

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental**

**Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**

**CÉLIA PERIN FRELLO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO AGROTÓXICO CARBOFURAN  
UTILIZANDO REATIVOS BIOLÓGICOS: *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*.**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para obtenção do  
título de Mestre em Engenharia Ambiental

Orientador: Rejane Helena Ribeiro da Costa

Co-orientador: William Gerson Matias

FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA - BRASIL

SETEMBRO, 1998

**“AVALIAÇÃO DA TOXIDADE AGUDA DO PESTICIDA CARBOFURAN  
UTILIZANDO REATIVOS BIOLÓGICOS: POECILIA RETICULATA E DAPHNIA  
MAGNA”**

**CÉLIA PERIN FRELLO**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

**MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
na Área de Tecnologias de Saneamento Ambiental.

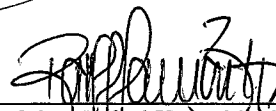
Aprovado por:



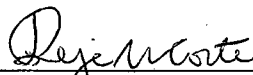
Prof.ª Dr.ª Rejane Helena Ribeiro da Costa  
(Orientador)



Prof. Dr. William Gerson Matias  
(Co-Orientador)



Prof. Dr. Rafael Kopschitz Xavier Bastos



Prof.ª Dr.ª Rejane Helena Ribeiro da Costa  
(Coordenadora)



Prof. Dr. Paulo Belli Filho

FLORIANÓPOLIS, SC - BRASIL  
SETEMBRO DE 1998

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha irmã Vera pela ajuda financeira em meu primeiro ano do Mestrado e pelo seu apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de pesquisa concedida.

À professora Rejane Helena Ribeiro da Costa pela orientação.

Ao professor William Gerson Matias pela orientação e ajuda durante a realização deste trabalho.

À colega de Mestrado Márcia Bonow Lemieszek por proporcionar a realização do meu trabalho com os microcrustáceos, seu apoio e pelas nossas discussões sempre produtivas.

À FATMA (Fundação do Meio Ambiente) pelos microcrustáceos cedidos.

À professora Irani L. de S. Fernandes do Depto. de Ecologia e Zoologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC pela identificação dos peixes utilizados.

Ao professor José Francisco Fletes do Depto. de Informática e de Estatística do Centro Tecnológico da UFSC pela colaboração nas análises estatísticas.

À Doutora Laurence L. Gicquel pela colaboração nas análises cromatográficas.

Ao Mestre em Eng. Ambiental Albertino Frello pelo apoio e ajuda durante todo o mestrado e principalmente na formatação da Dissertação.

Aos colegas Cátia Regina Silva e Leandro Bassani pela ajuda e colaboração durante os testes.

Aos colegas e funcionários do LIMA (Laboratório Integrado de Meio Ambiente) pela disponibilidade, ajuda e incentivo.

Aos amigos verdadeiros de Viçosa mesmo que fisicamente ausentes, souberam estar muito presentes em meus momentos de solidão em Florianópolis.

À amiga Luciana B. Benetti pela amizade e apoio durante o mestrado.

Ao meu eterno e querido orientador Rafael K. X. Bastos por seu incentivo, confiança e exemplo.

Aos meus pais a minha eterna gratidão pela educação, amor, incentivo e dignidade

Ao Albertino por ser um grande companheiro

Aos meus irmãos pelo incentivo

Ao Zé Pretinho pela lealdade, amizade, companheirismo e carinho

À Deus e ao meu Anjo da Guarda.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	iv
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO I .....	4
1.1 A problemática dos agrotóxicos.....	4
1.1.1 Origem e evolução dos agrotóxicos.....	4
1.1.2 Definição e classificação dos agrotóxicos.....	6
1.1.2.1 Definição.....	6
1.1.2.2 Classificação.....	7
1.1.3 Legislação ambiental .....	10
1.1.4 Generalidades sobre o carbofuran.....	11
1.2 Aspectos toxicológicos e ambientais dos agentes tóxicos .....	14
1.2.1 Impactos sobre o meio ambiente.....	14
1.2.2 Toxicidade e mecanismos de ação do carbofuran.....	16
1.2.3 Riscos e efeitos das intoxicações humanas .....	19
1.2.4 Toxicidade animal .....	21
1.3 Importância dos testes de toxicidade.....	25
1.3.1 Generalidades.....	25
1.3.2 Variáveis físicas e químicas em testes de toxicidade .....	26

1.3.3	Organismos utilizados em testes de toxicidade.....	28
1.3.3.1	Peixes.....	28
1.3.3.2	Microcrustáceos (daphnia).....	30
CAPÍTULO II.....		34
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1	Teste de toxicidade aguda com peixes.....	34
2.1.1	Captura e adaptação dos organismos para testes de toxicidade .....	34
2.1.2	Desenvolvimento do método .....	39
2.1.3	Sensibilidade dos organismos-teste .....	40
2.1.4	Preparo da solução-teste .....	41
2.1.5	Teste preliminar.....	41
2.1.6	Teste definitivo.....	42
2.2	Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	43
2.2.1	Cultivo dos organismos .....	44
2.2.2	Desenvolvimento do método .....	45
2.2.3	Teste de sensibilidade dos organismos .....	46
2.2.4	Preparo das soluções do agente tóxico Carbofuran .....	46
2.2.5	Testes .....	46
CAPÍTULO III.....		49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.1	Percentual do agente ativo carbofuran no produto comercial Furadan da Hokko do Brasil.....	49
3.2	Bioensaios com peixes ( <i>Poecilia reticulata</i> ).....	50
3.2.1	Teste de sensibilidade com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) .....	50
3.2.2	Bioensaios com carbofuran utilizando <i>Poecilia reticulata</i> - Testes preliminares.....	54
3.2.3	Bioensaios com carbofuran utilizando <i>Poecilia reticulata</i> - Testes definitivos .....	56

3.3	Bioensaios com microcrustáceos ( <i>Daphnia magna</i> ).....	60
3.3.1	Teste de sensibilidade com dicromato de potássio.....	60
3.3.2	Bioensaios com carbofuran utilizando <i>Daphnia magna</i> - Teste preliminar.....	63
3.3.3	Bioensaios com carbofuran utilizando <i>Daphnia magna</i> - Testes definitivos.....	65
CAPÍTULO IV.....		70
4	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	70
BIBLIOGRAFIA.....		72
APÊNDICE A.....		81
APÊNDICE B.....		90
APÊNDICE C.....		93

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Fórmula Estrutural do: (a) DDT; (b) Lindane; (c) Paration; (d) Carbamatos.....	5
Figura 1.2	Fórmula Estrutural do carbofuran.....	11
Figura 1.3	Rota Metabólica do carbofuran.....	13
Figura 1.4	Fórmula Estrutural da Atrazina.....	19
Figura 1.5	Anatomia de uma <i>Daphnia</i> .sp.....	31
Figura 1.6	Ciclo de reprodução da <i>Daphnia</i> .sp.....	32
Figura 1.7	<i>Daphnia</i> com efípio.....	33
Figura 2.1	Lago do Centro de Convivência, local da captura dos peixes.....	35
Figura 2.2	<i>Poecilia reticulata</i> .....	35
Figura 2.3	Reservatório (R1), com capacidade para 250 L.....	36
Figura 2.4	Reservatório R2 com capacidade para 60 L.....	37
Figura 2.5	Recipientes RA e RB.....	38
Figura 2.6	Fluxograma do procedimento de transporte e adaptação dos organismos.....	39
Figura 2.7	Teste de sensibilidade dos organismos com dicromato de potássio.....	40
Figura 2.8	Teste de toxicidade aguda com pesticida carbofuran.....	43
Figura 2.9	<i>Daphnia magna</i> .....	44
Figura 2.10	Recipientes para cultivo de <i>Daphnia magna</i> .....	44
Figura 2.11	Efípio.....	45
Figura 2.12	Teste de toxicidade com <i>Daphnia magna</i> .....	47



Figura 3.1	Perfil de eluição do carbofuran extraído da solução de Furadan, por HPLC. ....	49
Figura 3.2	(a) Curva padrão do pesticida carbofuran, (b) Curva do agente ativo carbofuran presente no produto comercial Furadan. ....	50
Figura 3.3	Sensibilidade da <i>Poecilia reticulata</i> ao dicromato de potássio. ....	52
Figura 3.4	Testes preliminares com carbofuran utilizando <i>Poecilia reticulata</i> . ....	55
Figura 3.5	Testes definitivos com carbofuran utilizando <i>Poecilia reticulata</i> . ....	57
Figura 3.6	CL50 em relação ao tempo no teste definitivo. ....	59
Figura 3.7a	Sensibilidade da <i>Daphnia magna</i> ao dicromato de potássio. ....	60
Figura 3.7b	Sensibilidade da <i>Daphnia magna</i> ao dicromato de potássio. ....	61
Figura 3.8	Teste preliminar com carbofuran utilizando <i>Daphnia magna</i> . ....	64
Figura 3.9a	Testes definitivos com carbofuran utilizando <i>Daphnia magna</i> . ....	65
Figura 3.9b	Testes definitivos com carbofuran utilizando <i>Daphnia magna</i> . ....	66

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.1	Critérios para classificação toxicológica dos agrotóxicos. ....	9
Tabela 1.2	Solubilidade do carbofuran em diferentes solventes.....	12
Tabela 1.3	Toxicidade dos metabólitos do carbofuran.....	23
Tabela 3.1	Concentração Letal (CL50) em mg/L de dicromato de potássio calculada para <i>Poecilia reticulata</i> por período de observação em horas.....	53
Tabela 3.2	Concentração Letal (CL50) em mg/L de carbofuran calculada para <i>Poecilia reticulata</i> por período de observação em horas.....	58
Tabela 3.3	Concentração Efetiva (CE50) em mg/L de dicromato de potássio calculada para <i>Daphnia magna</i> por período de observação de 24 horas.....	63
Tabela 3.4	Concentração Efetiva (CE50) em mg/L de carbofuran calculada para <i>Daphnia magna</i> por período de observação de 24 e 48 horas.....	67

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

AgNIC - Agriculture Network Information Center

BHC - Benzene hexachloride (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>)

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAS - Chemical Abstracts Service

CE50 - Concentração Efetiva Média

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CL50 - Concentração Letal Média

Cl<sub>2</sub> - Cloro

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DDT - Dimetil-difenil-tricloroetano

DIN - Deutsches Institut Für Normung

DL50 - Dose Letal Média

DNA - cido Desoxirribonucléico

EPA - United States Environmental Protection Agency

EXTOXNET - Extension Toxicology Network

FATMA - Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina

FMC - First Martin Corporation

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IBAMA - Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IEL - Instituto Euvaldo Lodi

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

OHS - Occupational Health Services

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PMEP - Pesticide Management Education Program

s.d. - sem data

USDA - United States Department of Agriculture

USEPA - United States Environmental Protection Agency

Obs.: Todas as unidades de medida apresentadas neste trabalho estão de acordo com INMETRO (IEL, 1994).

## RESUMO

Os carbamatos atualmente são de grande importância no controle de pragas e o seu uso está aumentando em relação aos pesticidas organofosforados e organoclorados. Sua permanência no solo varia entre duas semanas a três meses e a taxa de meia-vida para degradação na água varia de alguns dias a vários anos. A microrregião da bacia do Rio Cubatão destaca-se por ser importante região agrícola, sendo o Rio Cubatão o principal manancial de água de abastecimento para a região da Grande Florianópolis/SC - Brasil. A utilização de pesticidas carbamatos nas lavouras da região contribui com um possível risco de contaminação do solo, e da água, os quais foram quantificados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e encontrado um valor máximo de 4,65 µg/L de carbofuran (grupo dos carbamatos) nas águas do rio. O objetivo dessa dissertação de mestrado foi avaliar o risco do carbofuran, pela sua capacidade inerente em produzir efeitos deletérios em organismos vivos, através de testes de toxicidade aguda, a partir de ensaios de laboratório com peixes (*Poecilia reticulata*) e microcrustáceos (*Daphnia magna*). A sensibilidade dos organismos-teste (peixes e microcrustáceos) foi avaliada, através da determinação da CL(I)50 e CE(I)50, respectivamente, com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (substância de referência). Para o teste de toxicidade aguda, com o carbofuran, foram executados testes preliminares para estabelecer-se o intervalo de concentrações, a serem utilizadas nos testes definitivos e avaliar o efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos-teste em 48 horas de exposição. Dez peixes foram submetidos a cinco concentrações (70 µg/L a 300 µg/L) de carbofuran nos testes definitivos, sob temperatura e aeração constante, monitorando-se os parâmetros físico-químicos: pH, condutividade, oxigênio dissolvido e dureza total. O método utilizado no teste de toxicidade aguda com daphnia consistiu na exposição de dez indivíduos jovens de *Daphnia magna* a seis concentrações (0,7 µg/L a 1,7 µg/L) do agente tóxico por um período de 48 horas, para se determinar a CE50. Os resultados do número de organismos mortos por período de observação foram avaliados estatisticamente pela análise de variância ANOVA - fator único. A CL50 e CE50 pelo Trimmed Spearman-Kärber Method. De acordo com a ANOVA os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas. Com a aplicação do Trimmed Spearman-Kärber Method, constatou-se que a CL50 para peixes encontrada foi igual a 164,91 µg/L ± 40,46 e a CE50 para daphnias 18,76 µg/L ± 6,43.

## ABSTRACT

Carbamates are nowadays of great significance to pest control and increasingly used instead of organo-chlorine and organo-phosphorus pesticides. Carbamate persistence in soil ranges from two weeks to three months and half-life degradation rates range from days to several weeks. Cubatão river basin is an important agricultural area and the river is the main drinking water supply for the metropolitan area of Florianópolis, the capital city of the southern Brazilian state of Santa Catarina. Carbamate pesticides (mainly carbofuran) used in farms of this region contribute to a possible soil and water risk contamination. An analysis of river water using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed a maximum carbofuran concentration of 4,65 µg/L. The objective of this master's theses was to assess the risk of carbofuran, because its inherent capacity to produce deleterious effects on living organisms. To reach this goal, acute toxicity tests were carried out by means of laboratory assay with fish (*Poecillia reticulata*) and crustacea (*Daphnia magna*). The sensibility of test organisms was measured by determining LC(I)50 for fish and EC(I)50 for crustacea with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (reference substance). For acute toxicity tests with carbofuran, preliminary tests were made to determine the concentration range to be used in definitive tests, and to evaluate the acute effect (lethal effect) at 50% of treated organisms in 48 hours of exposure time. Ten fish were submitted to five different carbofuran concentrations (70 µg/L to 300 µg/L) in definitive tests, under constant temperature and aeration. The following physical-chemical parameters were monitored: pH, conductivity, dissolved oxygen and total hardness. To determine EC50, acute toxicity tests were carried out by exposing ten young *Daphnia magna* to the toxic agent at different concentrations (0,7 µg/L to 1,7 µg/L) during 48 hours. The number of dead organisms during the period of observation were assessed statistically by variance analysis ANOVA – only factor. LC50 and EC50 were assessed by Trimmed Spearman-Kärber Method. ANOVA data results showed no significant differences. With the application of Trimmed Spearman-Kärber Method, it was found a LC50 for fish of 164,91 µg/L ± 40,46, and a EC50 for daphnia of 18,76 µg/L ± 6,43.

