toxicidade do diclorometano.

Para os ensaios crônicos, com as larvas de *D. rerio* e *C. dubia*, os resultados do CENO mostraram-se semelhantes. Pode-se observar que os graus de toxicidade dos solventes testados nos dois organismos encontram-se distintos, mostrando a acetonitrila com uma toxicidade maior que a do metanol nos ensaios com as misturas em partes iguais, e para os solventes halogenados, o clorofórmio sendo mais tóxico que o diclorometano. Nos ensaios com as misturas entre os solventes halogenados, o resultado encontrado foi o dobro dos valores se comparados aos ensaios com os solventes individuais, apresentando, assim, um efeito antagônico. Para a mistura entre os quatro solventes, os resultados destes ensaios crônicos apresentaram-se igual ao dos ensaios com a mistura dos solventes halogenados, confirmando uma potenciação dos efeitos toxicológicos, se comparados aos resultados da mistura com solventes não halogenados, sendo um aumento em 4 vezes para *C. dubia* e 11 vezes para as larvas de *D.rerio*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em laboratórios que não possuem sistemas de gerenciamento de resíduos adequados contemplando segregação, armazenamento e destinações corretas para os resíduos líquidos que possuem solventes halogenados e não halogenados em sua composição principal, nos processos de descartes que ocorrem misturas variadas, devido à falta de um sistema padrão de procedimentos para estes fins, possivelmente, grande parte dos descartes são escoados diretamente no sistema de esgoto. Os resultados desta pesquisa mostraram a ocorrência de um aumento do potencial toxicológico destas misturas, com relação aos produtos químicos utilizados, principalmente na combinação de solventes halogenados e não halogenados, aumentando, assim, as possibilidades do impacto destes resíduos nos corpos hídricos superficiais.

Pelo fato de que estes estudos foram desenvolvidos com concentrações em partes iguais nas misturas dos solventes, para se determinar resultados com relação a misturas de concentrações variadas são necessários estudos e pesquisas específicos com ensaios e métodos em níveis gradientes de concentrações, sendo os resultados desta pesquisa dados que podem servir de referência para novas frentes de pesquisa.

Assim, com as confirmações da existência dos efeitos tóxicos agudos e crônicos nos organismos desta pesquisa, levantou-se a necessidade de se efetuar uma análise comparativa com os padrões de concentrações limites, para lançamento de efluentes em corpos hídricos presentes nas legislações nacionais. Porém, devido à falta da presença das moléculas dos solventes testados, nas normas e resoluções, e a possibilidade, na sua ausência nos valores de referência, de se estabelecer estudos ecotoxicológicos dos efluentes com a aprovação dos órgãos oficiais ambientais, suscita-se, assim, a necessidade de se estabelecer estudos ecotoxicológicos padronizados, ou até mesmo a publicação de listagens com critérios e parâmetros atualizados de concentrações padrões de lançamento, semelhante à metodologia e política adotada pela EPA (BRASIL, 2011; CETESB, 2001).

8 CONCLUSÃO

Diante de todos os pontos analisados e discutidos, e com base nos resultados obtidos através dos ensaios toxicológicos agudos e crônicos efetuados em organismos de dois níveis tróficos do meio aquático, constatou-se que houve a potenciação dos efeitos tóxicos em torno de 5 a 10 vezes, quando as misturas em partes iguais dos solventes não halogenados (acetonitrila e metanol) são misturados com os solventes halogenados (clorofórmio e diclorometano), confirmando a premissa da hipótese levantada pela pesquisa.

Os solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano, testados individualmente e em misturas, causam efeitos agudos em *D. similis*, e *D. magna*.

Os solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano, testados individualmente e em misturas, causam efeitos agudos em *D. reio* da fase adulta.

Os solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano, testados individualmente e em misturas, causam efeitos crônicos em *C. dúbia*

Os solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano, testados individualmente e em misturas, causam efeitos crônicos em *D. rerio* da fase larval.

REFERÊNCIAS

ANDREOLA, R.; BERGAMASCO, R.; GIMENES, M. L.; DIAS FILHO, B.P.; CONSTANTINO, A. F. Formação de trialometanos em uma estação de tratamento de água. **Acta Scientiarum. Tecnology**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 133-141, 2005.

ANDREOLI, C.V. **Influência da Agricultura na Qualidade da Água.** Curitiba. OPS., 1993. 15p.

ARAGÃO, M.A.; BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Total hardness of surfasse Waters in São Paulo State (Brazil). **Acta Limnol**, Bras, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 15-18, 2003.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Ecotoxicologia Aquática — Princípios e Aplicações. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos Aquáticos**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 117-147.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Disponível em: http://www.abnt.org.br/abnt/conheca-a-abnt . Acesso em: 02 maio 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004: Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro, 2004. (a) 77p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10005: Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004. (b) 20p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10006**: **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004. (c) 16p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10007**: **Amostragem de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004. (d) 21p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com** *Daphnia**spp* **(Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro, 2004. (e) 23p.**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica -Método de ensaio com Ceriodaphnia spp**. Rio de Janeiro, 2005. 24p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2011. 26p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499**: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2007. 25p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005. 28p.

BAILER, A.J.; ORIS, J.T. Modeling reproductive toxicity in *Ceriodaphnia* **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, , p.787-791, 1993.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Tradução de Maria Â. L. Recio; Luiz C. M. Carrera. Porto Alegre: Bookman, 2002. 844p.

BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 4. ed. São Paulo: Livraria Roca, 1984. 526p.

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2008. 42p.

BIOAGRI LABORATÓRIOS. **Plano de gerenciamento de resíduos.** Piracicaba: Bioagri Laboratórios, 2006.

BRADY, B. **Natureza e propriedade dos solos**. 4.ed. Tradução de A. B. N. Figueiredo Filho. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1976. 594p.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002. 313p.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei 6938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6938.htm. Acesso em: 10 set. 2005.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei Decreto 76.389 de 3 de Outubro de 1975. Dispõe sobre as medidas de prevenção e controle da poluição industrial de que trata o Decreto-Lei 1.413, de 14 de agosto de 1975, e dá outras providências. Disponível em: http://www.lei.adv.br/76389-75.htm . Acesso em: 07 ago.2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: MS, 2011. (a) Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm. Acesso em: 18 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 518 de 25 de março de 2004. Estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília: MS, 2004. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm . Acesso em: 18 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera e Resolução CONAMA 357. Brasília: MMA, 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=563 . Acesso em: 18 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera e Resolução CONAMA 357. (b) Brasília: MMA, 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=563 . Acesso em: 18 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 420 de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo. Brasília: MMA, 2009. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/reuniao/dir1422/Resol420_09.pdf . Acesso em: 19 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 397 de 07 de abril de 2008. Altera capítulo 4º e 5º da Resolução CONMA 357. Brasília: MMA, 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=563 . Acesso em: 18 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Brasília: MMA, 2005. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf . Acesso em: 11 set. 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 20 de 18 de junho de 1986. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Brasília: MMA, 2005. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html . Acesso em: 13 fev. 2011.

BURATTINI, S.V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: conceitos e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p.55-88.

