

Cloral hidratado: avaliação de risco à saúde humana como subproduto da desinfecção da água

Chloral hydrate: human health risk assessment as a water disinfection by-product


- **Data de entrada:**
02/04/2019
- **Data de aprovação:**
09/04/2019


Isadora Rios Baroni^{1*} | Cassio Prinholato da Silva¹ | Denise Dias de Oliveira¹ |
Thais do Prado Silva¹ | Cristina Filomêna Pereira Rosa Paschoalato¹ | Rene Oliveira Beleboni¹

DOI: <https://doi.org/10.36659/dae.2021.004>


ORCID ID


Baroni IR  <https://orcid.org/0000-0002-6640-3668>

Silva CP  <https://orcid.org/0000-0001-8963-4832>

Oliveira DD  <https://orcid.org/0000-0001-8013-8939>

Silva TP  <https://orcid.org/0000-0003-0609-2404>

Paschoalato CFPR  <https://orcid.org/0000-0001-9074-9784>

Beleboni RO  <https://orcid.org/0000-0001-8407-8865>

Resumo

No tratamento da água potável são utilizados produtos clorados de modo a garantir o nível de segurança sanitária exigido. Contudo, na presença de precursores, pode ocorrer a formação de Subprodutos da Desinfecção (SPD) em decorrência da reação com o cloro. O SPD Cloral Hidratado (CH), composto hipnótico e sedativo, tem sido encontrado na água, no entanto não é citado no padrão de potabilidade brasileiro. Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o risco toxicológico do CH a partir de ensaios específicos e calcular um Valor Máximo Permissível (VMP). Roedores foram expostos a diferentes concentrações padronizadas de CH e submetidos a análises bioquímicas e bioensaios comportamentais e de locomoção, tais quais os de campo aberto, indução de sono e rotarod. Foi identificado o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) na dose 9,60 mg.kg⁻¹.d⁻¹, obtendo-se o VMP de 2,3 mg.L⁻¹ de CH; considerando o Nível de Menor Efeito Observado (LOAEL) na dose 0,96 mg.kg⁻¹.d⁻¹, obteve-se o VMP de 0,023 mg.L⁻¹ de CH, valor próximo ao 0,02 mg.L⁻¹ citado nos padrões da Austrália (2017) e da Nova Zelândia (2017).

Palavras-chave: Água potável. Avaliação de risco. Cloral hidratado. LOAEL. NOAEL. Subprodutos da desinfecção.

Abstract

In the treatment of drinking water, chlorinated products are used in order to guarantee the level of sanitary safety. In the presence of precursors there is a formation of disinfection by-products (DPB). DBP Chloral Hydrate (CH), a hypnotic and sedative substance, has been found in water. This work aims to evaluate the toxicological risk of CH from specific trials and calculate a Maximum Contaminant Level (MCL). Rodents were exposed to different concentrations of CH and were submitted to biochemical analysis and behavioral and locomotor bioassays, such as the open field, sleeping induction and rotarod. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) at the dose 9.60 mg.kg⁻¹.d⁻¹ was determined, obtaining the MCL of 2.3 mg.L⁻¹ of CH; considering the Lowest Observed Effect Level (LOAEL) at the dose 0.96 mg.kg⁻¹.d⁻¹, MCL of 0.023 mg.L⁻¹ of CH was obtained, close to 0.02 mg.L⁻¹ quoted in the standards of Australia (2017) and New Zealand (2017).

Keywords: Chloral Hydrate. Disinfection by-products. Drinking water. LOAEL. NOAEL. Risk Assessment.

¹ Universidade de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil.