## INTRODUÇÃO

Nas regiões altamente urbanizadas e industrializadas no decorrer dos últimos anos tem ocorrido um aumento significativo da produção, acúmulo e complexidade de efluentes tóxicos industriais gerando problemas sociais, econômicos e ambientais de grande escala. O avanço tecnológico, o crescimento demográfico, a industrialização e o uso de novos elementos, principalmente na agricultura, têm contribuído para a entrada no ambiente, de maneira contínua, de quantidades crescentes de substâncias químicas, sintéticas e naturais cujas interações e efeitos adversos sobre o ambiente e os seres vivos, em geral, muito pouco ou nada se conhece.

Em relação aos ecossistemas aquáticos, os problemas de poluição ambiental são mais graves devido a diversidade de maneiras pelas quais pode ocorrer. O lançamento de esgotos e águas residuárias industriais sem tratamento prévio; o carreamento por águas pluviais, de substâncias tóxicas tais como pesticidas, herbicidas e fertilizantes empregados na agricultura ou de resíduos altamente tóxicos dispostos no solo são algumas dessas maneiras. A água é uma das principais rotas onde os agentes tóxicos, como os agrotóxicos, são transportados de suas áreas de aplicação para outras partes do ambiente. Assim os agrotóxicos alcançam córregos, e podem ser amplamente dispersados para outros córregos, rios, lagos, reservatórios e o mar (Gilliom, 1997).

Os problemas decorrentes dos efeitos tóxicos dessas substâncias não se restringem apenas ao corpo d'água receptor, mas podem em última análise, afetar a saúde humana, se considerarmos a probabilidade de ocorrerem fenômenos de bioacumulação e persistência desses poluentes ao longo da cadeia alimentar. O uso múltiplo destes recursos hídricos contaminados também é problemático para consumo humano, recreacional ou industrial.

Nas últimas décadas a intensificação do uso de agrotóxicos e as ocorrências de efeitos danosos desses agentes químicos sobre o homem e o ambiente fizeram com que vários países, inclusive o Brasil, regulamentassem seu uso e sua produção, com o objetivo de minimizar as consequências sobre os ecossistemas (Sewell, 1993). Devido ao grau de impacto ambiental dessas substâncias potencialmente tóxicas ao meio ambiente, vários

métodos de análises químicas, visando detectar e quantificar estas substâncias foram desenvolvidas. A simples determinação das possíveis substâncias tóxicas presentes num corpo d'água não permitem avaliar seus efeitos, em termos de toxicidade, pois, existe uma mistura de substâncias químicas que podem apresentar entre si efeito sinérgico, antagônico, neutro ou aditivo. Tradicionalmente o controle das substâncias era feito através de análises químicas e havia uma tendência natural em supor que a toxicidade a organismos aquáticos poderia ser estimada por tais análises. Um método alternativo e complementar às tradicionais análises químicas empregadas para determinar as mudanças ambientais, principalmente, em termos de toxicidade das substâncias introduzidas nos ecossistemas, é a utilização de bioensaios ou testes biológicos, uma vez que os organismos aquáticos são indicadores sensíveis da qualidade da água, apresentando resposta a níveis perigosos de quaisquer substâncias químicas ou misturas complexas tóxicas (Buikema et al., 1982; Parrish, 1985).

Em Santa Catarina, a microrregião da bacia do rio Cubatão destaca-se por ser uma importante região agrícola, respondendo pelo suprimento de grande parte da demanda local de horti-fruti-granjeiros. Nesta região o rio Cubatão, constitui-se no principal manancial de água de abastecimento para a Grande Florianópolis, abastecendo uma população com cerca de 500.000 habitantes. A utilização de agrotóxicos nas lavouras da microrregião constitui em sensível risco de contaminação do solo e água.

O pesticida carbofuran foi escolhido por ser uma das substâncias mais utilizadas como princípio ativo dos agrotóxicos utilizados na região. Os estudos realizados pelo Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, detectaram a presença do carbofuran no rio Cubatão através de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Gicquel et al., 1998). Leão (1997), por sua vez, enfocou a mobilidade do carbofuran ao longo do perfil do solo, constatando pouca afinidade do carbofuran com o tipo de solo da região, apresentando deslocamento progressivo dos resíduos do produto da camada arável para camadas mais profundas, o que resulta num alto potencial de contaminação das águas subterrâneas.

Dando seqüência a esses trabalhos, este trabalho objetiva avaliar a toxicidade do agrotóxico carbofuran aos organismos aquáticos, através de bioensaios (testes agudos) com peixes e microcrustáceos (daphnias) em laboratório.



Determinar os intervalos de concentrações para se conhecer a menor concentração na qual ocorre a mortalidade de todos os organismos-teste e a maior concentração que não causa letalidade aos organismos, após 48 horas de exposição ao agente ativo carbofuran.

Avaliar a Concentração Letal Média (CL50) para peixes e Concentração Efetiva (CE50) para microcrustáceos.

## CAPÍTULO I

### 1.1 A problemática dos agrotóxicos

#### 1.1.1 Origem e evolução dos agrotóxicos

O início da utilização dos agrotóxicos na agricultura, varia de acordo com a literatura estudada. A Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS,1997), considera o início a partir da década de 20, ao passo que Paschoal (1979) cita que as escrituras dos gregos, romanos e chineses mencionam, já há mais de três mil anos, o uso de certos produtos químicos para o controle de insetos.

Em várias épocas da história as substâncias químicas se adicionaram ao arsenal de armas físicas de impacto. A literatura descreve que em 431-404 a.C., gases sufocantes provenientes da queima de enxofre eram usados em guerras sobre tropas inimigas. “Na Guerra Civil Americana (1861-1865) o Governo cogitou o uso do cloro ( $Cl_2$ ) contra os revoltosos, mas a história dos gases de guerra começou de fato na 1ª Guerra Mundial (1914-1918)”, na qual toneladas de armas químicas foram utilizadas. O desenvolvimento de gases de guerra está intimamente ligado ao desenvolvimento dos inseticidas. Todos os derivados orgânicos do ácido fosfórico são tóxicos e com penetração cutânea em maior ou menor extensão. Em sua fórmula geral, a apresentação dos radicais alquil, alcoxil, pirofosfato ou dimetilamida, resulta em inseticidas (Alcantara et al., 1992).

Paschoal (1979) relata que o uso moderno dos inseticidas data de 1867, quando um produto chamado “verde-paris”(aceto arsenito de cobre) foi preparado comercialmente e usado contra um grande número de pragas, aparecendo após esta data, outros produtos à base de arsênico, flúor, antimônio, bário, boro, cádmio, chumbo, mercúrio e óleos minerais. Mas foi no ano de 1939, por ocasião da Segunda Guerra Mundial, que marcou uma brusca transição na metodologia de controle de pragas, com as descobertas das

propriedades inseticidas do DDT (Figura 1.1 a), o primeiro produto organossintético produzido.

Por volta de 1941 pesquisadores franceses e ingleses descobriram, quase que simultaneamente, as propriedades inseticidas do BHC ou benzeno hexaclorado, produto organoclorado resultante da reação de adição entre cloro e benzeno. Sob ação da luz solar vários estéreos isômeros são gerados mas o gama lindane (Figura 1.1 b) é o mais efetivo como inseticida. No final da década de 40 os alemães introduziram os inseticidas organofosforados. Geralmente compostos orgânicos aromáticos e contém enxofre e nitrogênio além do fósforo em sua estrutura. O Paration (Figura 1.1 c) é um exemplo bastante efetivo contra pragas tais como a mosca da fruta. Em meados de 1956 a Union Carbide, dos Estados Unidos, lança um inseticida carbamato (o carbaril) (Figura 1.1 d) (Paschoal, 1979; Gallo et al., 1988; Swayer et al., 1994).

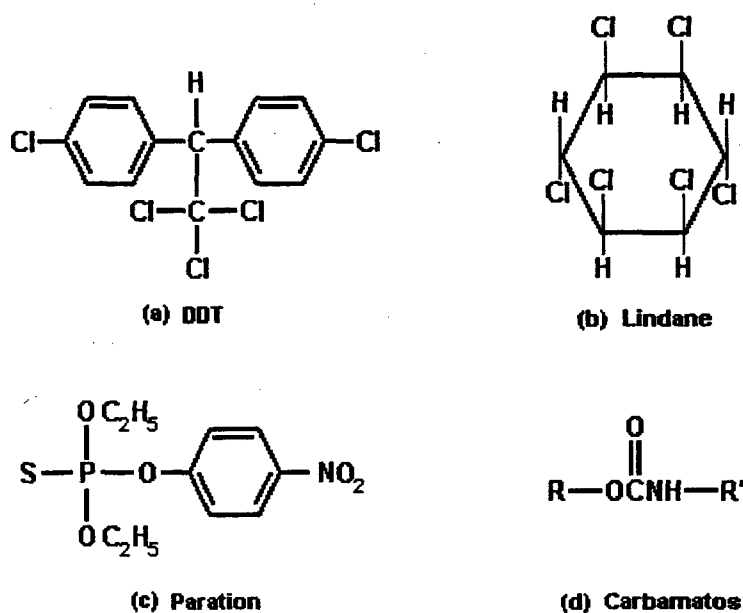


Figura 1.1 Fórmula estrutural do (a) 1,1,1 - tricloro - 2,2 - di - (*p*-clorofenil) etano, DDT (inseticida organoclorado); (b)  $\gamma$ - hexacloreto de benzeno (lindane), BHC (inseticida organoclorado); (c) O,O-Dietil-O-*p*-nitrofeniltiofosfato (paration), (inseticida organofosforado); (d) Estrutura molecular geral dos carbamatos (Gallo et al., 1988, Swayer et al., 1994).

Após a guerra, novos organossintéticos foram produzidos; representando o florescimento de poderosa estrutura industrial de defensivos químicos em todo mundo (OPAS/OMS, 1997). No Brasil, Paschoal (1979), fixa o início dos organossintéticos em fins de 1943, com as primeiras amostras de DDT recebidas pelo Instituto de São Paulo. De acordo com OPAS/OMS (1997), os agrotóxicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate de vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 60.

Larini (1979), cita que no final da década de 70 era alarmante a quantidade de formulações à base de produtos químicos de ação praguicida lançados no mercado. De 1.200 diferentes formulações registradas, 80% foram utilizadas com finalidade inseticida e, destes, os produtos organoclorados constituíam cerca de 62%; os organofosforados cerca de 35% e carbamatos cerca de 3%. Atualmente, o Brasil é um dos maiores consumidores mundiais, do que resultam inúmeros problemas ambientais e de saúde..

## **1.1.2 Definição e classificação dos agrotóxicos**

### **1.1.2.1 Definição**

Existe muita controvérsia na literatura a respeito da terminologia utilizada para os produtos agrícolas. Souza Cruz (1993a), define agrotóxicos *como substâncias químicas destinadas ao controle de pragas, doenças e ervas daninhas*. Para OPAS/OMS (1997), o termo “agrotóxico” ao invés de “defensivo” agrícola passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar venenos agrícolas e são ainda, genericamente denominados praguicidas ou pesticidas.

De acordo com Paschoal (1979), o termo praguicida significa *produto que mata pragas*, aplicando-se a insetos, ácaros, carrapatos, moluscos e ratos e, sob essa definição, apenas as substâncias químicas capazes de matar pragas são consideradas praguicidas, sendo excluídas as substâncias atraentes, repelentes, esterilizantes, etc. Paschoal, afirma ainda que, o termo pesticida (do inglês *pesticide*), é totalmente inadequado a nossa língua,

pois significa "o que mata peste" e de acordo com os dicionários da língua portuguesa peste é *qualquer doença epidêmica grave, de grande mobilidade e mortalidade*, com o sentido mais de doença do que de praga (o que o torna errôneo para o significado que se deseja exprimir). Segundo Machado (1995), o termo "defensivo agrícola" deixou de ser usado pois distorcia o conceito dos agrotóxicos, cuja denominação fugia a linha da terminologia internacional (pesticidas) conforme discutido acima e "agrotóxicos" no sentido geral incluindo todos os produtos químicos usados nos agroecossistemas para combater pragas e doenças.

Machado (1995) cita que a Constituição Federal foi mais abrangente em não mencionar o termo agrotóxico, mas "substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente."

De acordo com o art.2º, I da Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, são considerados agrotóxicos "os produtos e os agentes de processos físico, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção das florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna , a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento" (Fundação do Meio Ambiente-FATMA, 1995).

#### **1.1.2.2 Classificação**

Os agrotóxicos podem ser classificados como: (a) inorgânicos que incluem os produtos arsenicais, os produtos fluorados e óleos minerais e (b) orgânicos: inseticidas que se dividem em organofosforados, carbamatos (sistêmicos e não-sistêmicos), organoclorados e piretróides; os fungicidas; herbicidas; raticidas; acaricidas; nematocidas; molusquicidas e fumegantes. (Paschoal, 1979; OPAS/OMS, 1997).

Rollins et al. (1997) cita quatro tipos de inseticidas usados: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides sintéticos. Os organoclorados: família de inseticidas que contém o DDT (dieldrin e aldrin) são raramente usados hoje e muitos foram banidos devido a sua persistência no ambiente e sua tendência de biomagnificação, ou aumento na concentração em animais a medida em que aumenta o nível na cadeia alimentar. Os inseticidas organofosforados são muito utilizados. Este grupo inclui disulfaton (Di-Syston®), malation, paration etc. A toxicidade dos organofosforados varia de baixa (malation) a alta (paration). Os inseticidas carbamatos também são comumente usados, incluindo o carbaril (Sevin®), carbofuran (Furadan®) e metomil (Lannate®). Alguns compostos carbamatos tais como o carbaril não são muito tóxicos à vida terrestre (especificamente pássaros), embora outros tais como o carbofuran e metomil sejam altamente tóxicos. Inseticidas piretróides sintéticos geralmente têm baixa toxicidade para pássaros e mamíferos. Entretanto, são extremamente tóxicos para peixes e outros organismos de vida aquática.

Os pesticidas podem ser aplicados como sprays, grânulos, pó, em tratamento de grãos ou como isca. Os sprays são aplicados em plantas que estão em crescimento, enquanto formulações granulares são tipicamente aplicadas na época do plantio.