CANTER, L. W. **Environmental impact assessment**. 2 rd ed. United States: McGraw-Hill, 1996. 331p.

CASSARINI, D.C.Pcitar todos .et al. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2001. 232p.

CELLA, A.L. Ecotoxicologia de agrotóxico fipronil em pacu (*Piaractus mesopotamicus Holmerg*) e paulistinha (*D. rerio*) e rsíduos de agrotoxicos na bacia do rio Corumbataí. 2009. 93 p. Tese (doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2009.

CHRISPINO, A. **Manual de química experimental**. 2. ed. São Paulo: Ática, 1994. 256p.

CHRISTOFOLETTI, A. A geografia física no estudo das mudanças ambientais. In: _____. (Org.). **Geografia e meio ambiente no Brasil**. São Paulo: Hucitec, 1995. 397p.

CIDIN, R.C.P.J.; SILVA, R.S. Pegada Ecológica: Instrumento de Avaliação dos Impactos Antrópicos no Meio natural. **Estudos geográficos**, Rio Claro, SP, v.2, n.1, p.43-54, jun., 2004.

COELHO, R.S. Avaliação da qualidade da água do córrego Franquinho, subbacia Tiquatira/ Franqinho, Unidade Hidrográfica do alto Tietê, São Paulo, SP. 2001. Dissertação (Mestrado na área de) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 156p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL . P4.261: Risco de acidente de origem tecnológica - método para decisão e termos de referência. São Paulo, 2011. 140p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Ficha de Informação Toxicológica**: Diclorometano. São Paulo: CETESB, [2012] Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/diclorometano.pdf . Acesso em: 10 fev. 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Ficha de informação de produto químico**. São Paulo: CETESB, [2011] Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp . Acesso em: 02 fev. 2011.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, 1992.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de produtos químicos**. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/produto consulta nome.asp. Acesso em: 10 ago. 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2001. 232 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Secretaria do Meio Ambiente. Companhia Ambiental de São Paulo - CETESB. Decisão de Diretoria Nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/Tabela valores 2005.pdf . Acesso em: 02 jul. 2007.

COSTA, C.R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. Cidade, v.31, n.7, p. 1820-1830, 24 set. 2008.

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: conceitos e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. p.153-184.

DUNGAN, P.R. **Biochemical ecology of water** pollution. Liverpool: Liverpool University, 1972. 124p.

FALLENBERG, G. Introdução aos problemas da poluição ambiental. Trad. MAAR, J. H. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1980. 195p.

FEDERAL ENVIRONMENTAL AGENCY (UBA). Information system ecotoxicology and environmental quality targets. Disponível em: http://webetox.uba.de/webETOX/index.do . Acesso em 24 out. 2014.

FONSECA, A.L. A biologia das espécies *Daphnia laevis, Ceriodaphnia silvestri* e *Poecilia reticulata* e o comportamento destes em testes de toxicologia aquática com efluentes industriais. 1991. Dissertação (Mestrado na área de) - Universidade de São Paulo (EESC/ USP), São Carlos, 1991. 210p.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Risco químico**. Disponível em: http://www.biossegurancahospitalar.com.br/files/riscoQuimico.doc. [s.l]: [s.n.], [200_]. Acesso em: 12 set. 2008.

GERBASE, A.E. Gerenciamento de resíduos químicos em instituições de ensino e pesquisa. **Química Nova,** São Paulo, v. 28, n. 1, Jan-Fev, 2005. Disponível em: http://www.scielo.org/php/index.php. Acesso em: 05 jan. 2006.

GOLDSTEIN, E.G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Revista Ambiente**,cidade, v. 2, n. 2, p.33-38, 1988.

GOUVEIA, J.L.N. Descarte de resíduos químicos: atendimentos emergenciais realizados pela Cetesb. **Meio ambiente industrial**, São Paulo, n. 68, p.62-66, julago. 2007.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Bonzeman, v.11, n.7, p. 714-719, 1977.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE DOS RESUSOS RENOVÁVEIS. Portaria 84 de 15 de outubro de 1996. Dispões sobre procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa) de agrotóxicos. Brasília: MMA,1996.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Requisitos gerais para laboratórios segundo os princípios das Boas Práticas de Laboratório — BPL. Divisão de Credenciamento de Laboratórios - DICLA 035/09. Rio de Janeiro: INMETRO, 2009. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/DICLA/NIT/NIT-DICLA-35_01.pdf . Acesso em: 18 jan. 2015.

JARDIM, G.M. Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP. 2004. 126p. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2004.

JORGE, C. Tratamento de resíduos. **Revista Química e Derivados**, São Paulo, n.495, março.2010. Disponível em: http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd495/incinerador/incinerador01.html. Acesso em: 10 fev.2011.

KOTZIAS, D.; SPARTÀ, C. VOCs and water pollution. In: BLOEMEN, H.J.; BURN, J. **Chemistry and analysis of volatile organic compounds in the environmental**. Suffolk: Edmundsbury Press, 1993. p. 175-201.

LAINHA, M.A.J. **Sistema integrado de gestão para prevenção, preparação e resposta aos acidentes com produtos químicos:** manual de orientação. São Paulo: CETESB, 2003. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/artigos/artigos manual portugues.asp. Acesso em: 15 jul. 2008.

LAMEIRA, V. Estudos dos efeitos ecotoxicológicos dos fármacos paracetamol e dipirona sódica para organismos aquáticos. 2012. 210p.Tese (Doutorado na área de) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LYMAN, W.J. Transport and transoformation process. In: RAND, L. O. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. 2 rd. ed., North Palm Becah: Taylor e Francis, 1995. p. 449-492.

MACHADO, A.M.R. (Coord.) Normas de procedimento para segregação, identificação, acondicionamento e coleta de resíduos químicos. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, Unidade de Gestão de Resíduos. UGR, 2005.

MACHADO, M.R.; FANTA, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v.46, n. 3, p.361-372, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/babt/v46n3/17613.pdf. Acesso em: 02 fev. 2011.

MAGALHÃES, D.P. ;FILHO, A.S.F. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. Rio de janeiro, Oecol. Bras., v. 12 (3), p.355-381, 2008. Disponível em: file:///C:/Users/f.penatti/Downloads/Dialnet-AEcotoxicologiaComoFerramentaNoBiomonitoramentoDeE-2882847.pdf . Acesso em: 20 out. 2014.

MANNING, W.J.; TIEDMANN, A.V. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO2), ozone (O3) and ultraviolet – B (UV-B) radiation on plant diseases – Review paper. **Environmental Pollution**, cidade, v.88, p. 219-245, 1995.

MARANHO, L.A. Avaliação da qualidade da água do rio Corumbataí (SP) por meio de variáveis bióticas e abióticas.. 2012. 107p Tese (Doutorado na re A de) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2012.

MASUTTI, M.B. Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e "in situ". 2004. 390 p. Tese (Doutorado na área de). - Escola de Engenharia de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MAXIMIANO, A.A.citar todos et al. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.10, n. 2, p.483-491, 2005. Disponível em: http://www.scielosp.org/pdf/csc/v10n2/a26v10n2.pdf. Acesso em: 02 fev. 2011.