* **Autora correspondente:** i_riosb@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, diversos pesquisadores relatam que a Matéria Orgânica Natural (MON) presente nas águas dos mananciais captadas pela Estação de Tratamento de Água (ETA) e submetida ao tratamento pode reagir com o cloro, causando a formação de Subprodutos da desinfecção (SPD) (BELLAR; LICHTENBERG; KRONER, 1974; LYKINS; KOFFSKY; PATTERSON, 1994; STEVENS et al., 1976). A MON é principalmente caracterizada pela presença de ácidos fúlvicos e húmicos, pela eutrofização em razão da matéria nitrogenada e fosforada, e pela presença de matéria carbonácea (ESTEVES, 1998)

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

Na maioria das ETA brasileiras, o cloro é utilizado como agente oxidante na desinfecção da água, tendo em vista seu baixo custo e elevada eficiência na inativação de microrganismos patogênicos e na oxidação de compostos que causam sabores e odores. Contudo, o uso do cloro viabiliza a formação de importantes SPD como os Trihalometanos (THM) e os Ácidos Haloacéticos (AHA) que são reconhecidamente cancerígenos (MEYER, 1994; PASCHOALATO; TRIMAILOVAS; DI BERNARDO, 2008). Um outro SPD gerado e de grande importância para saúde pública é o Cloral Hidrato (2,2,2-tricloroetano-1,1-dioltriacetaldeído monohidrato; $C_2H_3Cl_3O_2$) (CH) (DABROWSKA; NAWROCKI, 2009). Segundo o padrão de potabilidade de água para consumo humano atualmente vigente no Brasil (2017), o Valor Máximo Permissível (VMP) de THM e AHA é de

0,1 mg.L⁻¹ e 0,08 mg.L⁻¹, respectivamente. De modo relevante, a referida legislação brasileira não menciona o VMP para o CH (BRASIL, 2017).

O CH é um composto utilizado na medicina veterinária e humana como sedativo e hipnótico, sendo também usado na fabricação do pesticida Diclorodifeniltricloroetano (DDT) (BUDAVARI, 1996). O CH é um dos principais subprodutos formados no tratamento da água potável, especialmente quanto ao quesito de quantidade. A formação do CH não ocorre naturalmente na água, e para a população, a maior via de exposição a esse subproduto ocorre por meio da água potável (DABROWSKA; NAWROCKI, 2009). O presente trabalho se propõe a realizar investigação de escala dose-resposta por meio de bioensaios aplicados a diferentes modelos animais e propósitos, de modo a avaliar o risco toxicológico à saúde causado pelo CH na água potável.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

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

2.1 Estabilidade da solução de CH

A fim de verificar a estabilidade da solução de CH, foi preparada uma solução estoque de 100 mg.L⁻¹, a partir do sal de CH P.A. (CAS 302-17-0 - *Dinâmica*® - Cód. 1089), diluída em água purificada para a obtenção das concentrações seriadas de 100, 50 e 10 µg.L⁻¹. A quantificação de CH na solução (meio aquoso) foi realizada pelo teste de recuperação por meio da técnica analítica de cromatografia a gás por detector de captura de elétrons (CG-DCE), utilizando o cromatógrafo a gás da marca Varian®, modelo 3600CX.

O procedimento analítico foi adaptado do método 551.1 (USEPA, 1995), sendo empregadas as seguintes condições operacionais: coluna de sílica capilar (marca Agilent J & W GC Coluns) DB-1: 30 m x 1.00 µm filme, 0,25 mm ID, gás de arraste foi nitrogênio 5.0 ECD (*White Martins*®), pressão 15 psi, temperatura do injetor 160°C, temperatura do detector 290°C, range 10, atenuação 8, o volume de injeção de amostra 1 µL no modo com divisão (*splitless*). Neste processo faz-se necessária uma etapa prévia de extração líquido-líquido com Metil-terc Butirico Éter (MTBE) para obtenção de extrato orgânico a ser injetado no CG-DCE.