De acordo com as diretrizes de uma Comissão de Especialistas da Organização Mundial da Saúde (O.M.S.), os agrotóxicos são classificados em função do seu poder tóxico, obedecendo as seguintes recomendações básicas:

- “A classificação deve distinguir, para certo tipo de defensivos, as formulações mais ou menos perigosas, tendo em vista não só os teores de princípios ativos, como também o seu estado físico. Geralmente os produtos que se apresentam na forma granulada são menos perigosos que as formulações líquidas que contenham a mesma percentagem de princípio ativo.
- Deve ter como ponto de partida a DL 50 por via oral ou dérmica. Embora a DL50 via oral não seja uma indicação inteiramente satisfatória de toxicidade dos defensivos, sua determinação ainda constitui uma prova clássica em toxicologia.
- É ainda necessário transferir um produto para uma outra categoria de classificação: se ele produzir um efeito tóxico ou incomum; se seus efeitos são irreversíveis; se seu risco

de intoxicação é maior por via oral ou dérmica; ou ainda se o produto revelar bem mais perigo para o homem do que as provas práticas em animais nos tenham podido sugerir.” (Galvão, s. d.).

Segundo as Normas e Manuais Técnicos II do Ministério da Saúde (1982), os agrotóxicos podem também ser classificados em quatro categorias, de acordo com perigo que oferecem. A categoria varia conforme a concentração do ingrediente ativo na formulação e com o estado físico, sólido (S) ou líquido (L). Os critérios para a classificação estão resumidos na tabela 1.1:

Tabela 1.1 Critérios para classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classificação Toxicológica	DL50 para ratos(mg/kg)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
I – Altamente perigosos	5-50	20-200	10-100	40-400
II – Moderadamente perigosos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III – Ligeiramente perigosos	500-2000	2000-6000	1000-4000	4000-12000
IV – Praticamente sem perigo	Acima de 2000	Acima de 6000	Acima de 4000	Acima de 12000

Fonte: Normas e Manuais Técnicos (1982).

De acordo com Larine (1979), as características básicas para a avaliação de uma substância inseticida podem ser resumidas em: a) ser completamente inócuo para o homem, seja sob o aspecto da intoxicação aguda ou crônica; b) não apresentar fitotoxicidade; c) agir com rapidez provocando a morte do inseto em qualquer estágio do seu desenvolvimento e não apenas a paralisação temporária do seu ciclo evolutivo, ao fim do qual o inseto reinicia suas atividades adquirindo imunidade; d) possuir ação persistente ou, no mínimo, longa duração. Entretanto, esses requisitos dificilmente se encontram reunidos num só inseticida. Via de regra, essas substâncias agem de forma extremamente específica e, em função de suas estruturas químicas, apresentam variações de toxicidade para o homem, animais, plantas e insetos.

### 1.1.3 Legislação ambiental

Machado (1995) cita que na Constituição de 1988, a parte global das matérias ambientais pode ser legislada em três planos – federal, estadual e municipal. As competências ambientais são repartidas entre a União: Ministérios e IBAMA; e os estados – que no caso de Santa Catarina é de competência da FATMA. O CONAMA é o órgão consultivo e deliberativo.

A Constituição Federal não se omitiu no prever a obrigatoriedade para o Poder Público no controle dos agrotóxicos. A Lei 7.802/89 e o Decreto 98.816/90 exigem o registro em órgão federal. O registro do produto agrotóxico é ato privativo dos órgãos federais: Ministério da Agricultura, Ministério da Saúde e Ministério do Interior (IBAMA), destinados a atribuir o direito de produção, comercialização, exportação, importação e utilização. A Lei 7.802/89 e Decreto 98.816/90 determinam como condições para o registro de agrotóxicos novos e com inovações, a avaliação comparada da toxicidade na área da saúde e do meio ambiente, na qual devem ser observados os seguintes parâmetros: (a) toxicidade da formulação; (b) presença de problemas toxicológicos especiais, tais como: neurotoxicidade, fetotoxicidade, ação hormonal e comportamental e ação reprodutiva; (c) persistência no ambiente; (d) bioacumulação; (e) formulação; (f) método de aplicação (Machado, 1995; Pinto, 1996).

A Lei 6.452/84 do Estado de Santa Catarina, dispõe sobre o controle de agrotóxicos, pesticidas e outros biocidas, a nível estadual. A atividade de armazenamento dos agrotóxicos está condicionado a prévio cadastramento dos mesmos na FATMA. Em território estadual só será admitido a distribuição e comercialização dos produtos agrotóxicos que já estiverem registrados no órgão federal competente (FATMA, 1995).

A Resolução CONAMA de Nº. 20 de 18 de junho de 1986 classifica as águas em oito classes: águas doces (classe especial, I, II, III e IV), salinas (classes V e VI) e salobras (VII e VIII). Para as águas da Classe Especial, I, II e III, são estabelecidos limites para substâncias potencialmente prejudiciais, nos quais se enquadram os pesticidas carbamatos.



No estado de Santa Catarina a Lei 5.793 de 15 de outubro de 1980, dispõe sobre a proteção e melhoria da qualidade ambiental, sendo seus dispositivos regulamentados pelo Decreto 14.250, referentes à proteção e a melhoria da qualidade ambiental.

#### 1.1.4 Generalidades sobre o carbofuran

O pesticida carbofuran (Figura 1.2) é um N-metilcarbamato heterocíclico de amplo espectro; sistêmico<sup>1</sup>, derivado do ácido carbâmico, conhecido pelo nome químico de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato e 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato e fórmula molecular  $C_{12}H_{15}NO_3$  (Miles et al., 1981; Gelmini et al. 1987; Howard, 1989; Gupta, 1994; Labchuk, 1997; Ronday et al., 1997).

Foi registrado primeiramente no Canadá em 1969 e vendido pelo nome comercial de Furadan (Labchuk, 1997), sendo também encontrado pelos nomes comerciais: Ladre 70143, Curaterr, D1221, ENT 27164, Yaltox, Furacarb, Niagara 10242, Brifur, Crisfuran, Chinufur, Curaterr, Pillarfuran, Knenofuran (EXTOXNET, 1993; Drinking Water and Health, 1997).

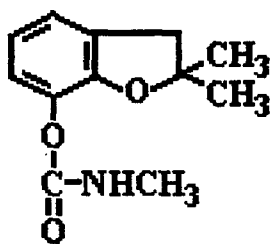


Figura 1.2. Fórmula Estrutural do Carbofuran (FMC, 1977).

<sup>1</sup> “Inseticidas Sistêmicos” ou “endoterápicos” são produtos metabolizados no interior do vegetal, veiculados com a seiva e sugados pelos insetos. Aplicados nas formas de pulverizações ou em mistura do pó com a semente vegetal.

O carbofuran pode ser encontrado comercialmente como um inseticida líquido (“flowable”) e como formulações granulares (Talekar et al., 1977; Howard, 1989; Labchuk, 1997). No seu estado granular apresenta-se sólido, cristalino, inodoro, branco, instável em meio alcalino e estável sob condições neutras ou ácidas. Degrada-se acima de 130 °C. Apresenta peso molecular igual a 221,3; ponto de fusão 150-153 °C; com registro no CAS sob o número:1563-66-2. Sua gravidade específica é 1.180 a 20°C, constante da Lei de Henry:  $3,9 \times 10^{-9}$  atm m<sup>3</sup>/mol, coeficiente de partição (log  $k_{ow}$ ) varia de 114 a 232. A pressão de vapor apresenta variações dependendo do autor pesquisado. Foi encontrado para mPa 0,031 (20°C) e 6,47 (20-25°C), e em mmHg  $8,3 \times 10^{-6}$  (25°C) a  $1,1 \times 10^{-4}$  (50°C). A solubilidade em água (ppm ou mg/L) encontrada foi de 320 - 700 a 20° - 25°C, respectivamente (EXTOXNET, 1993; Miles et al., 1981; Horward, 1989; FMC, 1977; Ronday et al., 1997; AgNIC, 1997). A solubilidade em diferentes solventes é apresentada na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Solubilidade do carbofuran em diferentes solventes.

Solvente	Solubilidade (25°C)
Acetona	150 g/kg
Acetonitrila	140 g/kg
Benzeno	40 g/kg
Ciclohexano	90 g/kg
Dimetilformado	270 g/kg
Dimetilsulfoxido	250 g/kg

Fonte: EXTOXNET,1993.

A meia-vida do carbofuran varia de acordo com o experimento de cada autor, o meio onde se encontra, o pH, e a temperatura. Em experimentos feitos em solos, variou de 2 a 110 dias; e experimentos realizados em águas os valores encontrados foram de 1,0; 8,2 e 690 semanas à 25°C, em pH 6,0, 7,0 e 8,0 respectivamente (Howard, 1989; USEPA,

1989 e USDA, 1990 citados por EXTOXNET,1993; Mabury et al., 1996; AgNIC,1997). A fonte dominante de emissão do carbofuran para o ambiente é a aplicação do composto como inseticida, em lavouras de arroz, alfafa, uvas, milho, sorgo, batata, pimenta e outras colheitas de campo (Talekar et al., 1977; Howard, 1989; Labchuk, 1997). Por sua mobilidade o carbofuran possui um alto potencial de contaminação das águas subterrâneas (Drinking Water and Health, 1997).

A figura 1.3 apresenta a rota metabólica do carbofuran. Em solos, o carbofuran é degradado por hidrólises químicas e processos microbiológicos.

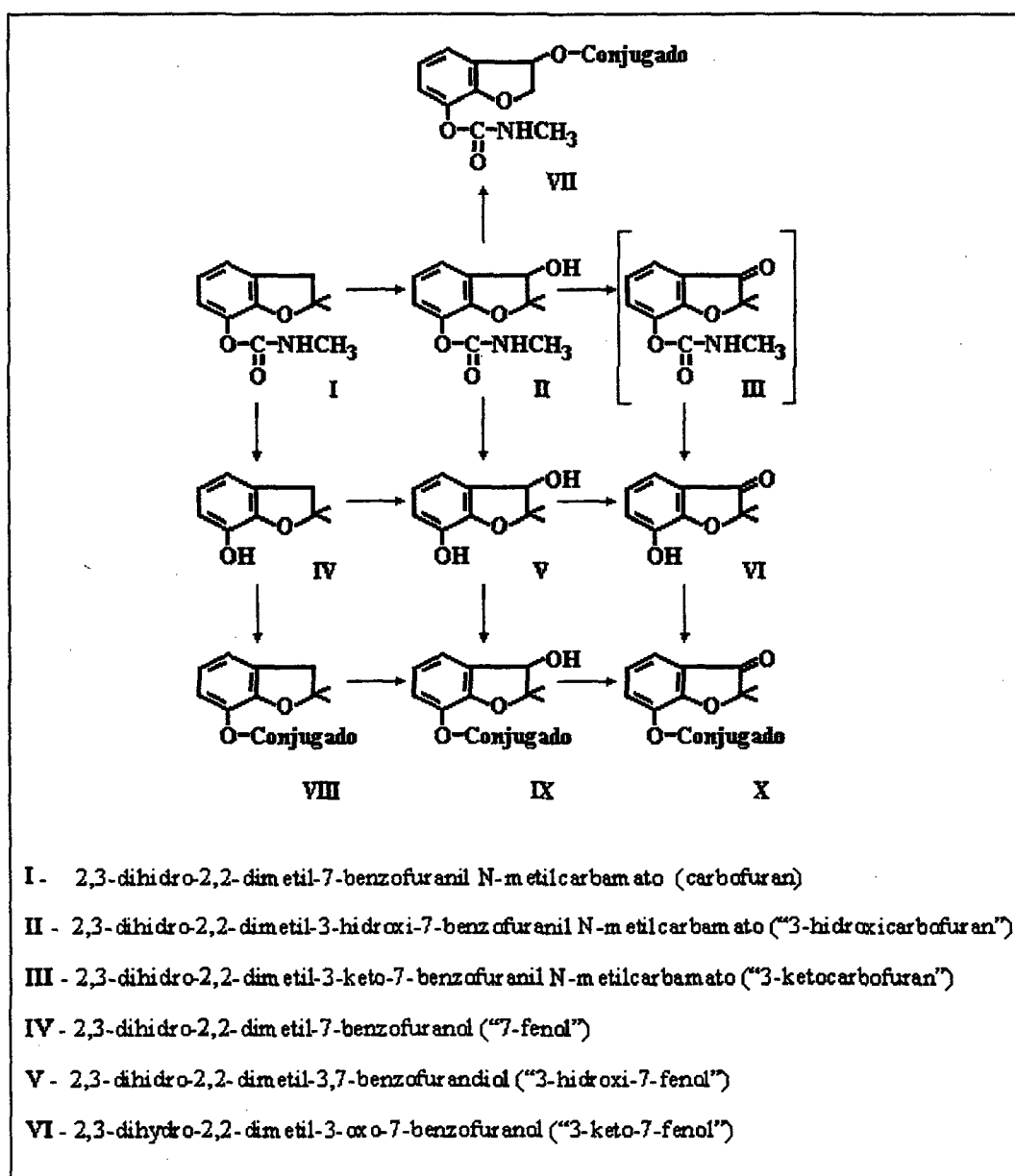


Figura 1.3 Rota Metabólica do Carbofuran (FMC, 1977).

Estudos têm mostrado que o carbofuran é rapidamente decomposto em solos alcalinos, quando comparados a solos neutros ou ácidos, já que hidrólises químicas, em soluções aquosas, ocorrem muito mais rapidamente sob condições alcalinas. A fotodegradação e microrganismos aquáticos também podem contribuir para a degradação. Na degradação do carbofuran um segmento especializado da população microbiana (*Pseudomonas spp.*) atua predominantemente na maior parte da degradação, mas sua contribuição é insignificante para a degradação dos produtos de hidrólise do carbofuran fenólico. A fotólise direta e a fotoxidação (via radicais hidroxil) podem também contribuir para remoção do carbofuran de águas naturais, aumentando a acidez da água e a meia-vida hidrolítica. Sua decomposição térmica inclui óxidos tóxicos de nitrogênio (Horward, 1989; USEPA, 1991 e OHS, 1991 citados por EXTTOXNET, 1993; Mabury et al., 1996; Drinking Water and Health, 1997). Segundo FMC (1977), o carbofuran é metabolizado em duas rotas principais: hidrólises do ester carbamato a um fenol correspondente, e/ou oxidação progressiva do grupo metileno ao anel furanil produzindo álcool e cetona correspondente.

## **1.2 Aspectos toxicológicos e ambientais dos agentes tóxicos**

### **1.2.1 Impactos sobre o meio ambiente**

Kendall (1992) cita que o campo da toxicologia de animais selvagens tem crescido dramaticamente, em resposta à necessidade de métodos de avaliação de riscos para os agroquímicos do ambiente.