MEDEIROS, M.L.M.B.; NIEWEGLEWSKI, A.M.A; FOWLER, R.B.; ROLAND, T.R.; ZAPPIA, U.R.S.; FRANCO, P.L.P. **Problemática de Agrotóxicos no Paraná**. Curitiba, SUREHMA, 1988. 14p.

MERCK. Certificate analyses: chloroform K43006245. 14 dez. 2011

MERCK. Certificate analyses: potassium dichromate K44879664. 20 ago. 2013.

MERCK. Quick Search Material Safety Data Sheet. Disponível em: http://www.merck-performance materials.com/en/search/search.html?sitenbr=161976774&docType=MSD&type=PM &pagesize=10&pagenumber=1&keyword=dichloromethane . Acesso em: 16 mai. 2013.

MISHRA, N.D.; DIXIT, S.C.; SRIVASTAVA, H.C. Evaluation of Trihalomethane Formation Potential Due to Anthropogenic Sources in the Ground Water of Kanpur. **E-Journal of Chemistry**. Kanpur, v. 9, n.2, p. 693-699, 2012.

MONTANA STATE UNIVERSITY. **Trimmed spearman-karber estimationof LC50 values**. Montana State University, 1977. 12p.

NELSON, J.S. **Fishes of the World. A Wiley-Interscience Publication**. USA. 2 rd. ed., 1984. 523p.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA). The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York: United Nations, 2011. 568p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. SERIES ON PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE AND COMPLIANCE MONITORING. Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17. OLIS: 21-Jan-1998. Dist.: 26-Jan-1998.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guideline for testing of chemicals n° 202**: **Daphnia sp., Acute Immobilisation Test**, 2004. 16p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD** series on testing and assessment number 23: guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD: Paris, 2000. 53p.

PACHECO, E. V. Tratamento de resíduos gerados em laboratórios de polímeros: um caso bem sucedido de parceria universidade-empresa. **Polímeros**, São Carlos, v.13, n. 1, p. 01-09 jan./mar. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/po/v13n1/15065.pdf . Acesso em: 12 ago. 2007.

PADUA, V.L.(coord.). Remoção de microorganismos emergentes e micronutrientes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Rio de Janeiro: ABES, 2009. 392p.

PENATTI, F. E. Gerenciamento de resíduos como instrumento de gestão ambiental em laboratórios de análises e pesquisa da área química. 2009. 253 p. Dissertação (mestrado). Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

PENNAK, R. *CLADOCERA*. **Fresh-Water Invertebrates of the United States**. 3 rd .ed. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1989. 628 p.

PIOLI, A. **Sistema de Informações sobre Emergências Químicas da CETESB**. São Paulo: CETESB, 2001. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/estatisticas/estatisticas.pdf . Acesso em: 20 jun. 2015.

POHANISH, R. S.; GREENE, S. A. **Hazardous substances resource guide**. 2. rd. ed. Detroit: Galé Research, 1997. 889p.

PRIMEL, E.G *et al.*, Poluição das águas por herbicidas no cultivo do arroz na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e monitoramento. **Química Nova**. São Paulo. v.28, n.4, p.605-609, 30 abr. 2005.

QUARESMA, C.C.; GARCIA, M.V.B.; GARCIA, T.B. Toxicidade aguda de Parathion Metil para *D. rerio* (Teleostei, Cyprinidae), em condições tropicais. In: III Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. **Anais...** Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63526/1/toxidade-aguda-parathion.pdf. Acesso em: 12 nov 2014.

RAND, L. O. **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate, and risk assessment. 2 ed., North Palm Becah: Taylor e Francis, 1995. 1125p.

RODRIGUES, N.L.V.B. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A – não inertes e classe II B – inertes. 2005. 123 p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RODRIGUEZ, M.J. Trihalomethanes in drinkingwater of greater québec region (canada): occurrence, variations and modelling. **Environmental Monitoring and Assessment.** Netherland, v. 89, p. 69-93, 2003.

RODRIGUEZ, M. J.; SÉRODES, J. Spatial and temporal evolution of trihalomethanes in three water distribution systems. **Elsevier Science**, Great Britain, v. 35, n. 6, p. 1572-1586, 2001.

ROSA, G.A.B. Estudo dos efeitos do fármaco propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustácea) com ênfase em efeito nas populações. 2008. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear) – Universidade de São Paulo – Instituto de pesquisa energéticas e nucleares, São Paulo, 2008.

SELL, N.J. **Industrial pollution control**: issue and techniques. New York: Van Nostran Reinhold, 1992. 416p.

SILVA, P.C.; CARREIRA, W. Curso de gerenciamento de resíduos para laboratório. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, 2003. Anotações pessoais.

SILVEIRA, T.R.; SCHNEIDER, A.C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, São Paulo v. 64, n. 2, abr./jun., 2012. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252012000200002&script=sci_arttext. Acesso em: 10 out. 2014.

SISINO, C.L.S.; OLIVEIRA, R.M. Impacto ambiental dos grandes depósitos de resíduos urbanos e industriais. In: SISINO, C.L.S. (Org.) **Resíduos sólidos, ambiente e saúde:** uma visão multidisciplinar. 1. reimpressão. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 59-78.

TEDIA. Certificate analyses: acetonitrile 1202016R. 21 fev. 2012.(a)

TEDIA. Certificate analyses: dichloromethane 1202501R. 16 mar. 2012. (c)

TEDIA. Certificate analyses: methyl alchool 1202080R. 15 fev. 2012. (b)

TOMMASI, L.R. Estudo de impacto ambiental. São Paulo: CETESB, 1993. 354p.

U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Appendix F:** Ecological Effect Data and Ecotox Reviews, ERB4. Environmental Fate and Effects Division: EPA, 2005. 26p.

- U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Regional Screening Level (RSL) Summary Table:** may 2014. US: EPA, 2014. Disponível em: http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/rb-concentration_table/Generic_Tables/docs/Generictables404page.htm . Acesso em: 23 out. 2014.
- U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fheshwater organism**. ed. 4.EPA: Washington, 2002. 335p.
- U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Technical overview of ecological risk assessment analyses phase: ecological effects characterization**. Disponível em: http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk ders/toera analysis eco.htm . Acesso em: 22 out. 2014.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Long lake trichloroethylene contamination New Brighton, Ramsey County, Minnesota. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Health Assessment and Consultation: Atlanta, 2008. 40p.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS. **Gerenciamento de Resíduos Químicos**. Campinas: Instituto de Química, 2005. Disponível em: http://www.cgu.unicamp.br/residuos/doctos/residuos.pdf . Acesso em: 10 dez. 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Normas para recolhimento dos resíduos do campus de São Carlos laboratórios de resíduos químicos. São Carlos: USP, 1996. Disponível em: http://www.sc.usp.br/residuos/rotulagem/downloads/normas_recolh.pdf. Acesso em: 05 fev. 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Normas para recolhimento dos resíduos do campus de São Carlos laboratórios de resíduos químicos. São Carlos: USP, 1996. Disponível em: http://www.sc.usp.br/residuos/rotulagem/downloads/normas_recolh.pdf . Acesso em: 05 fev. 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. **Gerenciamento de resíduos:** normas gerais. Araraquara: IQ, 2002. Disponível em: www.iq.unesp.br/normas-rq/normas-rq.doc. Acesso em: 05 jan. 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. Normas de procedimento para segregação, identificação, acondicionamento e coleta de resíduos químicos. São Carlos: Unidade de Gestão de Resíduos. UGR, 2005. Disponível em: http://www.ufscar.br/~ugr/linkNormasSiteUGR.htm. Acesso em: 03 fev. 2006.

