

Categoria

Trabalho Acadêmico\Resumo Expandido

Titulo do Trabalho

AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS TOXICOLÓGICOS DA MISTURA ENTRE OS SOLVENTES METANOL E ACETONITRILA EM *DAPHINIA SIMILIS* E *DAPHINIA MAGNA*

Autor principal:

Fábio Eduardo Penatti

Nomes dos coautores (as)

Josélia Sesso; Felipe Fusato

Nome do orientador:

Valdemar Luis Tornisielo

Instituição

Universidade de São Paulo – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ecologia Aplicada

E-mail do contato:

f.penatti@usp.br

Palavras-chave

Solventes orgânicos; Toxicidade; Microcrustáceos

INTRODUÇÃO

Atualmente, o meio ambiente passa por profundas transformações decorrentes, em grande parte, da contínua ação antrópica sobre os recursos naturais para fins de consumo humano, e a conseqüente poluição ambiental. Tais pressões exercidas pela sociedade resultam em impactos negativos e intensos no meio ambiente, comprometendo a vida em equilíbrio com a natureza (CIDIN; SILVA, 2004), assim como as qualidades de vida e ambiental das populações humanas (GUIMARÃES, 2005 p.16).

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, duráveis, e não duráveis. Estas ações humanas contribuem para a geração de rejeitos industriais, pelo uso de insumos destinados à produção destes bens materiais, onde, 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.

Uma parte destes solventes tem um poder muito forte de interação com a água, de forma que sua presença no meio ambiente é praticamente imperceptível, ao se considerar que muitos deles possuem um grau alto de solubilidade em corpos hídricos e na umidade presente nos solos, como os do grupo químico dos álcoois e cetonas (POHANISH; GREENE, 1997). Os resíduos químicos de laboratório contendo solventes, se caracterizam como perigosos por apresentarem riscos à saúde humana e ao meio ambiente (ABNT, 2004a).

O presente trabalho teve como objeto principal de abordagem da pesquisa ensaios ecotoxicológicos agudos para a determinação da *Concentração Efetiva 50 (CE₅₀)* nos microcrustáceos, *D.similis* e *D.magna*, tendo como solução teste a mistura entre os solventes orgânicos metanol e acetonitrila que são utilizados em larga escala em laboratórios de análises químicas em estudos por cromatografia líquida de alto desempenho. A seleção destes compostos foi baseada em levantamentos iniciais conforme a sua maior frequência de utilização nestes locais de trabalho, por fazer parte de um projeto de pesquisa de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ecologia Aplicada da Universidade de São Paulo.

Para a realização dos testes, a pesquisa utilizou a estrutura, os equipamentos e os materiais do Laboratório de Ecotoxicologia da Bioagri Laboratórios Ltda., localizada no município de Piracicaba/SP, sendo uma empresa privada de análises químicas e biológicas que possui a acreditação junto ao INMETRO de seus ensaios ecotoxicológicos (BERTOLETTI, 2008).

OBJETIVO

Determinar e avaliar a concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilidade) em 50% dos organismos *D. similis* e *D. magna* (CE_{50}) expostas no período de 48 horas, utilizando como solução teste a mistura entre acetonitrila e metanol.

DEFINIÇÕES

Concentração Efetiva 50 (CE_{50}): “Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% do sistema-teste no período de 24 ou 48 horas nas condições do ensaio (ABNT, 2004b)”.

Solução teste: “Solução da amostra em meio aquoso pelo qual o organismo é exposto (ABNT, 2004b)”.

Sistema-Teste: Todos os materiais e equipamentos que envolvem o organismo utilizado no ensaio de toxicidade: indivíduos jovens de *Daphnia similis* e *Daphnia magna*.

Imobilidade: incapacidade de natação do sistema-teste, durante um período de até 15 segundos, após uma agitação suave do frasco teste. Também é considerado organismo imóvel aquele flutuante na superfície, mesmo que apresente movimento (CETESB, 20_).

Ecotoxicologia: ciência que estuda os efeitos de substâncias sobre organismos vivos que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982 *apud* ZAGATO, 2006).

METODOLOGIA APLICADA E DESENVOLVIMENTO DOS ENSAIOS DE LABORATÓRIO

Os organismos (sistemas-teste) da ordem Cladocera, família Crustácea, *Daphnia similis* e *Daphnia magna* desempenham um papel importante nos ecossistemas aquáticos. Alimentam-se de algas e servem de alimentos para consumidores secundários. Esses microcrustáceos têm o corpo, com exceção da cabeça, envolto por uma carapaça bivalva, com antenas grandes que servem para sua locomoção. Possuem de quatro a seis patas reduzidas, que servem para a apreensão de alimentos (CETESB, 20_). Os ensaios nestes organismos foram desenvolvidos conforme a norma de referência ABNT NBR 12713, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia ssp* (ABNT, 2004b).