No Brasil, já se sabe que os efeitos colaterais dos praguicidas, em linhas gerais, causam os mesmos problemas observados em outros países, devendo, porém, se observar que a intensidade desses efeitos pode ser muito mais acentuada nas condições de baixa latitude do que nas condições de clima temperado e ártico. Nos ecossistemas tropicais a diversidade de espécies e, conseqüentemente, as interações entre os vários níveis tróficos das cadeias alimentares é muito maior do que nos ecossistemas de um clima temperado.

(Paschoal, 1979). Além disso, muitos praguicidas, sofrem alterações de sua estrutura química durante o período em que permanecem no ambiente, resultando na formação de metabólitos ou produtos de degradação, alguns deles, por vezes, mais tóxicos que o produto original (Larini, 1979).

Os primeiros carbamatos com efeito inseticida eram de toxicidade relativamente alta para mamíferos e apresentavam eficiência seletiva. Em geral, mostravam-se eficazes principalmente contra determinados insetos daninhos às plantas, em particular os pulgões, mas seu efeito acaricida era relativamente insignificante. O uso muito comum do carbofuran na agricultura, tem acarretado a contaminação de alimentos, água, ar e seus efeitos adversos a saúde são inevitáveis em humanos, animais domésticos, animais selvagens e peixes. A contaminação dos cursos e depósitos naturais de água pode se dar pelo vento na ocasião das aplicações ou pelo carreamento artificial dos inseticidas, depositados no solo, pelas águas pluviais ou de irrigação (Larini, 1979).

A alteração do equilíbrio ecológico pelos inseticidas pode afetar seriamente a fauna de invertebrados aquáticos e de peixes. Algumas espécies de peixes, que estão no fim da cadeia alimentar estão desaparecendo sob a ação dos resíduos de inseticidas, os quais concentram-se progressivamente nos organismos envolvidos na cadeia.

Entretanto prevenção da alteração da qualidade das águas dos corpos receptores, bem como a proteção da vida aquática, não pode ser assegurada apenas pela intenção do controle das emissões, devendo ser acompanhada por mecanismos jurídico-político-administrativos que garantam a efetiva e eficaz implementação de medidas de controle.

Sabe-se que em muitos casos as multas aplicadas às indústrias são insignificantes e, por isso, preferidas ao invés da aquisição de equipamentos antipoluentes. Além do mais, pela Medida Provisória Nº 1.710 de 7 de agosto de 1998, os órgãos ambientais integrantes do SISNAMA, responsáveis em manter a qualidade ambiental, ficam autorizados a permitir que pessoas físicas ou jurídicas responsáveis pelas atividades, consideradas efetiva ou potencialmente poluidoras capazes de qualquer forma, causar degradação ambiental, possam promover as necessárias correções de suas atividades, no prazo de vigência podendo variar de noventa dias a cinco anos, com possibilidade de prorrogação por igual período (Diário Oficial, 1998).

Esse quadro tende a intensificar o problema da poluição das águas, refletindo não apenas na qualidade das mesmas, no que se refere à biota aquática, mas seus efeitos também poderão vir a ser sentidos, quando do uso dos rios como fonte de água para irrigação de áreas cultivadas, pois de acordo com Mucci et al. (1987) "em um rio, a água, os organismos aquáticos e as atividades humanas se entrelaçam intimamente, formando um verdadeiro ecossistema".

### **1.2.2 Toxicidade e mecanismos de ação do carbofuran**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram no mundo cerca de três milhões de intoxicações agudas por agrotóxicos com 220 mil mortes por ano. Dessas, cerca de 70% ocorrem em países do chamado Terceiro Mundo. Além da intoxicação de trabalhadores que têm contato direto ou indireto com esses produtos, a contaminação de alimentos tem levado a grande número de intoxicações e mortes (OPAS/OMS, 1997).

Os agrotóxicos podem determinar três tipos de intoxicações: aguda, subaguda e crônica. A intoxicação aguda decorre do contato com produtos extrema ou altamente tóxicos, onde os sinais e sintomas clínicos aparecem rapidamente. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade do veneno absorvido, podendo levar a vítima à morte em curto espaço de tempo. Os sinais e sintomas são nítidos e objetivos (OPAS/OMS, 1997).

A intoxicação subaguda ocorre por exposição moderada ou pequena a produtos altamente tóxicos ou medianamente tóxicos e tem aparecimento mais lento. A toxicidade crônica, resulta do acúmulo progressivo de um produto no organismo, por ação prolongada e inadvertida de doses pequenas, sendo irreversível. As intoxicações crônicas, caracterizam-se pelo surgimento tardio, após meses ou anos, pela exposição pequena ou moderada a produtos tóxicos ou a múltiplos produtos, por sintomas e sinais clínicos não característicos, podendo, não raro, levar a falsos diagnósticos e acarretar danos irreversíveis tais como paralisias e neoplasias. (Giust, 1978; Larini, 1979).

A toxicidade aguda de um produto é expressa pela quantidade necessária, em mg/kg de peso corpóreo, para provocar a morte de 50% de um lote de animais submetidos à experiência (Dose Letal Média) (Giust, 1978; Larini, 1979).

Entretanto, de acordo com Larini, 1979 a dose letal média (DL50) apresenta, algumas restrições, tais como: (a) não oferece informações sobre a dose que pode ser letal a uma proporção muito pequena de um grande número de animais; (b) oferece pouca ou nenhuma informação com relação aos efeitos cumulativos de um composto; (c) os valores de DL50 são expressos geralmente em termos de uma única dose e (d) os valores obtidos experimentalmente sofrem variações de acordo com a espécie de animal utilizada, a linhagem, a idade, o sexo etc.

De outra maneira os termos “Dose Letal” (DL) e “Concentração Letal” (CL), têm sido freqüentemente utilizados. O termo “Dose Letal”, algumas vezes empregada incorretamente, não é apropriada para designar uma certa concentração em um meio externo, visto que uma dose, estritamente falando, é uma medida quantitativa administrada. O termo “Concentração Efetiva” (CE) aplica-se somente para concentrações e é geralmente usado em conexão com outros efeitos além da morte (Polluted Waters, s.d.).

Os ésteres do ácido carbâmico (carbamatos) são, à semelhança dos inseticidas fosforados, inibidores da colinesterase, enzima presente nas junções neuro-musculares e no sistema nervoso. A inibição da acetilcolinesterase determina o acúmulo de acetilcolina, resultando em várias conseqüências sobre as transmissões nervosas, responsáveis pelo aparecimento de uma sintomatologia grave e polimorfa (Larini, 1979; OPAS/OMS, 1996). Esta inibição, ao contrário daquela causada pelos organofosforados, é reversível e os efeitos do carbofuran não são cumulativos, ou seja, não ocorre depressão crônica da acetilcolinesterase resultante de exposições repetitivas ao produto, porém as intoxicações podem ser graves. Os inseticidas inibidores das colinesterases são absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação e sua toxicidade pode ser aumentada por simultâneas exposições com outros inibidores da acetilcolinesterase (Gupta, 1994; OPAS/OMS, 1996, Souza Cruz, 1993b).

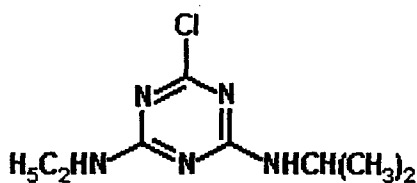
O carbofuran e/ou seus maiores metabólitos podem atravessar a barreira placentária, causar efeitos teratogênicos e produzir sérios efeitos sobre a unidade placentária-feto-maternal (Gupta, 1994). Podem provocar curto circuito no sistema nervoso de um organismo, causando a contração em seqüência aleatória dos músculos e a vítima normalmente morre de parada respiratória (Labchuk, 1997). A toxicidade dérmica do carbofuran e suas formulações é muito menor que a toxicidade oral. A toxicidade oral das formulações granulares é 10% mais baixa que o material técnico e a toxicidade dérmica das formulação granular é tão baixa que este não pode ser medido (FMC, 1977). Em geral, o carbofuran apresenta toxicidade mais elevada que seus metabólitos.

As rotas metabólicas do carbofuran em plantas e animais são bastantes similares, sendo que a maior diferença qualitativa está na natureza dos conjugados, onde os metabólitos fenólicos ou hidroxilados podem formar glicosidos em plantas, mas glucuronidos ou sulfatos em animais. O carbofuran é imediatamente absorvido pelas raízes das plantas e translocado para a folhagem, sendo que a translocação para os corpos frutíferos das plantas ocorre mais vagarosamente que a translocação para a folhagem e a absorção do carbofuran pela folhagem é incompleta. Os maiores metabólitos em plantas são 3-hidroxicarbofuran, 3-hidroxi-7-fenol, 3-ketocarbofuran e 3-keto-7-fenol; o 7-fenol está geralmente presente em quantidades, comparativamente, muito pequenas. O metabólito 3-ketocarbofuran é hidroliticamente instável e não foi detectado. O carbofuran constitui uma maior fração do total de resíduos em plantas, ao passo que é encontrado em quantidades traços em tecidos animais e em excretas, quando alguns metabolismos sensíveis são estudados com carbofuran radiomarcados (FMC, 1977; Mabury et al., 1996).

Kearney (1976) em seus estudos constatou que o carbofuran foi metabolizado mais lentamente em pinheiro que em outras plantas e animais, e novamente produz 3-keto e 3-hidroxi e produtos de divisão. Estudos projetados para avaliar a interação do carbofuran com herbicidas mostram que a atrazina aumenta a toxicidade deste carbamato para insetos e que seu metabolismo em cevada foi inibido através de clorobromuron.

A atrazina cuja estrutura química é mostrada na Figura 1.4, atualmente é um herbicida bastante utilizado, de difícil degradação biológica, sendo um contaminante normalmente detectado em águas superficiais e sub-supeficiais de regiões agrícolas (Swayer et al. 1994).





Atrazina

Figura 1.4 Fórmula Estrutural da Atrazina (Swayer et al. 1994).

Em experimentos com tomates, Ling et al. (1993) citam que tomates cultivados hidroponicamente irrigados com carbofuran, foram analisados e encontrados resíduos abaixo do nível máximo estabelecido pela legislação local. Foi demonstrado que o carbofuran depois de ser absorvido pelas plantas foi metabolizado dentro de um período de meia-vida de cerca de 4 dias através de oxidação progressiva para 3-hidroxi-carbofuran e 3-keto-carbofuran.

### 1.2.3 Riscos e efeitos das intoxicações humanas pelo Carbofuran

O carbofuran é classificado como sendo extremamente perigoso para humanos pois algumas gotas de carbofuran líquido são potencialmente letais. Labchuk (1997) cita que não se pode entrar num campo de cultivo durante as 48 horas após a aplicação de 1,1 litros do produto por hectare.

A principal via de absorção é a dérmica, sendo esta via moderadamente tóxica. Porém, o carbofuran também pode penetrar no organismo pelas vias digestivas e respiratórias, sendo altamente tóxico por inalação. Os riscos de exposição são especialmente altos para pessoas com asma, diabete, doença cardiovascular, obstrução mecânica gastrointestinal ou urogenital. O contato com o carbofuran pode causar a queima da pele e dos olhos. É rapidamente metabolizado e excretado principalmente pela urina e aproximadamente 3% pelo leite materno, e não se acumulam em tecido mamífero. A duração do intervalo entre a exposição e o aparecimento de sinais e sintomas está

relacionada com a dose, podendo variar de alguns minutos a uma hora (Giust, 1978; Souza Cruz, 1993a).

A recuperação completa de um envenenamento é possível se a exposição cessa ou se a exposição não é contínua. Dessa forma a inibição da colinesterase se inverte rapidamente e a vítima tem tempo para retomar o nível normal de colinesterase. Em casos não fatais, a enfermidade dura geralmente menos de 24 horas, sendo que em caso de intoxicação moderada, a recuperação espontânea ocorre entre 1 a 4 horas. Em caso de morte, esta pode ser o resultado de uma parada respiratória.

Prolongando a exposição ao carbofuran, este pode causar os mesmos efeitos que na exposição aguda. De acordo com o EPA, que estabelece o nível de 40 ppb (parte por bilhão ou  $\mu\text{g/L}$ ) de carbofuran em água potável, uma pessoa pode beber água que contém carbofuran abaixo deste nível diariamente no curso de sua vida sem efeitos a saúde (EXTOXNET, 1993). Confirmando este dado, *Drinking Water and Health* (1997) cita que o efeito agudo com carbofuran em crianças acima de 7 anos que consomem 1L de água por dia surge com 0,05 mg/L (ou 50 ppb).

A investigação de um acidente pode conduzir ao diagnóstico mais rapidamente. O doseamento do teor de colinesterase sanguínea, por técnica que evite a reativação espontânea, poderá indicar o grau de intoxicação das pessoas expostas, sendo a Atropina o antídoto de emergência em caso de intoxicação (Gelmini et al., 1987; Galvão, s.d.). Os efeitos agudos causados pela inibição da colinesterase, podem ser: dor de cabeça, fraqueza, náuseas, tonturas e posteriormente, constrição das pupilas, tremores, salivação e transpiração excessivas, cólicas abdominais, diarreia e vômitos (Souza Cruz, 1993a, *Drinking Water and Health* 1997; Labchuk, 1997).

Pilinskaia et al. (1984), discute em seu trabalho a atividade citogenética do inseticida carbofuran e seus três principais metabólitos formados em organismos de mamíferos e no ambiente. Segundo o autor a substância inicial e dois produtos intermediários de sua biotransformação (3-hidroxi e 3-keto-carbofuran) induziram efeitos clastogênico na cultura de linfócitos humanos periferal *in vitro*. Em estudos realizados por EXTOXNET (1993), o carbofuran não apresentou risco de câncer para humanos e não

houve nenhuma evidência que o carbofuran tenha o potencial para causar câncer de exposições vitalícias ingerindo água.

#### 1.2.4 Toxicidade animal

Os inseticidas carbamatos são degradados no organismo animal por mecanismos oxidativos e hidrolíticos, sendo os metabólitos eliminados como compostos livres ou conjugados. Deste modo, a análise químico-toxicológica destes compostos pode ser efetiva caracterizando-se o produto puro, não metabolizado, ou os produtos resultantes da biotransformação (Larini, 1979).

O carbofuran teve uma das maiores toxidades relatadas para pássaros, comparado aos inseticidas registrados e em uso no Canadá. Os pássaros são atraídos pelo carbofuran granular por este se assemelhar a grãos, comendo-os quando expostos na superfície do solo por confundí-los com alimento. Predadores também são intoxicados ao se alimentarem de pássaros pequenos ou mamíferos que alimentam-se com grânulos de carbofuran, podendo ser citado o caso de falcões vermelhos, no Canadá que foram envenenados depois de se alimentarem de presas em campos tratados com este produto. O carbofuran é muito tóxico a faisões, galinhas, patos e codorna japonesa. Pode-se reduzir o perigo para a vida selvagem incorporando completamente as formulações granulares à terra (Palmer et al., 1992; EXTOWNET, 1993; Labchuk, 1997).