VINCETI, M. et al. A retrospective cohort study of trihalomethane exposure through drinking water and cancer mortality in northern Italy. **Science of the Total Environmental**, v. 330, p. 47-53, 2004.

WANG, G.; DENG, Y.; LIN, T. Cancer risk assessment from trihalomethanes in drinking water, **Science of the Total Environmental, cidade,** v. 387, p. 86-95, 2007.

WESSTEIN, E.W. Fisher's Exact Test. MathWorld, 1999. 1v.

WEST, INC; GULLEY, D. **TOXSTAT**®. Computer Program. Version 3.5. University of Wyoming, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 154**: Acetonitrile. Geneva: WHO, 1993. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc154.htm . Acesso em: 21 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 163**: Chloroform. Geneva: WHO, 1994. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc/ehc/ehc/63.htm#. Acesso em: 21 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 164**: Methylene Chloride. Geneva: WHO, 1996. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc164.htm . Acesso em: 21 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 196**: Methanol. Geneva: WHO, 1997. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc196.htm . Acesso em: 21 jan. 2011.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática:** Princípios e práticas. São Paulo: RiMa, 2006. 478p.

ZARPELON, A.; RODRIGUES, E.M. **Os triahalometanos na água de consumo humano**. Curitiba: SANEPAR, 2004. Disponível em: http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/v17/TRIHALOMETANOS.htm. 30 jul. 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Lista de tabelas e compilações de concentrações conforme registros dos estudos de Determinação da CE₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas utilizando microcrustáceos

Tabela 1 – Relação de solventes e concentrações finais do teste preliminar para determinação da toxicidade dos solventes para *D.magna*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final
		(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	10000	100000
Metanol	10000	100000
Clorofórmio	1000	10000
Diclorometano	1000	10000
Acetonitrila/ Metanol	10000	100000
Clorofórmio/ Diclorometano	1000	10000
Acetonitrila/ Metanol/	1000	10000
Clorofórmio/ Diclorometano		

Tabela 2 - Preparo das soluções para o teste preliminar para determinação da toxicidade dos solventes para *D.magna*

Solução estoque (mg.L ⁻¹)	Volume da solução estoque adicionado (mL)	Volume final (mL)	Concentração teste obtida (mg.L ⁻¹)
100000	100	100	100000
100000	10	100	10000
10000	10	100	1000
1000	10	100	100
Controle	0	100	0

Tabela 3 – Relação de solventes e concentrações finais do teste definitivo para determinação da toxicidade dos solventes para *D.magna*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final
		(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	10000	100000
Metanol	10000	100000
Clorofórmio	50	5000
Diclorometano	50	5000
Acetonitrila/ Metanol	10000	100000
Clorofórmio/ Diclorometan	io 50	5000
Acetonitrila/ Metar	nol/ 50	5000
Clorofórmio/ Diclorometan	10	

Tabela 4 - Preparo das soluções para o teste definitivo para determinação da toxicidade dos solventes para *D.magna*

Solução estoque (mg.L ⁻¹)	Volume da solução estoque adicionado (mL)	Volume final (mL)	Concentração teste obtida (mg.L ⁻¹)
100000	100	100	100000
100000	50	100	50000
100000	25	100	25000
100000	13	100	12500
100000	6,5	100	6250
5000	100	100	5000
5000	50	100	2500
5000	25	100	1250
5000	13	100	625
5000	6,5	100	312,5
Controle	0	100	0

Tabela 5 – Relação de solventes e concentrações finais do teste preliminar para determinação da toxicidade dos solventes para *D.similis*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final
		(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	10000	100000
Metanol	10000	100000
Clorofórmio	1000	10000
Diclorometano	1000	10000
Acetonitrila/ Metanol	10000	100000
Clorofórmio/ Diclorometan	o 1000	10000
Acetonitrila/ Metar	nol/ 1000	10000
Clorofórmio/ Diclorometan	0	

Tabela 6 - Preparo das soluções para o teste preliminar para determinação da toxicidade dos solventes para *D.similis*

Solução estoque (mg.L ⁻¹)	Volume da solução estoque adicionado (mL)	Volume final (mL) (completado com água de diluição – M4)	Concentração teste obtida (mg.L ⁻¹)
100000	100	100	100000
100000	10	100	10000
10000	10	100	1000
1000	10	100	100
Controle	0	100	0

Tabela 7 – Relação de solventes e concentrações finais do teste definitivo para determinação da toxicidade dos solventes para *D.similis*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final
	resagens (mg)	(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	10000	100000
Metanol	10000	100000
Clorofórmio	50	5000
Diclorometano	50	5000
Acetonitrila/ Metanol	10000	100000
Clorofórmio/ Diclorometano	50	5000
Acetonitrila/ Metanol/ Clorofórmio/ Diclorometano	50	5000

Tabela 8 - Preparo das soluções teste para o teste definitivo da determinação da toxicidade dos solventes para *D.similis*

Solução estoque (mg.L ⁻¹)	Volume da solução estoque adicionado	Volume final (mL)	Concentração teste obtida
	(mL)		(mg.L ⁻¹)
	Magr		
100000	100	100	100000
100000	50	100	50000
100000	25	100	25000
100000	13	100	12500
100000	6,5	100	6250
5000	100	100	5000
5000	50	100	2500
5000	25	100	1250
5000	13	100	625
5000	6,5	100	312,5
	Simil	is	
100000	20	100	20000
100000	10	100	10000
10000	50	100	5000
5000	25	100	2500
5000	25	100	1250
5000	20	100	1000
5000	13	100	625
5000	10	100	500
5000	6,5	100	312,5
5000	5	100	250
5000	2,5	100	156,2
5000	1,25	100	125
5000	0,712	100	62,5
5000	0,306	100	31,25
Controle	100	100	- -

Tabela 9 – Relação de solventes e concentrações finais do teste preliminar para determinação da toxicidade dos solventes para *C. dubia*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final
		(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	500,035	100000
Metanol	500,101	100000
Clorofórmio	500,046	100000
Diclorometano	500,022	100000
Acetonitrila/ Metanol	500,110	100000
Clorofórmio/ Diclorometano	500,009	100000
Acetonitrila/ Metanol/	500,156	100000
Clorofórmio/ Diclorometano		

Tabela 10 – Relação de solventes e concentrações finais do teste definitivo para determinação da toxicidade dos solventes para *C. dubia*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final (mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	2000	10000
Metanol	2000	10000
Clorofórmio	400	2000
Diclorometano	400	2000
Acetonitrila/ Metanol	2000	10000
Clorofórmio/ Diclorometano	2000	10000
Acetonitrila/ Metanol/ Clorofórmio/ Diclorometano	2000	10000