Para se chegar ao objetivo proposto, os testes nos organismos foram feitos com os solventes – Acetonitrila e Metanol – isolados, e também a sua mistura em partes iguais (50%/50%). Inicialmente, antes do início dos testes, foi necessária a leitura do pH, Oxigênio Dissolvido (OD) e Condutividade Elétrica para a verificação se as condições físicas da amostra não iriam interferir no resultado bioquímico da sua exposição nos organismos testados. Outro ponto inicial é o preparo do sistema-teste, em que os organismos testados deveriam ser jovens com idade de 2 a 26 horas (ABNT, 2004b).

Para o teste preliminar foram preparadas diversas concentrações destas amostras em meio específico para cada organismo testado. Estas concentrações determinaram qual a concentração letal e qual concentração que não causa nenhum efeito nos organismos testados das amostras, e que iriam ser conduzidos pelo teste definitivo. Portanto, as soluções foram preparadas sendo baseados em dados já existentes e presentes nas Fichas de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) das duas amostras (CETESB, 2011). As concentrações da solução teste em mg/L deste estágio do estudo foram: 100.000, 10.000, 1.000 e 100.

Para a condução deste teste, após o preparo das concentrações de exposição do organismo, foram separados 20 ml de cada concentração em frascos transparentes, sendo 4 réplicas para cada concentração e para cada organismo testado. Foram introduzidos 5 organismos em cada frasco e incubados por 48 horas em sala com temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$ em ambiente com foto período de 16 horas luz e 8 horas escuro. No final do teste foram avaliados todos os organismos que permaneceram imóveis ou que apresentaram mortalidade. Após a avaliação verificou-se que as concentrações iniciais para o teste definitivo para o organismo *D. Similis* seria de 20.000 mg/L e para *D. Magna* de 50.000 mg/L.

A condução do teste definitivo e o preparo do sistema teste são iguais do teste preliminar, porém, como já foi colocado, as concentrações das soluções teste são diferentes. Neste ensaio, as concentrações letais (que causam efeito em todos os organismos testados) estavam de acordo com o que foi determinado no teste preliminar, e as concentrações intermediárias da solução teste foram diluídas em uma regressão geométrica de razão 2, com o preparo de 5 concentrações para cada organismo testado. As soluções teste, em mg/L, para *D. similis* foram: 20.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1.250. Para *D. magna* foram: 50.000, 25.000, 12.500, 6250, 3125. Após o término do ensaio foram avaliados os organismos que sofreram efeitos nas soluções teste e contabilizados os que estavam com imobilidade o com mortalidade. Devemos realçar também que todas as condições físico-químicas de OD, pH, temperatura e Condutividade Elétrica da amostra estavam normais, e não interferiram no resultado dos ensaios.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Após a coleta dos dados determinados pelos resultados dos ensaios, os mesmos foram planilhados e desta forma foram calculados a Concentração Efetiva 50 (CE_{50}). Para a elaboração dos cálculos teve como auxílio o software de cálculo estatístico *TRIMMED SPEARMAN KARBBER 1.5*. Para a efetuação destes cálculos foi necessário a coleta dos dados através de registros em planilhas específicas do número total dos organismos que apresentaram imobilidade ou mortalidade das 4 replicatas, contudo, o programa aplica a seguinte fórmula (HAMILTON, et al., 1977):

$$m = \sum_{i=1}^{K-1} (p(i) + p(i+1)) \frac{(x(i) + x(i+1))}{2}$$

- k: Número de concentrações
 n(i): Número de indivíduos expostos nas concentrações
 r(i): Número de indivíduos que responderam à exposição das concentrações
 p(i)=r(i)/n(i): A proporção dos indivíduos que responderam à exposição das concentrações
 x(i): log natural da concentração i
 m: log do meio de tolerância da distribuição, I.E. da LC 50

Com os resultados finais, e a determinação da CE_{50} de cada amostra utilizada nos sistemas teste envolvidos neste trabalho, foi elaborada uma tabela onde se podem analisar os efeitos toxicológicos dos solventes testados individualmente e da sua mistura (50/50).

Tabela 1 – Resultados da CE_{50} das amostras

Resultados Iniciais da CE_{50} dos Ensaios Ecotoxicológicos em microcrustáceos			
Organismos	Amostras (mg/L)		
	Acetonitrila	Metanol	Mistura (50/50)
<i>D. similis</i>	6830,2	7845,8	15422,0
<i>D. magna</i>	21763,8	19614,6	21022

Na tabela 1 apresenta-se o resultado da CE_{50} de cada amostra testada, sendo elas os dois solventes isolados, assim como a sua mistura, e nos dois organismos, *D. similis* e *D. magna*. Em uma análise inicial de comparativo entre os organismos, pode-se verificar que a *D. similis* apresentou uma sensibilidade maior ao potencial toxicológico dos solventes do que a *D. magna*, sendo a CE_{50} dos ensaios dos solventes individuais para *D. similis* ficaram na faixa entre 6.000 mg/L a 8.000 mg/L, e para a *D. magna* ficou na faixa de 19.000 mg/L a 22.000 mg/L.