Em seus experimentos Osheim et al. (1985) relatam que treze cabeças de gado híbrido Brahman foram expostos ao carbofuran misturado com arroz, para o controle de pássaros. Três animais morreram dentro de 20 minutos após comer os grãos contaminados, e os outros dez, exibiram sinais clínicos associados com toxicidades por carbamatos. Os 4 animais mais seriamente afetados foram tratados com uma dose subterapêutica de sulfato de atropina; porém não responderam e vieram a falecer. Os 6 restantes se recuperaram. Amostras contendo rúmen dos animais que morreram continham concentrações de carbofuran variando em 2 a 51 mg/kg. Em outros estudos duas espécies de sapos, expostos dermicamente por absorção ventral durante 6 horas com carbofuran, mostraram que concentrações de carbofuran equivalendo aproximadamente a 1/20 da taxa

de aplicação de campo recomendada, causaram a perda dos reflexos em aproximadamente 50% dos animais. A depressão da colinesterase do cérebro foi analisada usando a técnica de Ellman modificada (Abstract Book: SETAC, 1996).

De acordo com FMC (1977), os valores encontrados em seus experimentos para toxicidade oral em ratos expressa como DL50 (mg/kg) e CL50 - 90 dias (mg/L/dia) foram 8-14 e > 80, respectivamente. EXTTOXNET (1993) apresenta a DL50 oral para ratos encontrada de 5 mg/kg e CL50 85 mg/L. A DL50 para camundongos foi de 2 mg/kg e para cães de 19 mg/kg. A dérmica para coelhos foi 885 mg/kg. A CL50 (4 horas) por inalação de carbofuran em porcos da guiné foi 43 mg/L e para cachorros CL50 igual a 52 mg/L. Os estudos registraram ainda a diminuição expressiva da sobrevivência de filhotes de ratos quando fêmeas grávidas foram alimentadas com doses diárias de 100 ppm de carbofuran.

Em um estudo subagudo apresentado por FMC (1977), não ocorreram mortes em ratos que se alimentaram de carbofuran. Em sua dieta a níveis tão altos quanto 1600 ppm (80 mg/kg/dia) por 90 dias. Um rato, entretanto, durante um período de 24 horas pode consumir uma quantidade de carbofuran pelo menos de 6 a 10 vezes maior que uma única dose oral DL50. Isto demonstra nitidamente da rapidez com que o carbofuran pode ser detoxificado por animais. Nestes mesmos estudos, somente uma pequena quantidade de produtos de hidrólises 7-fenol foi detectado na urina em forma livre, embora conjugados de 7-fenol fossem encontrados, comparativamente em grandes quantidades (FMC, 1977). A Tabela 1.3 apresenta a toxicidade dos metabólitos do carbofuran, expressa como DL 50 (oral) aguda para ratos (mg/kg).

A mais baixa quantidade de carbofuran que provocou teratogenicidade em dietas de fêmeas de rato ao longo de sua gravidez foi 210 µg/kg, sendo que esta mesma dose pode ser teratogênico também à rãs. Nenhum efeito mutagênico foi detectado em animais ou bactérias (usando o teste de Ames), mas foram encontradas mudanças genéticas em algas (EXTTOXNET, 1993). De acordo com FMC (1977), o carbofuran e todos os seus metabólitos são relativamente solúveis em água e relativamente insolúveis em solventes hidrocarbonetos não polar. Por esta razão, o carbofuran, virtualmente não tem potencial para bioacumulação ou biomagnificação no ambiente. FMC apresenta ainda que trutas, que foram continuamente expostas a carbofuran radiomarcados a níveis de 0,02 ppm a 0,1

ppm por 28 dias, permaneceram sadias durante todo o período de exposição. O carbofuran pareceu ser completamente convertido em metabólitos solúveis em água, e quando o peixe foi transferido para água limpa, sua radioatividade diminuiu a um limite não detectável dentro de 14 dias; a eliminação dos resíduos foi rápida e completa.

Tabela 1.3 Toxicidade dos Metabólitos do Carbofuran para ratos.

Químico (nome comum)	DL50 (oral) aguda para ratos (mg/kg)
Carbofuran	8 a 14
3-hidroxicarbofuran	18
3-ketocarbofuran	69
3-keto-7-fenol	295
3-hidroxi-7-fenol	1350
7-fenol	2200

Fonte: FMC (1977).

Em seus experimentos Brown et al. (1975) mostram que o carbofuran não possui efeitos deletérios em populações de bactérias ambientais estuarinas sob condições normais, também não havendo nenhuma evidência de bioacumulação. Resíduos de carbofuran não foram detectados em nenhuma amostragem em zooplâncton ou truta, em um ecossistema de lagoa tratada com o inseticida. Também não foram detectados em lagartas, caranguejo de água doce ou rãs, quando 5 mg do carbofuran carbono-marcado foram aplicados em ecossistema aquático de laboratório. Somente baixas quantidades residuais do carbofuran foram detectados em larvas de mosquitos e peixes (*Gambusia*) em um modelo de ecossistema tratado com o inseticida (Horward, 1989). Saxena et al. (1987), desenvolveram estudos sobre os efeitos de concentrações do carbofuran em *Channa punctatus*, na fase de desova do ciclo de reprodução anual. Quando expostos ao carbofuran, apresentaram uma demora na formação de espermátides e espermatozoides de 90 dias, em comparação com 60 dias do peixe controle. A exposição dos peixes durante 120

dias, resultou na necrose das espermatogônias e espermatócitos conduzindo a perda gradual destes.

Mukhopadhyay et al. (1982), em seus estudos observaram mudanças bioquímicas na respiração do bagre (*Mytus vittatus*), exposto a um nível subletal de carbofuran a uma concentração de 0,5 ppm em ambiente aquoso por um período de 30 dias. Quando exposto a uma concentração de 0,05 ppm durante 60 dias, uma pequena redução na taxa de crescimento foi observada, apesar de não haver mortalidade ou qualquer sintoma aparente de toxicidade. A exposição ao carbofuran resultou numa falsa inibição da atividade acetilcolinesterase no cérebro do peixe, o qual recuperou-se rapidamente após o término do tratamento com o pesticida, e sua transferência para água limpa. A proporção dos níveis de cálcio/fósforo no soro mostrou significativa diminuição em grupos experimentais comparados com o controle. O carbofuran foi metabolizado a 3-hidroxi-carbofuran tanto no peixe como em plantas e solos. Estudos anteriores realizados por Mukhopadhyay et al (1982), indicaram a acumulação do carbofuran nos testes em quantias de rastro apenas; induziu necrose visível na estrutura testicular com dano morfológico distinto e desintegração das paredes dos túbulos seminíferos, que resulta possivelmente em atividade celular espermatogênica degenerativa. Parrish et al. (1977) trabalharam com *Cyprinodon variegatus*, expostos ao pesticida carbofuran em fluxo de água marinha, determinando a mortalidade de peixes adultos expostos a concentrações maiores que 49 µg/L. Horward (1989) cita que um lago hidrelétrico foi amostrado entre 1981 e 1983 por receber carbofuran. O carbofuran não foi detectado nos peixes (limite de detecção de 200 ppb ou µg/L), mas um grupo de carpas analisadas continham 310 ppb de um composto químico que pode ter sido o carbofuran, isto baseado na observação do resíduo obtido da análise do peixe em cromatografia gasosa.

EXTOXNET (1992) apresenta a Dose Letal (96 horas) para peixes igual a 150 µg/L. Palmer et al. (1992) citam a CL50 (96 horas) para peixes na faixa de 0,1 a 1,0 µg/L, ao passo que PMEP (1984) apresenta a toxicidade aguda (CL50) na faixa de 94 a 2859 µg/L. Rollings et al. (1997), citam a alta toxicidade do carbofuran e apresentaram a CL-96 horas para peixes na faixa de 100 a 1000 µg/L e Bayer (1998) cita a CL50-96 horas para peixes igual a 240 µg/L. Ronday et al. (1997) em ensaios com *Daphnia sp.*, encontraram uma CE50 (48 horas) igual a 15 µg/L.

As discrepâncias entre os resultados encontrados para peixes, podem ser devido as diferentes espécies utilizadas nos testes, bem como as metodologias utilizadas pelos autores.

### **1.3 Importância dos testes de toxicidade**

#### **1.3.1 Generalidades**

A toxicologia nos programas de controle de poluição das águas utiliza testes de toxicidade denominados bioensaios, definidos como testes nos quais a quantidade de um agente tóxico ou efeito tóxico por ele produzido é determinado pela ação sobre um organismo vivo. Os bioensaios são conduzidos para avaliar a toxicidade de efluentes ou outros materiais, determinar taxas toleráveis de descargas de efluentes, estabelecer a sensibilidade relativa de várias espécies de organismos e identificar efeitos das variáveis físicas e químicas, tais como temperatura e pH, sobre a toxicidade. Podem também ser usados para julgar a conformidade com padrões da qualidade da água estabelecidos pelas autoridades de controle de poluição da água (Golstein et al., 1981; Chomenko, 1988). Existe uma variedade de testes de toxicidade, já bem estabelecidos, sendo que alguns se encontram padronizados a nível nacional e internacional por associações ou organizações de normalização, como: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Works Association (AWWA), Deutsches Institut für Normung (DIN) e International Organization for Standardization (ISO) (CETESB, 1988).

De maneira geral, pode-se utilizar testes para distinguir os efeitos agudos e crônicos, pela exposição a curto prazo a agentes tóxicos presentes na água e à possibilidade que oferecem de extrapolar os resultados para situações reais. O teste de toxicidade evidencia uma situação, mas não identifica a causa. A avaliação de toxicidade através da Concentração Letal Média (CL50) - 24 horas constitui uma primeira tentativa de alertar para um problema ambiental importante, que é a introdução de substâncias tóxicas nos corpos d'água. Trata-se de um teste destinado a detectar substâncias em

concentrações elevadas o suficiente para causar um efeito letal sobre os organismos. Ensaio subletais ou crônicos são, por sua vez, realizados com a finalidade de estudar o efeito das várias concentrações de substâncias tóxicas, principalmente sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos. Pelo fato de expressarem efeitos outros que não a letalidade, os resultados obtidos em testes a longo prazo permitem estimar com maior precisão as concentrações seguras para os organismos aquáticos (Golstein et al., 1981; CETESB, 1987; Chomenko, 1988; Santojanni et al., 1995).

### 1.3.2 Variáveis físicas e químicas em testes de toxicidade

As águas utilizadas em testes de toxicidade e a manutenção dos organismos devem ser adequadas, sendo que qualquer interferência pode causar alterações nas características físicas e químicas da água, interferindo assim na confiabilidade dos testes.

O **oxigênio** é o gás mais abundante na água depois do nitrogênio e também o mais importante, já que muitos organismos aquáticos não poderiam viver sem ele. Quando os níveis de oxigênio dissolvido (OD) se encontram muito baixos nos tanques de cultivo, os organismos cultivados podem estressar-se e até mesmo morrer. A concentração do oxigênio expressa-se tanto em partes por milhão (ppm ou mg/L), como em percentagem de saturação (Arana, 1997).

O **pH** é um parâmetro muito especial nos ambientes aquáticos, podendo ser a causa de muitos fenômenos químicos e biológicos. Possui um profundo efeito sobre o metabolismo e processos fisiológicos de todos os organismos aquáticos. Tem-se relatado que os valores de pH 4 e pH 11 são condições letais. As águas que compreendem a faixa de 6,5 a 9,0 são as mais adequadas para a produção de peixes. Já valores inferiores a 6,5 diminuem os processos produtivos. O pH possui uma estreita interdependência com as comunidades vegetais, animais e o meio aquático. Isto porque as comunidades aquáticas interferem no pH, assim como o pH interfere de diferentes maneiras no metabolismo destas comunidades. A respeito das comunidades, o pH atua diretamente nos processos de



permeabilidade da membrana celular dos organismos integrantes, interferindo, então, no transporte iônico intra e extracelular, bem como entre organismos e o meio (Arana, 1997).

O termo **dureza** é freqüentemente utilizado para caracterizar a qualidade de um determinado tipo de água. A dureza da água é determinada pelo conteúdo de sais de cálcio e magnésio, estreitamente ligados com íons carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (dureza temporal), e com íons sulfato, cloretos e outros ânions de acidez mineral (dureza permanente). Desempenha um papel importantíssimo sobre organismos aquáticos e os demais parâmetros químicos, sobre o crescimento e mineralização do exoesqueleto de organismos juvenis. (Standard Methods, 1995; Arana, 1997).

A **temperatura** é um parâmetro físico comumente observado devido à facilidade com que pode ser registrado. É um dos principais limitantes numa grande variedade de processos biológicos, desde a velocidade de simples reações químicas até a distribuição ecológica de uma espécie animal. Peixes e microcrustáceos são animais pecilotérmicos, e a temperatura de seu sangue não está internamente regulada. Em vista disto, a temperatura ambiente tem um profundo efeito sobre o crescimento, a taxa de alimentação e o metabolismo destes animais. Os animais pecilotérmicos encontram-se subordinados ao seu meio ambiente, já que sua atividade e sobrevivência estão permanentemente sujeitas à temperatura prevalecente. A temperatura de um peixe está sempre próxima mas nunca abaixo da temperatura da água, pois apresenta perda de calor por evaporação. Por outro lado, geralmente, é impossível excedê-la, a não ser por pequenos intervalos de tempo, devido ao fato de que a circulação sangüínea nas brânquias constitui uma forma altamente eficaz de equilíbrio térmico entre o sangue e a água circundante. Os invertebrados aquáticos e os peixes apresentam uma zona restrita de tolerância térmica (a nível de espécie) e temperaturas letais características, que podem ser variadas por meio de aclimação experimental ou pela adaptação a longo prazo a "habitats" com diferentes limites térmicos. Os peixes de águas de climas tropicais possuem uma faixa de tolerância que vai de 25 a 35°C. Os efeitos biológicos das variações de temperatura são complexos por se encontrarem em dependência com outras numerosas variáveis. A magnitude destas variações afeta, desde pouco até muito, a reprodução, o crescimento e a sobrevivência (Arana, 1997).

A **condutividade**, em laboratório é usada para estabelecer o grau de mineralização e o efeito da concentração de íons em equilíbrio químico, efeito fisiológico em plantas ou animais, taxas de corrosão etc. A condutividade de uma solução aquosa, a uma determinada temperatura, é a medida da sua habilidade em transmitir corrente elétrica. A água possui um potencial de ionização baixo e portanto pequenas quantidades de soluções nela dissolvidas, como ácidos inorgânicos, bases e sais, provocam um incremento na sua condutividade. Por outro lado, soluções pouco ionizáveis como aquelas formadas por compostos orgânicos, ditas más condutoras, apresentam baixa condutividade (Standard Methods, 1995).