Tabela 11 - Preparo das soluções teste para o teste definitivo para determinação da toxicidade dos solventes para *C. dubia*

Caluação cotogua	Volume da solução	Volume final	Concentração teste
Solução estoque (mg.L ⁻¹)	estoque adicionado	(mL)	obtida
(mg.L ')	(mL)		(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila; Metano	l; Acetonitrila e Metanol; Ac	etonitrila/Metano/Clore	ofórmio/ Diclorometano
10000	100	100	10000
10000	50	100	5000
10000	25	100	2500
10000	13	100	1250
10000	6,5	100	625
10000	3,25	100	312,5
Clorofórmio/ Diclorometano			
2000	100	100	2000
2000	50	100	1000
2000	25	100	500
2000	12,5	100	250
2000	6,25	100	125
Controle	100	100	-

ANEXO B – Lista de tabelas e compilações de concentrações conforme registros dos estudos de determinação da CE₅₀ dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas utilizando peixes e larva de peixes

Tabela 1 – Relação de solventes e concentrações finais do teste preliminar para a determinação da CL₅₀ dos solventes em *D. rerio*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final
		(mg.L ⁻¹)
Acetonitrila	500,021	100000
Metanol	500,057	100000
Clorofórmio	500,034	100000
Diclorometano	500,087	100000
Acetonitrila/ Metanol	500,125	100000
Clorofórmio/ Diclorometano	500,276	100000
Acetonitrila/ Metanol/	500,456	100000
Clorofórmio/ Diclorometano		

Tabela 2 - Preparo das soluções para o teste preliminar para a determinação da CL₅₀ dos solventes em *D. rerio*

	Volume da		Volume final	
Colução estagua	solução	Volume de	(mL)	Concentração teste
Solução estoque	estoque			obtida
(mg.L ⁻¹)	adicionado	água (mL)		(mg.L ⁻¹)
	(mL)			
100000	300	2700	3000	10000
100000	30	2970	3000	1000
100000	3	2997	3000	100
1000	1000 3		3000	10
Controle	-	-	3000	3000

Tabela 3 – Relação de solventes e concentrações finais do teste definitivo

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final	
		(mg.L ⁻¹)	
Acetonitrila	62501,1	62500	
Metanol	312500,1	312500	
Clorofórmio	312,52	3125	
Diclorometano	625,05	6250	
Acetonitrila/ Metanol	312500,1	312500	
Clorofórmio/ Diclorometano	1250,2	12500	
Acetonitrila/ Metanol/	625,1	6250	
Clorofórmio/ Diclorometano			

Tabela 4 - Preparo das soluções, respectivos volumes e concentrações para o teste definitivo para a determinação da CL₅₀ dos solventes em *D. rerio*

	Volume da		Volume fina	I							
0 1 ~ .	solução		(mL)	Concentração teste							
Solução estoque	estoque	Volume de		obtida							
(mg.L ⁻¹)	adicionado	água (mL)		(mg.L ⁻¹)							
	(mL)										
Acetonitrila											
62500	480	2520	3000	10000							
62500	240	2760	3000	5000							
62500	120	2880	3000	2500							
62500	60	2940	3000	1250							
62500	30	2970	3000	625							
Controle	-	-	3000	-							
	Metanol;	Metanol/Aceton	nitrila								
312500	480	2520	3000	50000							
312500	240	2760	3000	25000							
312500	120	2880	3000	12500							
312500	60	2940	3000	6250							
312500	30	2970	3000	3125							
Controle	-	-	3000	-							
Diclorome	etano; Acetonitrila	a/ Metanol/ Diclo	rometano/ Cl	orofórmio							
6250	480	2520	3000	1000							
6250	240	2760	3000	500							
6250	120	2880	3000	250							
6250	60	2940	3000	125							
6250	30	2970	3000	62,5							
Controle	-	-	3000	-							
		Clorofórmio									
3125	480	2520	3000	500							
3125	240	2760	3000	250							
3125	120	2880	3000	125							
3125	60	2940	3000	62,5							
3125	30	2970	3000	31,25							
Controle	-	-	3000	-							
	Clorofó	rmio/ Dicloromet	tano								
12500	480	2520	3000	2000							
12500	240	2760	3000	1000							
12500			3000	500							
12500			3000	250							
12500	30	2940 2970	3000	125							
Controle	-	-	3000	-							

Tabela 5 - Preparo das soluções teste para o teste definitivo de determinação da CL_{50} dos solventes em *D. rerio*

	Volume da		Volume fina	l							
	solução		(mL)	Concentração teste							
Solução estoque	estoque	Volume de		obtida							
(mg.L ⁻¹)	adicionado	água (mL)		(mg.L ⁻¹)							
	(mL)										
Acetonitrila											
62500	480	2520	3000	10000							
62500	240	2760	3000	5000							
62500	120	2880	3000	2500							
62500	60	2940	3000	1250							
62500	30	2970	3000	625							
Controle	-	-	3000	-							
	Metanol;	Metanol/Acetoni	itrila								
312500	480	2520	3000	50000							
312500	240	2760	3000	25000							
312500	120	2880	3000	12500							
312500	60	2940	3000	6250							
312500	30	2970	3000	3125							
Controle	-		3000								
		-		-							
	etano; Acetonitrila										
6250	480	2520	3000	1000							
6250	240	2760	3000	500							
6250	120	2880	3000	250							
6250	60	2940	3000	125							
6250	30	2970	3000	62,5							
Controle	-	-	3000	-							
		Clorofórmio									
3125	480	2520	3000	500							
3125	240	2760	3000	250							
3125	120	2880	3000	125							
3125	60	2940	3000	62,5							
3125	30	2970	3000	31,25							
Controle	-	-	3000	<i>,</i> -							
	Clorofó	mio/ Diclorometa									
12500	480	2520	3000	2000							
12500	240	2760	3000	1000							
12300											
12500	120	2880	3000	500							
		2880 2940	3000 3000	500 250							
12500	120										

Tabela 6 – Relação de solventes e concentrações finais do teste preliminar para a determinação a toxicidade crônica para *D. rerio*

Solventes		Pesagens (mg)	Concentração final (mg.L ⁻¹)					
Acetonitrila		500,021	100000					
Metanol		500,057	100000					
Clorofórmio		500,034	100000					
Diclorometano		500,087	100000					
Acetonitrila/ Metanol		500,125	100000					
Clorofórmio/ Diclorom	netano	500,276	100000					
Acetonitrila/	/letanol/	500,456	100000					
Clorofórmio/ Diclorometano								

Tabela 7 - Preparo das soluções para o teste preliminar para a determinação a toxicidade crônica para *D. rerio*

Solução estoque	Volume da solução	Volume final completado	Concentração nominal
(mg.L ⁻¹)	estoque utilizado (mL)	com água de diluição (mL)	obtida (mg.L ⁻¹)
Água de diluição	0	500	Controle
100000	500	500	100000
100000	50	500	10000
10000	5	500	1000
10000	50	500	100
100	5	500	10

Tabela 8 – Relação de solventes e concentrações finais do teste definitivo para a determinação a toxicidade crônica para *D. rerio*