2.2 Procedimentos experimentais em animais

Foram utilizados 72 ratos Wistar machos, com peso entre 170 e 210g adquiridos da empresa

Anilab (Paulínia - SP) e alojados no biotério de nossa instituição. Os animais foram aclimatados às condições laboratoriais por 6 dias, selecionados aleatoriamente, marcados individualmente e separados em grupos que receberam suprimento de água deionizada e alimentação *ad libitum*. A iluminação empregada foi artificial, sendo a sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuro em ambiente climatizado à 22°C (±3°) com umidade entre 30 e 70% e ventilação. Além disso, todos os procedimentos experimentais efetuados nesse trabalho foram realizados de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição sob o número 01/2018. Os animais foram divididos em 12 grupos de 6 animais cada e separados conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Divisão dos grupos animais de acordo com o tempo para cada bioensaio

Dias de tratamento	Controle Negativo	Grupos experimentais (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)		
		0,96	9,60	96,0
7	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
14	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
21	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11	Grupo 12

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

2.3 Teste do Campo Aberto

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

neceu no campo aberto foi filmado, para posterior análise e registro de dados.

2.4 Teste do Rotarod

O teste foi realizado por meio de Rotarod da marca Ugo Basile, modelo 7750, permitindo avaliação do desempenho locomotor de cada animal, verificando alterações de equilíbrio e coordenação motora. Para realização do teste, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, a 25 cm acima do nível de referência, com uma taxa de rotação constante de 12 rotações por minuto (rpm). No dia anterior ao teste, os animais foram

treinados durante 90 segundos por 3 vezes, e foi adotado como critério de exclusão dos animais o fato de, durante o treinamento, não conseguirem andar na barra giratória. No dia do experimento, cada animal foi levado à barra de rolagem por 60 segundos, ocorrendo a limpeza do aparato com álcool 70% v/v a cada troca de animal, sendo avaliado o tempo até a primeira queda e o número de quedas durante o tempo de experimento.

2.5 Teste de Indução de Sono

O teste para avaliação de sono foi realizado por meio da indução de sono por barbitúrico, que correspondeu à administração de pentobarbital sódico 50 mg.kg⁻¹ (*Thiopentax*®, *Cristália*) por via intraperitoneal, avaliando-se o tempo (em segundos) decorrido entre a perda do reflexo postural e o tempo total de sono de cada grupo experimental comparado ao grupo controle negativo.

2.6 Parâmetros bioquímicos: Provas de funções hepática e renal

A avaliação dos parâmetros bioquímicos de função renal e hepática ocorreu ao final de cada 7 dias de experimento, totalizando 21 dias. Um dia após o teste de indução de sono, os animais foram anestesiados com pentobarbital na dose de 50 mg.kg⁻¹ i.p, com subsequente coleta de amostra sanguínea, uma única vez, por punção intracardíaca. O sangue foi coletado em tubo seco e

o soro obtido por centrifugação, a 250 g por 15 minutos. Posteriormente, o soro foi transferido para microtubos secos, identificado e encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Ciências Farmacêuticas da Instituição. Foram utilizados kits de diagnóstico padronizados (*Labtest*®) e analisador bioquímico automático (*Mindray BS-380*) para a avaliação dos seguintes parâmetros bioquímicos: ureia, creatinina, como provas da função renal e aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) como provas da função hepática.

2.7 Determinação do Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) e Nível do Menor Efeito Observado (LOAEL)

A metodologia para avaliação do risco segundo modelo de dose resposta foi baseada nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (2000). O critério de seleção da dose ministrada por peso corpóreo teve como referência os ensaios realizados por George et al. (2000), em que foi identificado um valor de LOAEL de 13,5 mg.kg⁻¹.d⁻¹. Considerando que o recomendável para avaliação de risco é a obtenção de NOAEL, foram adotadas doses diárias de CH menores. Para o cálculo partiu-se da DL50 do CH que corresponde a 480 mg.kg⁻¹, e foram adotadas as seguintes relações: 1/500 DL50 (0,96 mg.kg⁻¹); 1/50 DL50 (9,6 mg.kg⁻¹) e 1/5 DL50 (96 mg.kg⁻¹) (Tabela 2).

Tabela 2 - Grupos de animais, critério de cálculo da dose com referência do CH à DL50 de 480 mg.kg⁻¹, concentração da solução de CH preparada e administrada, volume ingerido e cálculo da dose diária.