### **1.3.3 Organismos utilizados em testes de toxicidade**

Para os testes de toxicidade em organismos aquáticos recomenda-se utilizar, sempre que possível, pelo menos três espécies de organismos aquáticos (algas, microcrustáceos e peixes) representativos dos diferentes níveis tróficos (CETESB, 1988). Estes testes vêm sendo utilizados com grande freqüência no controle da poluição ambiental, mostrando alta sensibilidade e reprodutividade quando utilizados elementos biológicos adequados (Matias et al., 1992). Os seres mais freqüentemente utilizados nos bioensaios, em geral, dentre os animais, são os peixes cujos sintomas de intoxicação e sofrimento são de muito fácil observação (Lima, 1985).

#### **1.3.3.1 Peixes**

*“Os peixes constituem um barômetro muito útil do estado real de pureza de um corpo d'água. Nenhuma massa pode ser considerada em condições satisfatórias, se nela não viverem e proliferarem peixes”* (Mucci et al., 1987). O peixe da espécie *Poecilia reticulata*, conhecido pelos nomes comuns: gupi fantasia, peixe de milhões, barrigudinho, sarapintado, bandeirinha ou lebiste, é originado na América Central, e encontrado em

Trinidad, Venezuela, Brasil, Guianas, Ilhas Barbados, América do Norte e Caribe (Dugatkin, 1996; Club-Fish-Livebearers, s.d.; Dr. Pez, 1997). Pertencente a Superclasse: peixes; Classe: Osteichthyes; Ordem: Microcyprini; Família: Poeciliidae; Gênero: *Poecilia* -Bloch y Schneider, 1801 e Espécie: *reticulata* Peters, 1859. Existem numerosas formas selvagens e domésticas, são pequenos e ativos, vivendo em constante movimento, robustos, vivem em grupos muito dispersos, possuem compatibilidade muito simples, são calmos, amigáveis e convivem facilmente com outros peixes vivíparos. São peixes de água doce que toleram muitas condições de água, gostam de águas correntes ou quietas. As condições da água devem variar em pH 6.8 a 7.2 e a temperatura da água de 20 a 24 °C. O tanque de cultivo deve ser preparado com bastante vegetação, como plantas flutuantes e outras plantas (Dugatkin, 1996; Club-Fish-Livebearers, s. d.; Dr. Pez, 1997).

A boa qualidade de água é recompensada com alta fertilidade, sua reprodução é ovovivípara, e são tão prolíficos que um par pode preencher um aquário em pouco tempo com sua descendência. Esta espécie tem um grande número de variedades, no continente e nas ilhas. O gupi ao natural não é tão grande e colorido quanto os cultivados em laboratório, quando criados desenvolvem uma multidões de cores de barbatanas (Dugatkin, 1996; Aquaria Central, 1997; Gómez, 1998).

As diferenças sexuais são muito aparentes; possuem diferença na cor e no tamanho. Os machos medem uns 3 centímetros de comprimento e a fêmea uns 6, possuem boca oblíqua, pedúnculo caudal alto e comprido lateralmente. Os machos das formas originais são pintados, com manchas negras dispostas irregularmente entre as laterais mostrando suas irrijações roxas, azuladas e verdes; as fêmeas geralmente são de cores opacas, pardas ou amarelas. A taxa de macho/fêmeas é de 1 para 3 e a expectativa de vida é de aproximadamente de 2 a 3 anos e a maturidade é em torno de 6 meses. As fêmeas adquirem ao chegar a maturidade uma mancha denominada mancha de gravidez que é uma área escura atrás da barbatana anal, posterior a barriga. A aleta anal (nadadeira caudal) do macho se transforma em um órgão copulador (gonopódio) e a nadadeira anal da fêmea é normal. O esperma é preservado no oviduto da fêmea (Dugatkin, 1996; Club-Fish-Livebearers, s.d.; Dr. Pez, 1997; Aquaria Central, 1997; Aquários – Descrição dos peixes, s.d.; Gómez, 1998). O melhor é manter as fêmeas longe dos machos quando atingirem a maturidade sexual, para se evitar cruzamentos não desejados. A gestação dura em média 1

mês, podendo durar mais tempo dependendo do tempo do ano, saúde da fêmea e condições no tanque. As fêmeas produzem cerca de 2 a 100 filhotes a cada 4 ou 5 semanas e não existe nenhum cuidado parental. Os jovens são freqüentemente devorados pelos pais e esforçam-se para sobreviver entre a vegetação. O tanque deve conter plantas flutuantes para que os recém - nascidos possam se esconder, pois até mesmo a mãe os comerá. Perturbando uma fêmea grávida pode resultar em nascimentos prematuros e a taxa de desenvolvimento depende da quantidade de alimento e espaço disponível (Laurel Lake, 1996; Carta online, 1998; Moore, s.d.; Aquaria Central, 1997; Aquários – Descrição dos peixes, s.d.; Gómez, 1998). Se alimentam de flocos para peixes e comidas vivas pequenas; são estimados para controle de mosquitos e como comida viva para outros peixes (Dugatkin, 1996; Aquaria Central, 1997).

### 1.3.3.2 Microcrustáceos (daphnias)

*“Os microcrustáceos, de uma forma geral, desempenham um papel importante na cadeia alimentar, pois alimentam-se de algas e servem de alimento para consumidores secundários, como peixes e outros vertebrados. Assim mudanças na população e no comportamento destes organismos podem interferir nos outros níveis tróficos do ecossistema aquático”* (Araújo et al., s. d.).

O gênero *Daphnia*, também conhecida como “pulga d’água” é um microcrustáceo facilmente encontrado em lagos e represas de águas continentais. São facilmente cultivadas em laboratório, possibilitando assim a obtenção de populações homogêneas, com sensibilidade bastante para uso em teste de toxicidade (Zagatto, 1988; Araújo et al., s.d.). As daphnias medem aproximadamente de 0,5 a 5,0 mm de comprimento e possuem uma carapaça transparente bivalve, exceto a cabeça e antenas (Figura 1.5). A alimentação é basicamente de algas, bactérias, protozoários e detritos orgânicos, os quais são capturados por processo de filtração efetuado pelas suas patas torácicas, que agem como peneiras para selecionar matérias presentes na água. O alimento é transferido para a boca onde é triturado pela mandíbula e levado ao intestino, para digestão, sendo que o tempo de retenção do alimento no organismo é de ½ a 3 horas. Uma *Daphnia magna* Straus, 1820,

é capaz de filtrar cerca de 85 ml de água em 24 horas e uma dúzia dessa espécie filtra aproximadamente 1 litro de água por dia. Seu sistema enzimático é complexo, permitindo, portanto, a assimilação e a digestão da matéria orgânica sob diferentes formas (Buikema et al., 1977; Zagatto, 1988; Araújo et al., s.d.).

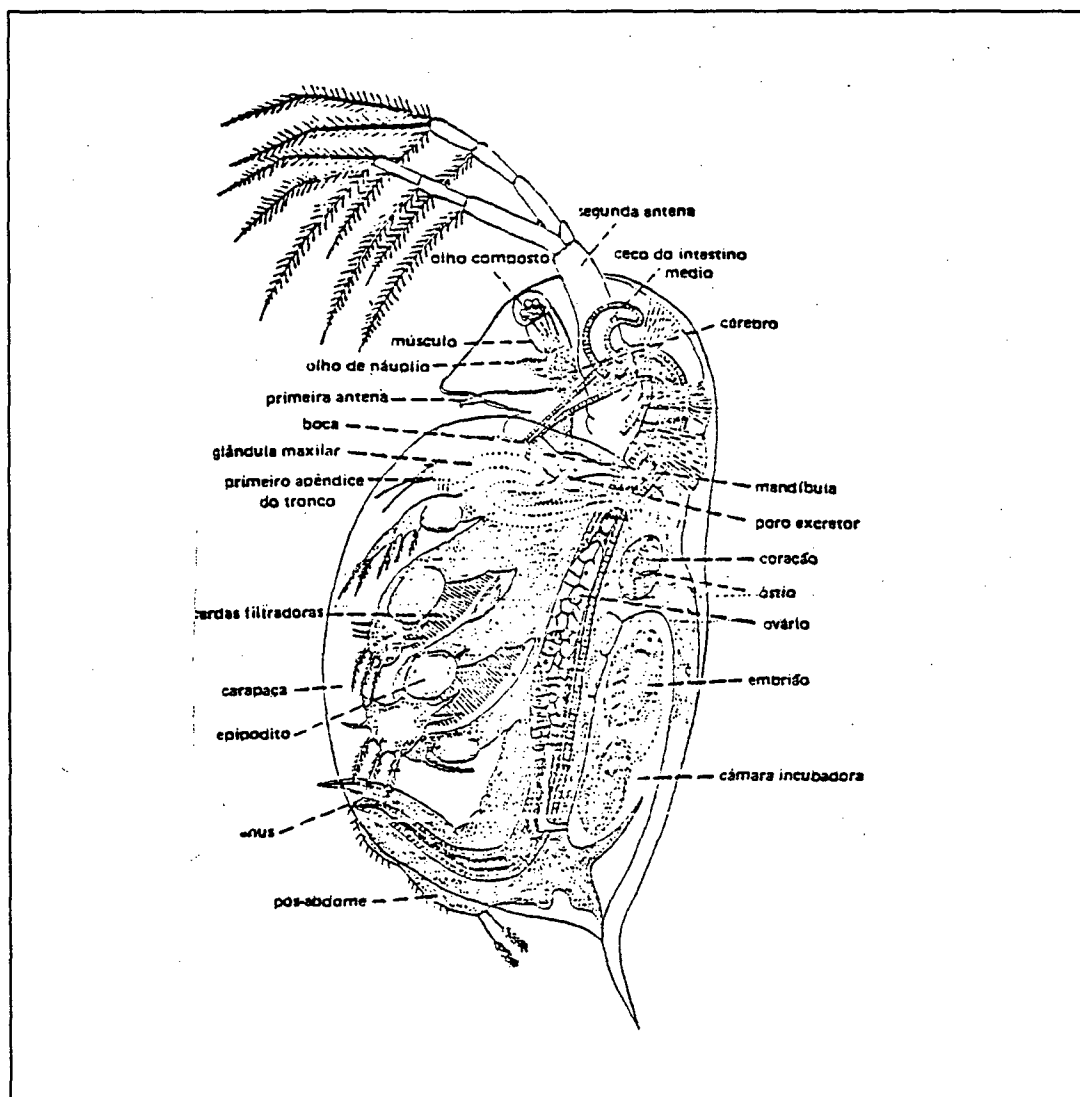


Figura 1.5 Anatomia de uma *Daphnia* sp. (Araújo et al., s.d.).

Sua reprodução em condições normais ocorre por partenogênese, isto é, assexuadamente, onde fêmeas produzem células diplóides que originam fêmeas com o

mesmo genótipo, resultando, portanto, numa população de daphnias composta inteiramente por fêmeas (Figura 1.6).

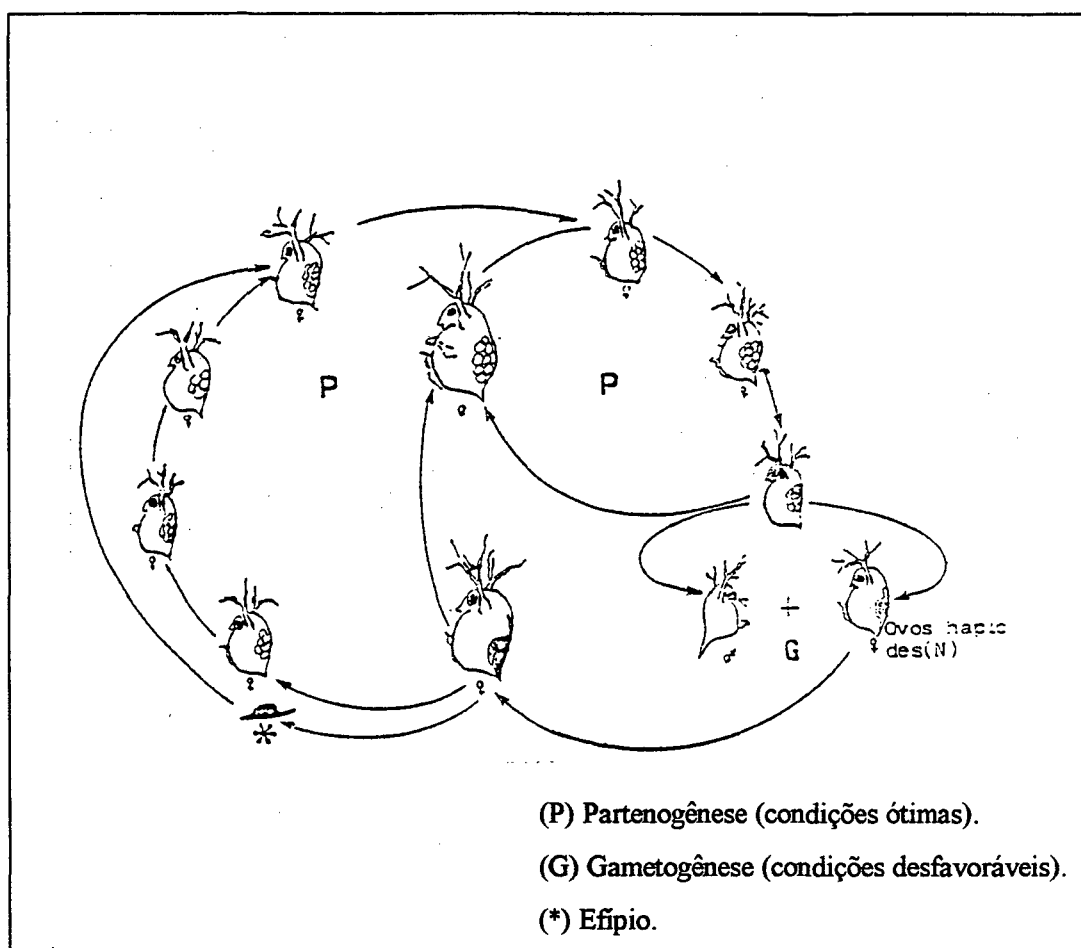


Figura 1.6 Ciclo de reprodução da *Daphnia* sp. (Araújo et al., s. d.).

Os ovos são incubados na câmara embrionária, após 3 a 4 dias dá-se o nascimento e após 5 a 9 dias se tornam adultas. Porém, quando as condições se tornam desfavoráveis, como superpopulação, falta de alimento, mudanças de temperatura etc., surgem machos e fêmeas com óvulos constituídos de células haplóides. Com a presença de machos, a reprodução passa a ser sexuada, esses óvulos são fecundados, e posteriormente recobertos com uma carapaça quitinosa escura, denominada “efípio” (Figura 1.7).