Solventes	Pesagens (mg)	Concentração final		
		(mg.L ⁻¹)		
Acetonitrila	10000,05	10000		
Metanol	50000,03	50000		
Clorofórmio	500,01	500		
Diclorometano	1000,12	1000		
Acetonitrila/ Metanol	50000,01	50000		
Clorofórmio/ Diclorometano	1000,13	1000		
Acetonitrila/ Metanol/	2000,09	2000		
Clorofórmio/ Diclorometano				

Tabela 9 - Preparo das soluções para o teste definitivo para a determinação a toxicidade crônica para *D. rerio*

Solução estoque	Volume da solução	Volume final completado	Concentração nominal
(mg.L ⁻¹)	estoque utilizado (mL)	com água de diluição (mL)	obtida (mg.L ⁻¹)
Água de diluição	500	500	Controle
		cetonitrila	
10000	0	500	10000
10000	500	1000	5000
5000	500	1000	2500
2500	500	1000	1250
1250	500	1000	625
	Metanol; A	cetonitrila/ Metanol	
50000	0	500	50000
50000	500	1000	25000
25000	500	1000	12500
12500	500	1000	6250
6250	500	1000	3125
	Diclorometano; C	lorofórmio/ Diclorometano	
1000	0	500	1000
1000	500	1000	500
500	500	1000	250
250	500	1000	125
125	500	1000	62,5
	С	lorofórmio	
500	0	500	500
500	500	1000	250
250	500	1000	125
125	500	1000	62,5
62,5	500	1000	31,25
	Acetonitrila/ Metano	/ Clorofórmio/ Diclorometano	0
2000	0	500	2000
2000	500	1000	1000
1000	500	1000	500
500	500	1000	250
250	500	1000	125

ANEXO C – Lista de tabelas e compilações de concentrações conforme registros dos estudos de determinação da CE₅₀ em *C. dubia* dos solventes acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano e suas misturas

Tabela 1 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dúbia* com a amostra de acetonitrila

Soluções	Reprodução (em nº de jovens) e Sobrevivência dos Organismos										
teste	Trocas		•	,		Réplic					
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	10	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	2°	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
teste (mg.L ⁻¹) 10000 5000 2500 1250	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1º	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
5000	2°	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
3000	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2500	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	2°	3v	4v	2v	2v	3v	3v	2v	4v	3v	4v
	30	7v	8v	5v	6v	8v	8v	7v	8v	7v	7v
	Total:	10	12	7	8	11	11	9	12	10	11
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1250	2°	8 v	7 v	7 v	6 v	5 v	7 v	8 v	8 v	6 v	6 v
1230	30	12	14	10	13	10	14	12	12	11	14
1250	Total:	20	21	17	19	15	21	20	20	17	20
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	2°	9v	7v	7v	8v	6v	7v	5v	6v	7v	7v
625	3º	13v	11v	10v	13v	12v	13v	14v	11v	12v	12v
	Total:	22	18	17	21	18	20	19	17	19	19
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
Controlo	20	8v	6v	8v	9v	7v	7v	8v	6v	5v	7v
Controle	30	13v	11v	12v	13v	10v	13v	14v	12v	11v	12v
- NI.	Total:	21	17	20	22	17	20	22	18	16	19

Tabela 2 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dubia* com a amostra de metanol

Soluções		F	Reprodução (em nº de jovens) e Sobrevivência dos Organismos									
teste	Trocas		-		_	Réplic	as					
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	10	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	
10000	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	
10000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
5000	2°	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
3000	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2500	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
	20	3v	4v	4v	2v	3v	2v	4v	3v	4v	3v	
2300	30	8v	7v	8v	5v	6v	5v	8v	8v	7v	6v	
	Total:	11	11	12	7	9	7	12	11	11	9	
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
1250	2°	8v	9v	6v	8v	5v	7v	6v	8v	7v	7v	
1230	30	13v	12v	13v	11v	14v	13v	12v	14v	13v	10v	
	Total:	21	21	19	19	19	19	20	22	20	17	
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
625	2°	8v	5v	7v	8v	9v	6v	7v	7v	6v	7v	
023	30	14v	10v	13v	12v	11v	13v	14v	12v	11v	13v	
	Total:	22	15	20	20	20	19	21	19	17	20	
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	
Controle	2°	8v	6v	8v	9v	7v	7v	8v	6v	5v	7v	
Controle	3°	13v	11v	12v	13v	10v	13v	14v	12v	11v	12v	
	Total:	21	17	20	22	17	20	22	18	16	19	

Tabela 3 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dubia* com a amostra de metanol e acetonitrila

Soluções		F	Reprodução (em nº de jovens) e Sobrevivência dos Organismos								
teste	Trocas		Réplicas								
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	10	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
5000	2°	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2500	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	2°	4v	2v	2v	3v	4v	2v	3v	4v	2v	2v
2300	30	8v	5v	6v	8v	7v	6v	8v	8v	5v	7v
	Total:	12	7	8	11	11	8	11	12	7	9
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1250	2°	5v	7v	9v	8v	6v	7v	7v	8v	5v	6v
1230	30	11v	13v	14v	13v	11v	12v	13v	14v	10v	13v
	Total:	16	20	23	21	17	19	20	22	15	19
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
625	2°	8v	8v	6v	5v	7v	9v	8v	7v	6v	6v
023	30	14v	10v	13v	12v	13v	13v	11v	14v	13v	12v
	Total:	22	18	19	17	20	22	19	21	19	18
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
Controle	2°	8v	6v	8v	9v	7v	7v	8v	6v	5v	7v
Controle	30	13v	11v	12v	13v	10v	13v	14v	12v	11v	12v
-	Total:	21	17	20	22	17	20	22	18	16	19

Tabela 4 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dubia* com a amostra de clorofórmio

Soluções		F	Reprodução (em nº de jovens) e Sobrevivência dos Organismos								
teste	Trocas		-		_	Réplic	as				
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1º	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2000	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1000	20	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1000	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F00	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	20	2v	2v	3v	2v	4v	3v	2v	2v	3v	2v
500	30	5v	6v	5v	7v	6v	5v	5v	7v	6v	5v
	Total:	7	8	8	9	10	8	7	9	9	7
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
250	20	4v	3v	2v	2v	3v	4v	2v	3v	4v	2v
250	30	8v	7v	5v	6v	8v	8v	6v	7v	8v	5v
	Total:	12	10	7	8	11	12	8	10	12	7
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
125	20	8v	5v	7v	9v	8v	7v	6v	5v	7v	6v
125	30	10v	14v	13v	12v	14v	14v	13v	11v	12v	12v
	Total:	18	19	20	21	22	21	19	16	19	18
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
Controle	20	5v	8v	9v	7v	5v	6v	6v	8v	7v	8v
Controle	30	13v	10v	14v	13v	12v	13v	11v	14v	14v	13v
	Total:	18	18	23	20	17	19	17	22	21	21

Tabela 5 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dubia* com a amostra de diclorometano