Grupo (n=6)	Critério para o cálculo da dose (DL50 = 480 mg.kg ⁻¹)	Concentração de CH (mg.L ⁻¹)	Peso corpóreo médio dos ratos (g)	Volume ingerido (mL.d ⁻¹)	Dose diária (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)
A	Controle Negativo	0	188 ± 11,7	0,97 - 1,35	0
B	1/500 DL50 = 0,96	172 e 220	187 ± 11,7	0,97 - 1,35	0,96
C	1/50 DL50 = 9,60	1800 e 2400	198 ± 7,7	0,97 - 1,35	9,60
D	1/5 DL50 = 96,0	16800 e 22000	191 ± 11,6	0,97 - 1,35	96,0

2.8 Cálculo do Valor Máximo Permissível da concentração de Cloral Hidrato em água potável

A partir dos resultados obtidos nos ensaios com os animais, foi determinado o valor da dose do NOAEL e/ou LOAEL para os parâmetros analisados, em seguida foi calculada a Ingestão Diária Tolerável (IDT) $\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, conforme a Eq. 1.

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

Em que:

IDT: Ingestão Diária Tolerável ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$); NOA-

EL: Dose sem efeito observado ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$);

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

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

A Eq. 2 foi empregada para determinação do VMP de CH (mg.L^{-1}) em água potável a ser ingerido por dia por um indivíduo humano adulto com peso médio de 60 kg e ingestão de 2,0 L de água contendo CH por dia durante toda vida, tendo por base a expectativa média de vida do brasileiro.

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

Em que:

VMP: Valor Máximo Permissível (mg.L^{-1} CH); IDT: Ingestão Diária Tolerável ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$); mc: Massa corporal do adulto (60 kg);

f: Fração ou porcentagem da IDT associada à ingestão de água (valor adotado de 80% ou 0,8,

considerando o consumo total de água, uma vez que a exposição ao CH para a população em geral vem principalmente do consumo de água potável após a desinfecção com cloro);

C: Consumo de água de 2,0 L por dia.

2.9 Análise estatística

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A solução estoque de CH que foi preparada na concentração de 100 mg.L^{-1} teve sua estabilidade confirmada pela checagem de sua concentração por meio do teste de recuperação, utilizando diluições e extração líquido-líquido em MTBE seguido de análises cromatográficas. Segundo o INMETRO (2007), a aceitação de recuperação está entre 70 e 120%. Dentre as diluições preparadas neste trabalho, os resultados de recuperação de CH foram satisfatórios, portanto dentro da faixa de 70 a 120% (dados não apresentados). Esse resultado é importante para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade das doses empregadas nos diferentes bioensaios aqui utilizados. Além disso, a solução preparada de CH na concentração de 100 mg.L^{-1} foi analisada periodicamente para determinação do prazo de validade/estabilidade para a utilização nos bioensaios. Esse procedimento teve por objetivo verificar se a concentração da solução de CH é persistente à degradação, e o resultado determina a periodicidade de preparo da solução a ser aplicada nos animais. Foi adotado o tempo de estabilidade máxima de 11 dias como medida de prevenção, visto que o tempo total de experimento foi de 21 dias, e observou-se uma tendência de decaimento nos valores de concentração da so-

lução entre 17 e 20 dias (dados não apresentados). Em decorrência disso, a solução foi preparada duas vezes, uma no início do experimento e outra no 11º dia. Assim, somente soluções com no máximo 11 dias de preparação foram usadas nos experimentos, garantido novamente a exatidão das doses utilizadas nos bioensaios.

Os resultados do teste do campo aberto estão subdivididos em observação da frequência de cruzamentos entre quadrantes (*crossing*), frequência de levantamentos (*rearing*) e frequência de autolimpeza (*grooming*) dos animais analisados durante o experimento (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados de médias e desvio padrão expressos em números de cruzamentos (*crossing*), levantamentos (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*) dos animais submetidos ao modelo do campo aberto

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

Em relação aos parâmetros analisados para o teste do Campo Aberto, a ANOVA mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos (7, 14 e 21 dias) nas doses 0,96; 9,6 e 96 mg.kg⁻¹.d⁻¹ em comparação ao controle negativo e entre as doses. Isso indica que o CH nas doses aqui administradas pelo tempo de até 21 dias não interferiram na locomoção e na atividade exploratória dos animais.