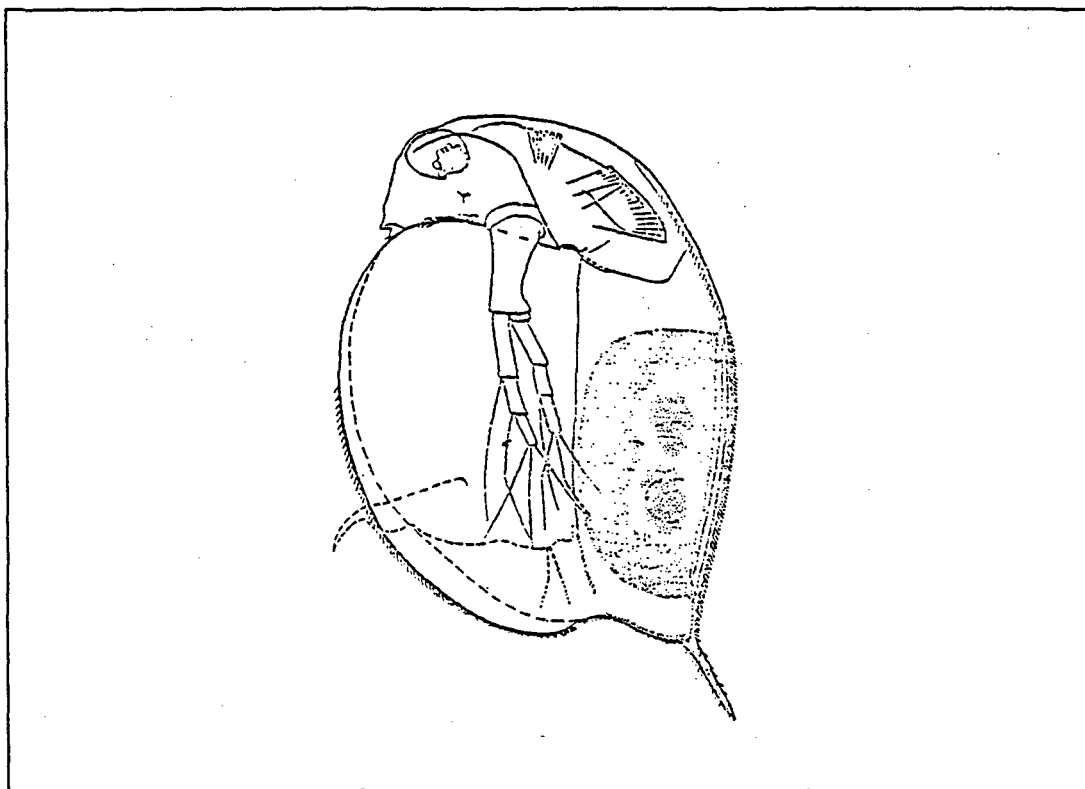


Figura 1.7 *Daphnia* sp. com efípio (Araújo et al., s. d.).

Esses efípios são liberados para o ambiente e são altamente resistentes às condições ambientais adversas. Quando essas condições tornam-se favoráveis, os efípios eclodem dando origem a novas fêmeas, reiniciando um novo ciclo partenogênico. Culturas com dois ou mais efípios devem ser descartadas (Buikema et al., 1977; Zagatto, 1988, Araújo et al., s.d.).

## CAPÍTULO II

### 2 MATERIAIS E MÉTODOS

A toxicidade do carbofuran foi avaliada no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, através de testes de toxicidade aguda, pelo método de ensaio com peixes (*Poecilia reticulata* Peters, 1859) e microcrustáceos (*Daphnia magna* Straus, 1820), utilizando as metodologias prescritas pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (Brasil) (1986, 1987) e DIN Deutsches Institut Für Normung (Alemanha) (1989), com adaptações para as condições locais.

#### 2.1 Teste de toxicidade aguda com peixes

##### 2.1.1 Captura e adaptação dos organismos para testes de toxicidade

Para os ensaios de toxicidade foram utilizados lotes de peixes coletados no lago do Centro de Convivência da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Figura 2.1). Esta espécie de peixe (Figura 2.2) foi escolhida por ser representativa da região estudada, além de usualmente recomendada para ensaios de toxicidade CETESB (1987). O lago não apresenta compostos tóxicos que possam alterar o metabolismo dos reativos biológicos que ali vivem.





Figura 2.1 Lago do Centro de Convivência, local da captura dos peixes.

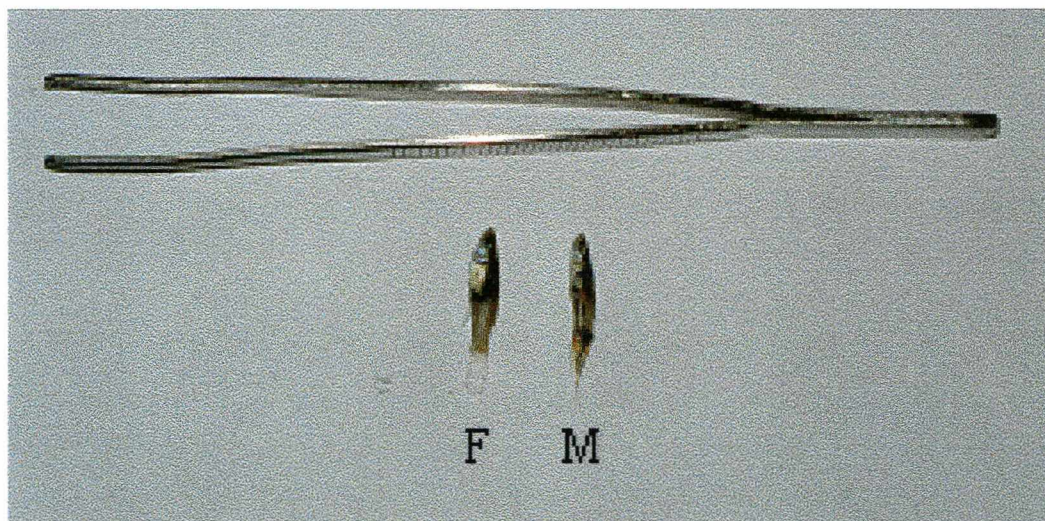


Figura 2.2 *Poecilia reticulata*. (F) Fêmea, (M) Macho.

A captura dos peixes foi efetuada com redes de *nylon* de malha de 1/4", os quais foram acondicionados em um balde plástico contendo água do próprio lago, para o transporte. Um reservatório de cimento amianto (R1), instalado na área externa do

Laboratório de Experimentação em Engenharia Ambiental - LEEA, do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, foi utilizado para reprodução e na primeira fase de adaptação (Figura 2.3).



Figura 2.3 Reservatório (R1), com capacidade para 250 L.

A água do recipiente de transporte (balde) foi substituída gradativamente pela água contida no reservatório, durante um período de 24 horas, após o que, os peixes foram introduzidos no reservatório (R1). Preparou-se o reservatório (R1), capacidade para 250 L (Figura 2.3), adicionando-se água tratada da CASAN - Companhia Catarinense de Água e Saneamento, até 2/3 do volume. Esta ficou sujeita as condições ambientais para descloração por um período de 15 dias, durante o qual ocorreu a substituição de uma parte desta água pela água da chuva. Após este período, foram introduzidos aguapés e realizada a povoação com peixes. Os cuidados para manutenção das condições estabelecidas neste sistema foram realizados semanalmente, por meio de retirada do excesso de água, remoção de corpos estranhos e aguapés mortos.

Na alimentação dos organismos, realizada diariamente, utilizou-se flocos para peixes e larvas de insetos do ambiente. Após 15 dias de adaptação retirou-se o primeiro lote de peixes, o qual foi transferido para o Laboratório de Toxicologia Ambiental. Este

lote foi introduzido em um recipiente de vidro (R2) com capacidade para 60 L. Antes porém, durante 24 horas, a água do recipiente de transporte, contendo os peixes, foi sendo substituída aos poucos pela água contida no R2 (Figura 2.4).

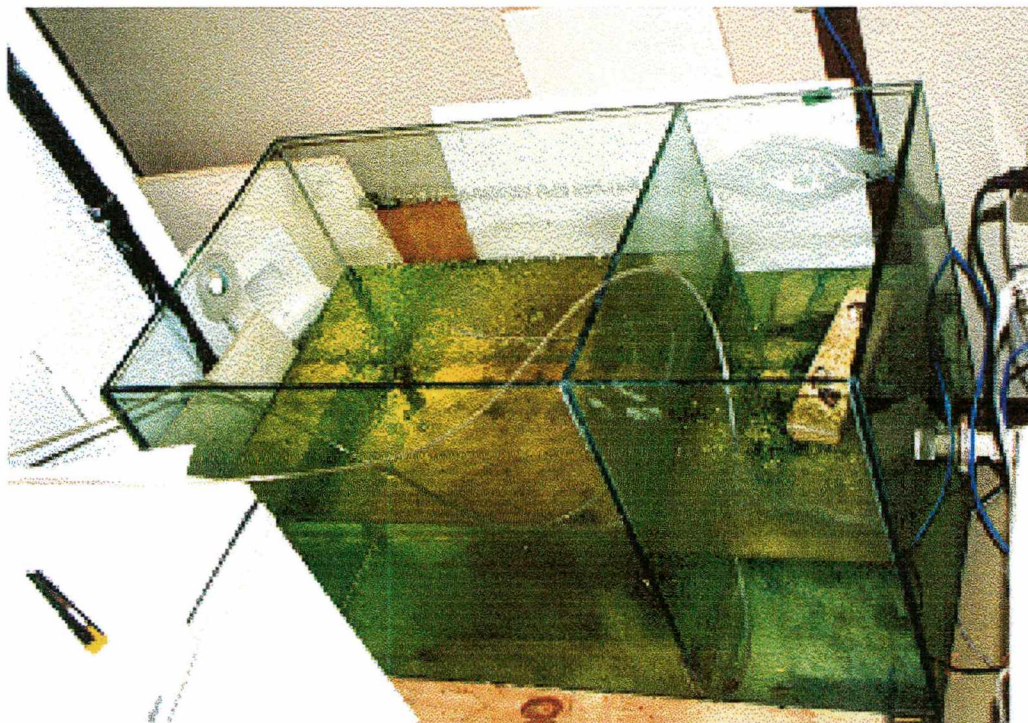


Figura 2.4 Reservatório R2 com capacidade para 60 L.

O recipiente R2 continha água da CASAN aerada por aerador de aquários, durante 48 horas, no mínimo, para descloração e em seguida tratada com antifúngos e bactericidas. Foi controlado e mantido a uma temperatura na faixa de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH em  $7.4 \pm 2$ , sendo a limpeza realizada diariamente. Os peixes permaneceram neste ambiente, sob aeração constante, durante uma semana, sendo a seguir transferidos para um terceiro recipiente de adaptação (RA) (Figura 2.5) contendo água de diluição (Apêndice A).

O recipiente RA de 30 L foi montado contendo água da CASAN e água de diluição, na proporção de 1 para 2, respectivamente; filtro e aerador para aquário. Sendo a água da CASAN previamente aerada para descloração e tratada com antifúngos e bactericidas; com controle diário de temperatura e pH. Os peixes foram colocados em adaptação neste aquário por um período aproximadamente de 3-4 dias, sendo depois

transferidos diretamente para um quarto recipiente de adaptação (RB) (Figura 2.5) com capacidade para 30 L, contendo 100% de água de diluição, montado com aerador e filtro para aquário. Os peixes foram mantidos em aclimatação neste recipiente, por no mínimo 48 horas antes de iniciados os testes. Os organismos adaptados mostraram sinais vitais (mobilidade, alimentação, coloração etc) positivos, credenciando-os para os bioensaios.

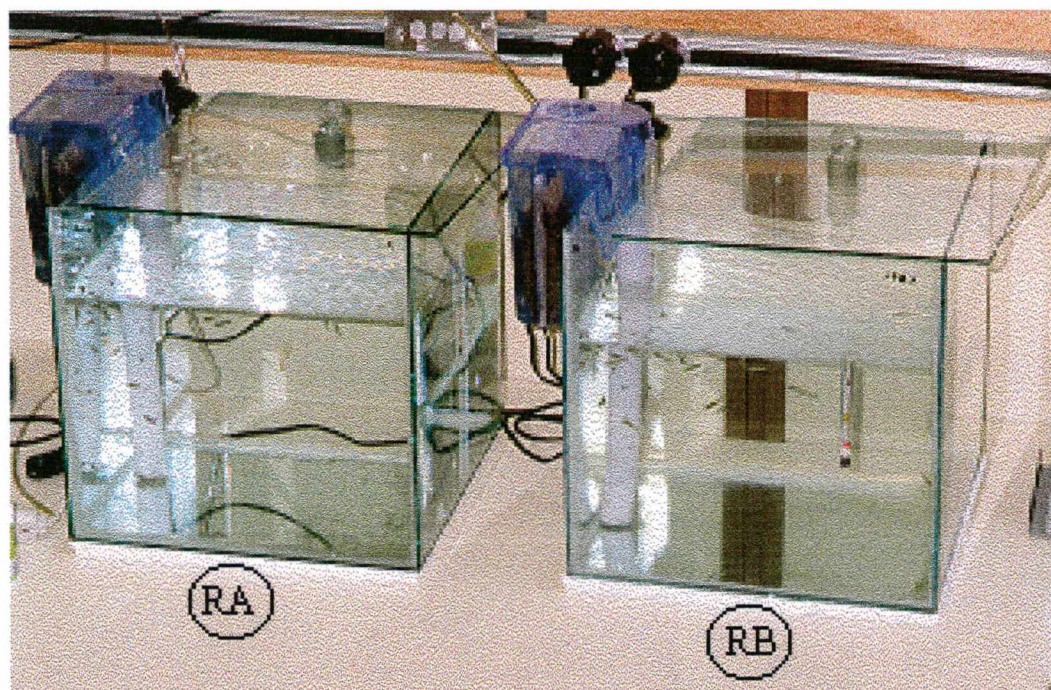


Figura 2.5 Recipientes RA e RB.

Antes de iniciados os testes, foram retiradas amostras dos lotes para que os peixes pudessem ser pesados e medidos, tomando-se o cuidado de conhecer o seu peso médio para que a massa total dos organismos não ultrapassasse 1,0 g/L de solução-teste, de acordo com as recomendações da CETESB (1987). Após o término dos ensaios, os peixes utilizados nos testes também foram pesados e medidos para confirmação da massa/volume utilizada.

A Figura 2.6, apresenta esquematicamente o período total de transferência e aclimatação dos peixes dos reservatórios.