Soluções		F	Reprodu	ção (em	nº de jo	vens) e S	Sobreviv	ência do	s Organ	ismos	
teste	Trocas					Réplic	cas				
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1º	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2000	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1000	20	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1000	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
500	20	3v	2v	4v	2v	3v	4v	2v	2v	3v	3v
500	30	6v	5v	7v	5v	6v	6v	5v	5v	7v	6v
	Total:	9	7	11	7	9	10	7	7	10	9
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
250	20	3v	4v	4v	3v	2v	4v	3v	3v	4v	3v
250	30	8v	8v	7v	6v	8v	7v	8v	6v	7v	8v
	Total:	11	12	11	9	10	11	11	9	11	11
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
125	20	7v	5v	6v	6v	8v	8v	7v	9v	5v	8v
123	30	14v	13v	10v	10v	13v	14v	13v	14v	12v	11v
	Total:	21	18	16	16	21	22	20	23	17	19
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
Controle	20	5v	8v	9v	7v	5v	6v	6v	8v	7v	8v
Controle	30	13v	10v	14v	13v	12v	13v	11v	14v	14v	13v
	Total:	18	18	23	20	17	19	17	22	21	21

Tabela 6 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dubia* com a amostra de clorofórmio e diclorometano

Soluções		F	Reprodu	ção (em	nº de jo			ência do	s Organ	ismos	
teste	Trocas					Réplic	as				
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1º	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1º	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
5000	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
3000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1º	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2500	20	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2500	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1º	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1250	20	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1250	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1º	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
625	20	3v	2v	3v	4v	4v	3v	2v	2v	4v	3v
625	30	8v	5v	6v	7v	7v	8v	5v	5v	7v	8v
	Total:	11	7	9	11	11	11	7	7	11	11
	1º	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
212 5	20	8v	5v	7v	9v	7v	5v	8v	6v	8v	7v
312,5	30	13v	12v	14v	14v	13v	12v	12v	13v	14v	12v
	Total:	21	17	21	23	20	17	20	19	22	19
	1º	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
Contr	20	5v	8v	9v	7v	5v	6v	6v	8v	7v	8v
Contr.	30	13v	10v	14v	13v	12v	13v	11v	14v	14v	13v
	Total:	18	18	23	20	17	19	17	22	21	21

Tabela 7 – Resultados do teste de toxicidade crônica com *C. dubia* com a amostra de acetonitrila, metanol, clorofórmio e diclorometano

Soluções		F	Reprodu	ção (em	nº de jo		Sobreviv	ência do	s Organ	ismos	
teste	Trocas					Réplic					
(mg.L ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	10	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	2°	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
10000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
5000	2°	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
3000	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2500	2°	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
2500	30	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1250	2°	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
1230	30	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
	Total:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
625	2°	4v	2v	2v	4v	3v	2v	4v	2v	2v	3v
625	30	8v	7v	6v	8v	8v	5v	7v	6v	5v	8v
	Total:	12	9	8	12	11	7	11	9	7	11
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
312,5	2°	8v	7v	7v	6v	5v	7v	8v	9v	5v	8v
312,5	30	13v	11v	14v	12v	12v	13v	14v	13v	12v	10v
	Total:	21	18	21	18	17	20	22	22	17	18
	10	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v	0v
Contr	2°	5v	8v	9v	7v	5v	6v	6v	8v	7v	8v
Contr.	30	13v	10v	14v	13v	12v	13v	11v	14v	14v	13v
	Total:	18	18	23	20	17	19	17	22	21	21