O teste do rotarod permitiu avaliar a performance motora dos animais com a finalidade de detectar alterações de equilíbrio e coordenação que se deem por sedação, relaxamento muscular e/ou impedimento locomotor potencialmente induzidas pelas diferentes doses do CH (ROSLAND et al., 1990). Ao se colocar o animal sobre a barra giratória a uma velocidade constante pode-se verificar o tempo até a primeira queda (Tabela 4) e o número total de quedas (Tabela 5), por meio da capacidade do animal em equilibrar-se sobre a mesma.

Tabela 4 - Resultados do tempo médio e desvio padrão (em segundos) até a primeira queda no teste do rotarod

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

Para os resultados do tempo decorrido até a primeira queda, a ANOVA mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os

grupos experimentais nas diferentes doses com o controle negativo e em nenhum dos períodos de tempo avaliados (7, 14 e 21 dias).

Tabela 5 - Resultados de médias e desvio padrão expressos em número de quedas dos animais submetidos ao teste do rotarod

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

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

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

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

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

Sendo assim, os resultados da indução de sono por barbitúrico estão subdivididos em mensuração da latência, onde foi considerado o tempo (em segundos) até a perda do reflexo postural (Tabela 6) e tempo (em segundos) total de sono dos animais (Tabela 7).

Tabela 6 - Resultados de médias e desvio padrão do tempo (em segundos) até a perda do reflexo postural dos animais submetidos ao teste de indução do sono

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

* Diferença estatisticamente significativa

Em relação ao tempo (em segundos) até a perda do reflexo dos animais, a ANOVA seguida pelo teste de Tukey mostrou que:

Houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo (14 dias) (620 s ± 10 s) quando este grupo foi comparado aos grupos experimentais nas três diferentes doses (298 s ± 93 s; 390 s ± 163 s; 196 s ± 64 s), pela qual se

verificou um decaimento no tempo até a perda de reflexo nos grupos experimentais. Também houve diferença significativa entre o controle negativo (21 dias) (433 s ± 13 s) comparado ao grupo experimental na dose de 96 mg.kg⁻¹.d⁻¹ (256 s ± 107 s), assumindo-se então o efeito depressor no SNC causado pelo CH e de acordo com estes dados.

Tabela 7 - Resultados de médias e desvio padrão do tempo (em segundos) total de sono dos animais submetidos ao teste de indução do sono

Tempo de tratamento (dia)	Controle Negativo	Dose (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)		
		0,96	9,60	96,0
7	2865 ± 96,08	2124 ± 238	3200 ± 693	2539 ± 819
14	2940 ± 540	2840 ± 399	2190 ± 368	3342 ± 482
21	1773 ± 919	1569 ± 103	2189 ± 101	2923 ± 1041

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

A Tabela 8 apresenta os valores médios e desvios padrão das determinações de AST, ALT, ureia e

creatinina, que são parâmetros bioquímicos marcadores da função renal e hepática. Quando os mesmos estão aumentados em relação ao controle negativo, isso pode indicar alterações funcionais de fígado e rins, muito embora sem precisar com exatidão o nível de comprometimento do órgão (MARTIN; HARPER; MAYES, 1981).