Outro ponto importante que deve ser considerado, entre a diferença da dose-resposta dos dois sistemas teste, foi o resultado dos ensaios com a mistura em partes iguais (50/50) entre os solventes. Com os resultados, verificou-se que a CE_{50} para a *D. similis* foi maior com a mistura dos solventes, sendo que as concentrações letais praticamente dobraram com relação a CE_{50} dos solventes testados isoladamente. No caso da *D. magna* a CE_{50} da mistura dos solventes manteve-se, praticamente, na mesma faixa dos resultados dos solvente testados individualmente.

Com a apresentação destes resultados pode-se tecer algumas considerações com relação aos potenciais toxicológicos dos dois produtos testados individualmente em comparação à amostra da sua mistura.

6) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como o objetivo deste trabalho não é somente determinar as concentrações tóxicas para os organismos em exposição de cada produto testado, mas sim verificar, também, se a mistura dos mesmos aumentaram o seu potencial tóxico, é importante ressaltar que a potencialização somente ocorre se o efeito tóxico da mistura for maior do que a soma dos efeitos testados isoladamente (FALLENBERG, 1980; ZAGATO, 2006).

Portanto, ao se observar os resultados da CE_{50} da mistura nestes ensaios, não se pode afirmar que ocorreu uma potencialização na mistura das duas substancias ativas. No caso da *D. similis*, apresentou uma resistência maior à toxidade da amostra com os solventes misturados, se comprados aos ensaios com os solventes testados isoladamente. Desta forma, considera-se que ocorreu um efeito antagônico, pois a mistura influenciou no resultado se comparado os testes com os produtos isoladamente (ZAGATO, 2006). Para os ensaios com a *D. magna*, verifica-se que a comparação dos resultados da CE_{50} dos testes entre os produtos individuais e o da mistura não ocorreram diferenças representativas, pois as faixas das concentrações permaneceram as mesmas, ou seja, entre 19.000 mg/L a 22.000 mg/L, desta forma não ocorreu efeito nenhum, além da determinação da sua toxidade aos organismos testados.

Ao se comparar os resultados destes ensaios com dados pré-existentes nos Critérios de Saúde Ambiental sobre Segurança Química da Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO, 1998), a CE_{50} para *D. magna* do produto metanol é de 13.240 mg/L e a da acetonitrila é >10.000 mg/L. Com estes dados observa-se que os índices das ações tóxicas são próximas, da mesma forma que foi exposta pelos resultados deste trabalho, sendo a CE_{50} 21.763 mg/L da acetonitrila e 19.614 mg/L do metanol para o mesmo organismo. Além da proximidade da CE_{50} entre os produtos testados por este trabalho, verifica-se também que os resultados não se apresentam muito diferentes dos dados da OMS. Como foi colocado anteriormente, a *D. similis* apresentou uma sensibilidade maior à exposição destes produtos, onde a CE_{50} para Acetonitrila foi de 6.830 mg/L e para Metanol 7.845 mg/L, sendo assim a toxicidade entre os produtos também não variaram para *D. similis*, do mesmo modo do que foi observado para a *D. magna*.

Como foi colocado anteriormente, este trabalho é parte de uma série de estudos ecotoxicológicos que estão sendo desenvolvidos para a quantificação dos potenciais toxicológicos de solventes orgânicos halogenados e não halogenados utilizados em laboratórios de análises químicas. Levando em consideração a similaridade dos resultados dos ensaios testados com solventes isolados e os dados da OMS, considera-se a possibilidade da continuidade dos trabalhos desta pesquisa, mesmo tendo ciência de que os resultados dos testes com o microcrustáceo *D. similis* exposto à mistura dos solventes metanol e acetonitrila não apresentaram em conformidade com os dos resultados toxicológicos dos testes dos solventes isolados. Para isso, deve-se realçar que somente esta campanha de testes são iniciais, e que é necessário uma abrangência maior de testes e com uma maior variedade de amostras, para a verificação do aumento do potencial toxicológico causado pela mistura dos solventes utilizados nestes laboratórios, onde será contemplado no decorrer da pesquisa como um todo.

REFERÊNCIAS

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

_____. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro, 2004.

BERTOLETTI, E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo**. São Paulo: CEPESB, 2008.



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.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de produtos químicos**. São Paulo: CETESB, [200_] Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/produto_consulta_nome.asp. Acesso em: 10 ago. 2008.

_____. **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.

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

GUIMARÃES, S. T. L.. Nas Trilhas da Qualidade: Algumas Ideias, Visões e Conceitos sobre Qualidade Ambiental e de Vida. **Revista Geisel**, Florianópolis, SC, n.40, 2005. p.16.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber Method for estimating lethal concentration in Toxicity bioassays. In: **Environmental Science and Technology**. Vol. 11, p. 714-719. Boezeman, Mont: Montana State University, 1977.

POHANISH, R. S.; GREENE, S. A. **Hazardous substances resource guide**. 2. ed. Detroit: Galé Research, 1997. p. 24-44.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Programme on Chemical Safety**. Geneva:WHO, 1998.