ANEXO D – Cópia do Parecer da CEUA para os ensaios com uso de peixes

Parecer da CEUA quanto ao Plano de Estudo IACUC's Statement to the Study Plan Viumero do Parecer: Tese Código da Amostra: Solventes Código do Estudo: Tese Statement number: Sample code: Study code: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) — BIOAGRI Unidade de Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagn Umit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Care a	
imero do Parecer: Tese Código da Amostra: Solventes Código do Estudo: Tese tatement number: Sample code: Study code: Study code: Study code: Sudy code: Study code: Sudy code: Study code: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – BIOAGRI Unidade de Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) – Bioagri Unit Piracicaba Institutional Animal Care and Use Care and	
Latement number: Sample code: Study code: **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - BIOAGRI Unidade de Piracicaba Institutional Anima) Care and Use Committee (IACUC) - Bioagri Unit Piracicaba **Lutilização de animais de laboratório na atividade proposta, incluindo, se pertinentes, os eventuais prejuízos no netedos alternativos; está claramente apresentada e justificada? **he use of laboratory animals in the proposed activity, including, if relevant, any harm in using alternative methods, is clearly pestifica? **(X) Sim yes () Não no **(B) Sprocedimentos experimentais; incluindo dados sobre espécie, sexo, número previsto a ser utilizado, condições de paripulações experimentais estão claramente descritos? **(A) Sim yes () Não no () Parcialmente partially **(EX) Sim yes () Não n	
Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) — Bioagri Unit Piracicaba utilização de animais de laboratório na atividade proposta, incluindo, se pertinentes, os eventuais prejuizos no hétodos alternativos, está claramente apresentada e justificada? he use of laboratory animals in the proposed activity, including, if relevant, any harm in using alternative methods, is clearly pestified? (X) Sim yes () Não no be procedimentos experimentais, incluindo dados sobre espécie, sexo, número previsto a ser utilizado, condições de larripulações experimentals estão claramente descritos? he experimental procedures, including data about species, sex, number planned to be used, housing conditions, experimental mar eatry describe? (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially rescreva: rescr	
netodos alternativos, está claramente apresentada e justificada? to use of laboratory animals in the proposed activity, including, if relevant, any harm in using alternative methods, is clearly positified? (X) Sim yes () Não no is procedimentos experimentalis, incluindo dados sobre espécie, sexo, número previsto a ser utilizado, condições de anipulações experimentalis estão claramente descritos? to experimental procedures, including data about species, sex, number planned to be used, housing conditions, experimental mar early described? (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially escreva: escribe (Wimero total de animais solicitados: Podem ser utilizados até 800 peixes otal number of animals required quantidade de animais solicitada é adequada para o desenvolvimento dos protocolos experimentals? to enumber of animals requised is appropriate for the development of experimental prococol? (X) Sim yes () Não no sustifique: ustifique: ustifique: (X) Sim yes () Não no (X) Sim yes () Não no escreva: Pode causar desconforto generalizado ser oser de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados, métodos para afívio destas condições? the answer is Yes to the previous item will be employed methods to relieve these conditions? (X) Sim yes (X) Não no escreva: aso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? not provided for the use of these methods, are there reasons for this fac? (X) Sim yes () Não no ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustifiy xistem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anime re there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? (Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog eneral assessment of the replets ofor ou procodo de concerne à experimentação anime re there recents references in the area using si	
Desprocedimentos experimentais, incluindo dados sobre espécie, sexo, número previsto a ser utilizado, condições de paripulações experimentais estão claramente descritos? (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: Secribe (X) Sim yes () Não no (X) Sim yes (X) Não n	2 9
paripulações experimentais estão claramente descritos? (X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially escreva: escribe Comment Não Não	-1-1
(X) Sim yes () Não no () Parcialmente partially Descreva: escribe Número total de animais solicitados: Podem ser utilizados até 800 peixes otal number of animais required (quantidade de animais solicitada é adequada para o desenvolvimento dos protocolos experimentais? he number of animais requested is appropriate for the development of experimental protocols? (X) Sim yes () Não no ustifique: ustify Descreva: Pode causar desconforto desconforto aos animais? he procedures have the potential to cause pain or discomfort to the animals? (X) Sim yes () Não no Descreva: Pode causar desconforto generalizado escribe m caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? (I) Sim yes (X) Não no Descreva: escribe aso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? not provided for the use of these methods, are there reasons for this fact? (X) Sim yes () Não no ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify (X) Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologa seneral assessment of the era era using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologa seneral assessment of the era using similar methodology for relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologa seneral assessment of the era using similar methodologia cespecífica Fâbio Eduardo Data Diretor da, Garantigota, Dúsridode	
lúmero total de animais solicitados: Podem ser utilizados até 800 peixes otal number of animais required quantidade de animais solicitada é adequada para o desenvolvimento dos protocolos experimentais? he number of animais requested is appropriate for the development of experimental protocols? (X) Sim yes () Não no ustifique: ustifique: ustifique: ustifique: ustifique: (X) Sim yes () Não no pescreva: Pode causar desconforto generalizado escribe m caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alivio destas condições? the answer is Yes to the previous item will be employed methods to relieve these conditions? (S) Sim yes (X) Não no pescreva: escribe aso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? inot provided for the use of these methods, are there reasons for this fact? (X) Sim yes () Não no ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify () Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologia eneral assessment of the jequest conforme referência bibliográfica específica Fabio Eduardo Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologianeral assessment of the jequest conforme referência bibliográfica específica Pata Diretor da Garantigota Dusidade	
otal number of animals required A quantidade de animais solicitada è adequada para o desenvolvimento dos protocolos experimentais? The number of animals requested is appropriate for the development of experimental protocols? (X) Sim yes () Não no Justifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Justifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Justifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Justifique: Justifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Justifique: Justifique: Justifique: Justifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Justifique: Justi	
the number of animals requested is appropriate for the development of experimental protocols? (X) Sim yes () Não no ustifique: ustify by procedimentos têm o potencial de causar dor ou desconforto aos animais? the procedures have the potential to cause pain or discomfort to the animals? (X) Sim yes () Não no Descreva: Pode causar desconforto generalizado escribe m caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para allívio destas condições? It he answer is Yes to the previous item will be employed methods to relieve these conditions? () Sim yes (X) Não no Descreva: escribe aso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? inot provided for the use of these methods, are there reasons for this fact? (X) Sim yes () Não no ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima re there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologianeral assessment of the request conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Data Dietor da Garantigato Qualidade	
Justifique: Justify Desprocedimentos têm o potencial de causar dor ou desconforto aos animais? The procedures have the potential to cause pain or discomfort to the animals? (X) Sim yes () Não no Descreva: Pode causar desconforto generalizado Lescribe Em caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? It the answer is Yes to the previous item will be employed methods to relieve these conditions? () Sim yes (X) Não no Descreva: Lescribe Caso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? In ott provided for the use of these methods, are there reasons for this fact? (X) Sim yes () Não no Lustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos lustify Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima ver there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog deneral assessment of the reupest conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Data Diretor da Garantigota Oldálidade	
Ustify Desprocedimentos têm o potencial de causar dor ou desconforto aos animais? The procedures have the potential to cause pain or discomfort to the animals? (X) Sim yes () Não no Descreva: Pode causar desconforto generalizado escribe The answer is Yes to the previous item will be employed methods to relieve these conditions? (X) Sim yes (X) Não no Descreva: Escribe Caso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? (X) Sim yes (X) Não no Descreva: Escribe A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima re there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? (X) Sim yes (X) Não no Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologia específica Data Diretor da Garantiepta Ousidade	•
he procedures have the potential to cause pain or discomfort to the animals? (X) Sim yes () Não no Descreva: Pode causar desconforto generalizado escribe Im caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? Im caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? Im caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? Im caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? (I) Sim yes (I) Não no Imperiodo destas previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? Imperiodo destas previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? Imperiodo destas previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? Imperiodo destas previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? Imperiodo destas previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? Imperiodo destas para tal fato? Imperiodo destas para tal fato? Imperiodo destas para tal fato? Imperiodo permite o uso de tais métodos ustifica existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação animar rethere recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? Imperiodo destas para tal fato? Imperiodo destas para tal fato? Imperiodo destas condições? Imperiodo no metodologo in relation to animal testing? Imperiodo destas condições? Imperiodo destas condições? Imperiodo no metodologo in relation to animal testing? Imperiodo destas condições? Imperiodo no metodologo in relation to animal testing? Imperiodo n	14
rescribe mesoribe mesori	
Cescreva: Conforme referencia pustificativas para tal fato? (X) Sim yes () Não no Conforme referencia bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Conforme referencia pustificado paramita punta pun	
() Sim yes (X) Não no Descreva: lescribe Caso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? In ot provided for the use of these methods, are there reasons for this fact? (X) Sim yes () Não no Illustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos lustify Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima ver there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Apreciação geral da solicitação: Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Data Diretor da Garantis Da Quisidade	
Caso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? (X) Sim yes () Não no (ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos lustify Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima are there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Apreciação geral da solicitação: Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Data Diretor da Garantis Da Quisidade	
Caso não esteja previsto o emprego desses métodos, existem justificativas para tal fato? Inot provided for the use of these methods, are there reasons for this fact? (X) Sim yes () Não no ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima re there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Apreciação geral da solicitação: Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodologia específica Fábio Eduardo Data Diretor da Garantis Da Quisidade	
ustifique: A metodologia do estudo segue referência bibliográfica que não permite o uso de tais métodos ustify Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima re there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Apreciação geral da solicitação: Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo (Carantis Da Austrália Da Diretor da Garantis Da Gusidade)	- 1 0
Existem referencias recentes na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação anima are there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Apreciação geral da solicitação: Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Data Diretor da Garantis Da Qualidade	
Are there recents references in the area using similar methodology in relation to animal testing? () Sim yes (X) Não no Apreciação geral da solicitação: Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog General assessment of the request Conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Oracles A Carantis Da Qualidade Data Diretor da Garantis Da Qualidade	
Os estudos atendem aos princípios de bem estar animal respeitando a metodolog conforme referência bibliográfica específica Fábio Eduardo Penatti 20/11/12 Data Diretor da Garantis Da Custidade	
Data Diretor da Garantis pa Liuandade	?
Data Diretor da Garantia Da Livandade	
Parecer conclusivo Conclusive statement	
(X) Aprovado Approved () Não Aprovado Not Approved	a do estud
lecessidade de reuńião com o responsável: Sim () Não () Não Aplicavel leed meeting with the responsable yes no Not applicable	a do estud
xções implementadas: Sim() Não () Não Aplicável (ctions implemented √) Não Sim() Não () Não Aplicável	a do estud
Observações Observations:	a do estud 1/1/2 Data Date
Fábio Eduardo Penalti 70/11/12 Katia F. Claudine Patille 70	a do estud 1/1/2 Data Date
IACUC member Date IACUC's coordinator	a do estud 1/1/2 Data Date