Tabela 8 - Resultados de médias e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos analisados

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

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

Num estudo de efeitos bioquímicos do CH com 7 dias de exposição, Poon et al., (2000) constataram alterações funcionais de fígado, porém as doses utilizadas pelos autores corresponderam a 5, 43 e 375 mg.kg⁻¹.d⁻¹ sendo o LOAEL identificado na dose de 5 mg.kg⁻¹.d⁻¹. Por outro lado,

George et al., (2000) observaram alterações e lesões no fígado de ratos apenas em exposição mais tardia, com 104 semanas da administração de CH nas doses 7,4; 37,4 e 162,6 mg.kg⁻¹.d⁻¹ em ratos e 13,5; 65 e 146,6 mg.kg⁻¹.d⁻¹ em camundongos. Isso mostra as variações/flutuações globais dos dados obtidos, ainda que por métodos bastante semelhantes, sobretudo quando se trata do tempo de exposição ao CH. Além disso, é sempre preciso levar em conta outros fatores contribuintes, como certa imprecisão inerente aos métodos/medida e/ou variações intra e interespécies, como conhecidas.

Com base nos experimentos realizados neste atual trabalho, foi possível a determinação dos valores do nível de efeito adverso não observado (NOAEL) e do nível do menor efeito observado (LOAEL) em alguns dos parâmetros analisados.

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

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

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

É importante ressaltar que na literatura não foram encontrados testes de avaliação comportamental e locomotora para avaliar os efeitos do CH no contexto de risco à saúde (cálculo do VPM). Desse modo, o presente estudo vem contribuir com a aplicação de diferentes modelos experimentais animais que possam ser mais específicos para a ação fim do CH, com a finalidade de estabelecer valores de NOAEL e LOAEL abaixo

dos encontrados na literatura atualmente, que conseqüentemente, ao serem empregados na realização do cálculo do VMP de CH, resultaram em um VMP mais restritivo e seguro. Além disso, o cálculo de VPM a partir de bioensaios diversos ajuda a completar e dirimir inconsistências que levem em conta diferentes arranjos e condições experimentais, abastecendo a literatura científica de informações consistentes.

Considerando o valor de NOAEL em $9,60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para o cálculo do VMP, o valor obtido foi de $2,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH. O valor de LOAEL foi obtido na menor dose experimental deste estudo, $0,96 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, resultando em um VMP de $0,023 \text{ mg.L}^{-1}$ de CH. Isso está em conformidade com o VMP de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ definido pela Austrália e pela Nova Zelândia para o CH (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004), e destaca-se que esse valor é 5 vezes mais restritivo que o VMP para THM citado na legislação nacional (BRASIL, 2017).

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

4 CONCLUSÕES

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

- Foi identificado o NOAEL do CH na dose de $9,60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

- Foi identificado o LOAEL do CH na dose de 0,96 mg.kg⁻¹.d⁻¹.
- Considerando o valor encontrado de NOAEL na dose de 9,60 mg.kg⁻¹.d⁻¹ utilizado para o cálculo do VMP, obteve-se o valor de 2,3 mg.L⁻¹ de CH.
- Considerando o valor de LOAEL do CH encontrado na dose de 0,96 mg.kg⁻¹.d⁻¹ o VMP obtido foi de 0,023 mg.L⁻¹ de CH, valor próximo ao 0,02 mg.L⁻¹ estabelecido pela Austrália e pela Nova Zelândia.
- Destaca-se que o VMP de 0,02 mg.L⁻¹ de CH é 5 vezes mais restritivo que o VMP de 0,10 mg.L⁻¹ para THM citado na legislação do Brasil.

5 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram de forma igualitária.

6 REFERÊNCIAS

Australian Government. National Water Quality Management Strategy. **Australian Drinking Water Guidelines 6**, version 3.4. 2017.

BELLAR, T. A.; LICHTENBERG, J. J.; KRONER, R. C. The Occurrence of Organohalides in Chlorinated Drinking Waters. **Journal - American Water Works Association**, v. 66, n. 12, p. 703–706, 1974.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Anexo XX da **Portaria de Consolidação no 5, 28 de Setembro de 2017**. Brasília, DF, Brasil, 2017. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html>. Acesso em: 9 ago. 2018.

BUDAVARI, S. **The Merck index: an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals**. 12. ed. New Jersey: Whitehouse Station, 1996.

CARLINI, E. A. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25–31, 1979.

DABROWSKA, A.; NAWROCKI, J. Controversies about the occurrence of chloral hydrate in drinking water. **Water Research**, v. 43, n. 8, p. 2201–2208, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.022>

DANIEL, F. B. et al. Ninety-Day Toxicity Study of Chloral Hydrate in the Sprague–Dawley Rat. **Drug and chemical toxicology**, v. 15, n. 3, p. 217–232, 1992.

EIKEBROKK, B.; VOGT, R. D.; LILTVED, H. NOM increase in Northern European source waters: discussion of possible causes and impacts on coagulation / contact filtration processes. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 4, n. 4, p. 47–54, 2004. <https://doi.org/10.2166/ws.2004.0060>

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

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

GEORGE, M. H. et al. Carcinogenicity of Chloral Hydrate Administered in Drinking Water to the Male F344/N Rat and Male B6C3F1 Mouse. **Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 4, p.610–618, 2000. <https://doi.org/10.1177/019262330002800415>

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

KAUFFMANN, B. M. et al. Humoral and Cell-Mediated Immune Status of Mice Exposed to Chloral Hydrate. **Environmental Health Perspectives**, v. 44, p. 147–151, 1982. <https://doi.org/10.1177/019262330002800415>

KLINFELTER, G. R. et al. Preliminary screening for the potential of drinking water disinfection byproducts to alter male reproduction. **Reproductive Toxicology**, v. 9, n. 6, p. 571–578, 1995. <https://doi.org/10.1177/019262330002800415>

KORTH, A. et al. NOM increase in drinking water reservoirs – relevance for drinking water production. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 4, n. 4, p. 55–60, 2004. <https://doi.org/10.1177/019262330002800415>

LYKINS, B. W.; KOFFSKEY, W. E.; PATTERSON, K. S. Alternative Disinfectants for Drinking Water Treatment. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, n. 4, p. 745– 758, 1994. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1994\)120:4\(745\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1994)120:4(745))

MARTIN, D. W.; HARPER, H. A.; MAYES, P. A. **Review of biochemistry**. Lange Medical Pub, 1981.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Secretaria do Meio ambiente Ciência e Tecnologia do Distrito Federal**, v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.

New Zealand. **Guidelines for Drinking-water Quality Management for New Zealand**. 2017

NORUP, P. W. Sleeping disturbances and pharmacological/nonpharmacological interventions in old people. **Annales**

Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina, v. 57, n. 1, p. 530–534, 2002.

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

PASCHOALATO, C. F. P. R.; TRIMAILOVAS, M. R.; DI BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 313–322, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522008000300011>

POON, R. et al. Subchronic toxicity of chloral hydrate on rats: a drinking water study. **Journal of Applied Toxicology**, v. 22, p. 227–236, 2002. <https://doi.org/10.1002/jat.843>

POON, R.; NADEAU, B.; CHU, I. Biochemical effects of chloral hydrate on male rats following 7-day drinking water exposure.

Journal of Applied Toxicology, v. 20, n. 6, p. 455–461, 2000. [https://doi.org/00011/12\)20:6<455::AID-JAT714>3.0.CO;2-A](https://doi.org/00011/12)20:6<455::AID-JAT714>3.0.CO;2-A)

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam Attenuates Morphine Antinociception Test Dependently in Mice. **Pharmacology e Toxicology**, v. 66, n. 5, p. 382– 386, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1990.tb00766.x>

SADIQ, R.; RODRIGUEZ, M. J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: A review. **Science of the Total Environment**, v. 321, n. 1–3, p. 21–46, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.05.001>

SANDERS, V. M. et al. Toxicology of chloral hydrate in the mouse. **Environmental Health Perspectives**, v. 44, p. 137–146, 1982. <https://doi.org/10.1289/ehp.8244137>

STEVENS, A. A. et al. Chlorination of Organics in Drinking Water. **Journal – American Water Works Association**, v. 68, n. 11, p. 615–620, 1976. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1976.tb02506.x>