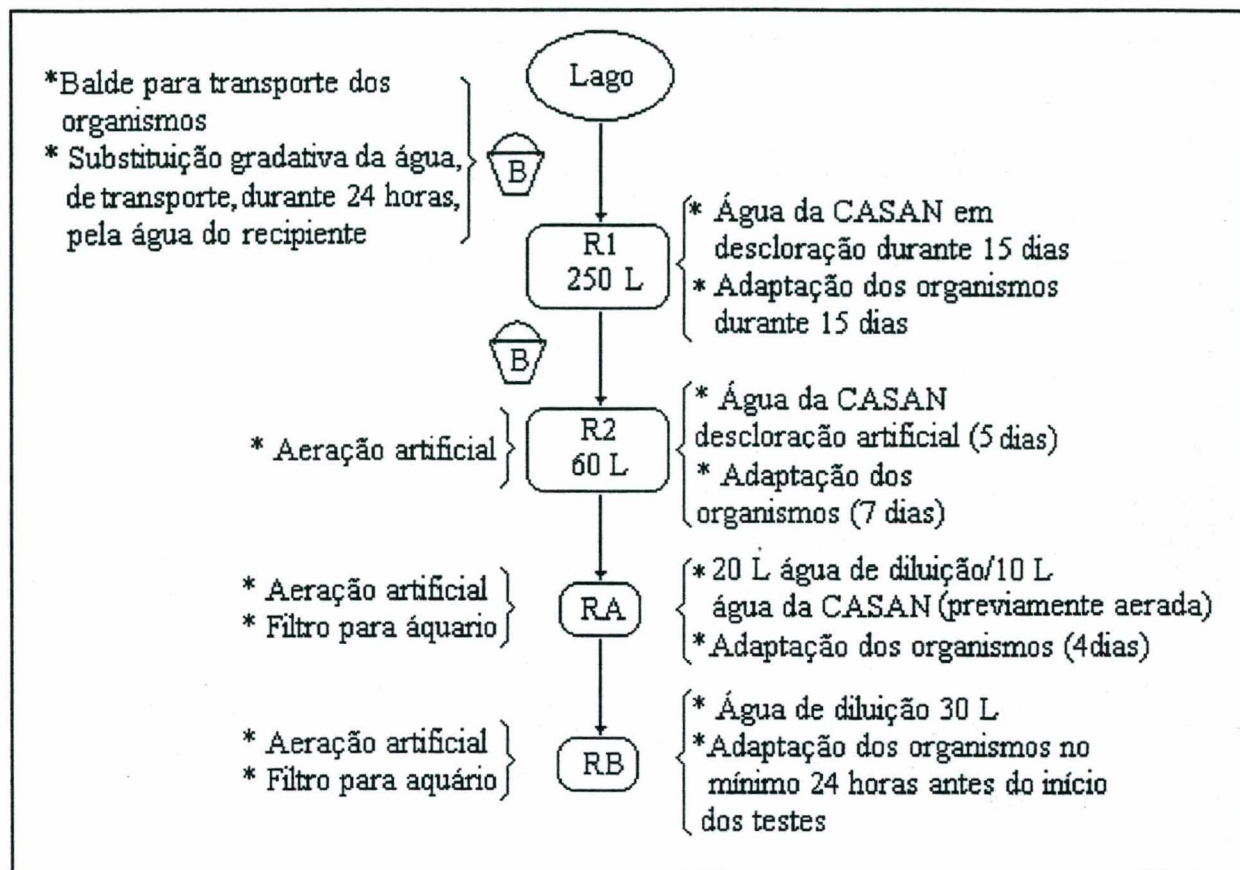


Figura 2.6 Fluxograma do procedimento de transporte e adaptação dos organismos.

### 2.1.2 Desenvolvimento do método

O teste de toxicidade aguda - sistema estático, consistiu na exposição dos organismos a várias concentrações do carbofuran em duas etapas. A primeira consistiu no teste preliminar, que permitiu estabelecer o intervalo de concentrações utilizado no teste definitivo; e a segunda, teste definitivo, que determinou a Concentração Letal Média - CL50; por um período de 48h (CETESB, 1987).

A alimentação dos organismos-teste (*Poecilia reticulata*), foi interrompida 24 horas antes do início dos ensaios e aqueles com mal-formações ou doentes foram descartados.

### 2.1.3 Sensibilidade dos organismos-teste

Antes de iniciados os testes, foram feitas avaliações da sensibilidade dos lotes dos peixes coletados, através da determinação da Concentração Letal Inicial Média - CL(I)50; 24 h, nas condições prescritas pela Norma da CETESB (1987), com o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), como substância de referência.

Os testes foram feitos em aquários com capacidade para 2000 mL (Figura 2.7), mantidos em banho-maria para controle de temperatura.

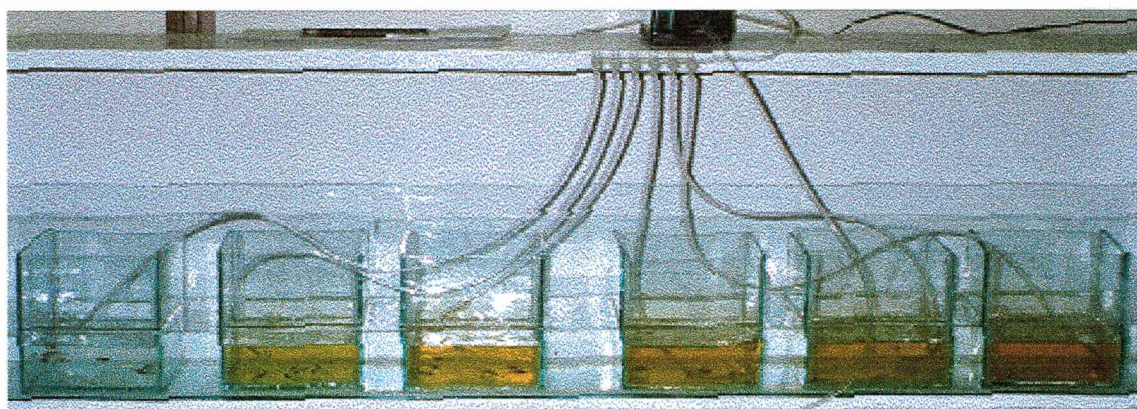


Figura 2.7 Teste de sensibilidade dos organismos com dicromato de potássio.

Este teste constou de 8 ensaios com 5 diluições (56; 110; 320; 480; 800 mg/L) diferentes da substância de referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) além do controle com água de diluição por ensaio. Foram controlados os parâmetros: condutividade ( $\mu S/cm$ ), temperatura ( $^{\circ}C$ ), pH e Oxigênio Dissolvido (O.D.) em mg/L. Em cada diluição foram utilizados 5 peixes conforme recomendado pela CETESB, os quais ficaram sob observação no período de 3h, 6h e 24h da duração do teste, no qual foi anotado o comportamento anormal e retirados os peixes mortos através de sifonamento com tubo de vidro.

#### 2.1.4 Preparo da solução-teste

Para o preparo da solução teste utilizou-se o produto comercial Furadan<sup>®</sup> granular da HOKKO do Brasil, no qual, analisou-se o percentual do agente ativo em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência - HPLC da Hewlett Packard<sup>®</sup> -HP, modelo 1050 presente, associado a um detector fluorescente, equipado com coluna analítica C18 de 15 cm . A fase móvel foi composta de 18% de metanol/ 82% de água ultra-pura.

Para estas análises foram utilizadas amostras de Furadan preparadas em concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L.

Na análise por cromatografia líquida foi empregada primeiramente uma amostra pura de carbofuran como padrão, identificando o tempo de retenção deste composto na coluna e as respectivas áreas referentes as diferentes concentrações injetadas. As concentrações de carbofuran presentes nas amostras preparadas com Furadan foram obtidas via software instalado no computador o qual recebeu as informações do cromatógrafo, imediatamente após a detecção do composto. Este programa calcula as interações das áreas de pico referente ao composto, identificado por comparação com as análises do padrão

#### 2.1.5 Teste Preliminar

A solução-mãe de carbofuran foi preparada com água de diluição, utilizando-se balões de vidro de 2000 mL. O carbofuran granular foi pesado em balança de precisão Libor AEG - 120 G - Shimadzu, e dissolvido em 0,5 mL de álcool etílico (grau pesticida).

O teste preliminar constou de seis ensaios, sendo que no primeiro teste foram utilizadas as concentrações de 28 e 550 µg/L e nos outros cinco testes as concentrações variaram de 110 a 510 µg/L. As soluções-teste foram preparadas a partir da solução mãe do agente carbofuran, em balões de vidro de 1000 mL e colocadas nos aquários-teste (com capacidade para 2000 mL), tendo sido também utilizado um aquário-teste contendo

somente água de diluição (controle). Os aquários foram mantidos durante os testes em banho-maria a temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , com aeração constante por um período de 48 horas.

Foram colocados dez peixes em cada aquário contendo a solução-teste e também no controle, sendo que a massa total dos organismos não ultrapassou a 1.0 grama por litro de solução-teste. Os registros de temperatura, pH, condutividade e dureza total foram efetuadas no início do ensaio. Os peixes foram observados no período de 3h, 6h, 24h e 48, no qual foi anotado o número de mortos e o comportamento anormal. Os peixes mortos foram retirados por sifonamento com tubo de vidro.

#### **2.1.6 Teste Definitivo**

Baseado nos testes preliminares, foram selecionadas cinco concentrações para serem utilizadas nos testes definitivos. A seleção destas concentrações, orientada pelo intervalo de concentrações, definido no teste preliminar, foi delimitado pela menor concentração na qual se observou mortalidade de 100% dos organismos e pela concentração mais elevada na qual não se observou mortalidade dos organismos.

As soluções-teste e os aquários teste foram preparadas conforme descrito no item 2.1.5. Foram colocados dez peixes em cada solução-teste, tendo sido estes dispostos aos poucos e ao acaso, para que todos os aquários teste tivessem recebido igual porcentagem de organismos antes que a próxima etapa de colocação fosse iniciada, até que o número total de indivíduos por recipiente fosse completado. Houve o cuidado de não se exceder a relação 1.0 grama por litro na massa total dos organismos (Figura 2.8).



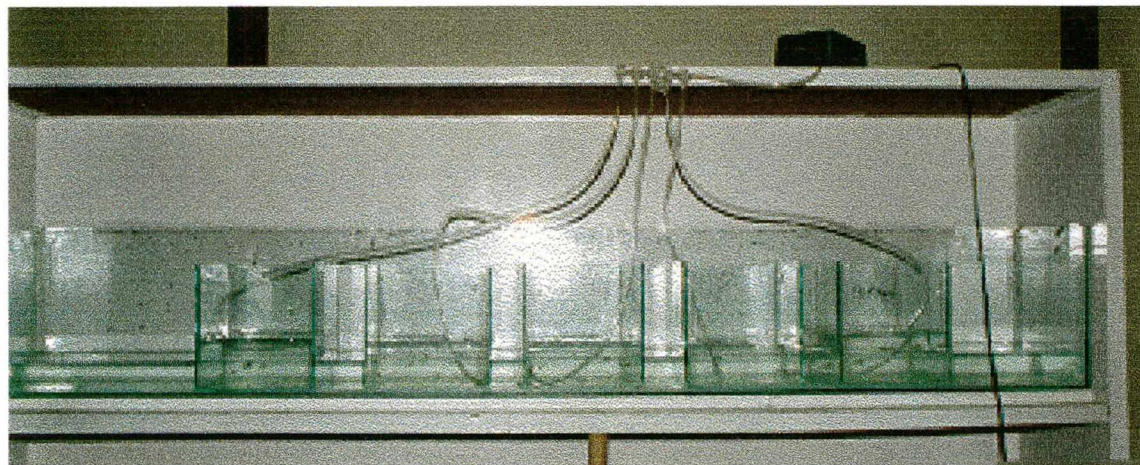


Figura 2.8 Teste de toxicidade aguda com pesticida carbofuran.

Mediu-se e registrou-se o pH, condutividade e temperatura a cada 24 horas, em todas as concentrações. A letalidade e o comportamento anormal dos organismos foram observados e anotados após 3 h, 6h, 24h e 48 horas de iniciado o teste. Os peixes mortos foram retirados por sifonamento com tubo de vidro, pesados e medidos.

Os cálculos da toxicidade para se obter a CL50 foram efetuados utilizando-se o "Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays" (Hamilton et al., 1978), a partir do número de organismos mortos em cada concentração após os períodos de observação de 3h, 6h, 24h e 48 horas .

Os testes preliminares e definitivos foram realizados com dez peixes em cada aquário para não haver necessidade de repetição e também para obter-se resultados estatísticos mais significativos.

## 2.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Foi utilizado o organismo-teste *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea, Phyllopoda) (Figura 2.9), gentilmente cedido pelo Laboratório de Ecotoxicologia da Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina -FATMA.

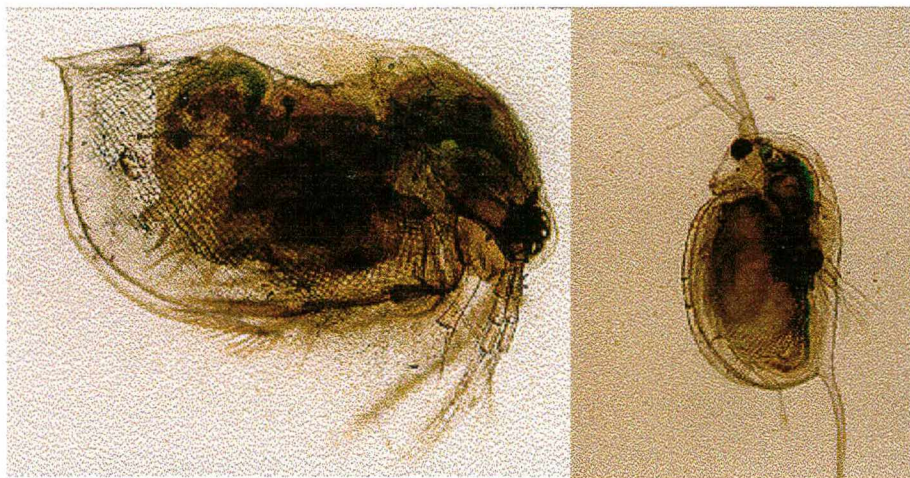


Figura 2.9 *Daphnia magna*. (Fotomicrografia realizada no LIMA)

### 2.2.1 Cultivo dos organismos

Os organismos foram cultivados com água de cultivo, em recipientes de vidro com capacidade para 1000 mL (Figura 2.10) e alimentados diariamente com cultura de algas verdes *Scenedesmus subspicatus* (Apêndice A). Manteve-se a temperatura em  $20 \pm 2$  °C, a luminosidade em torno de 2000 lux, o fotoperíodo de 16 horas de luz (DIN,1989).

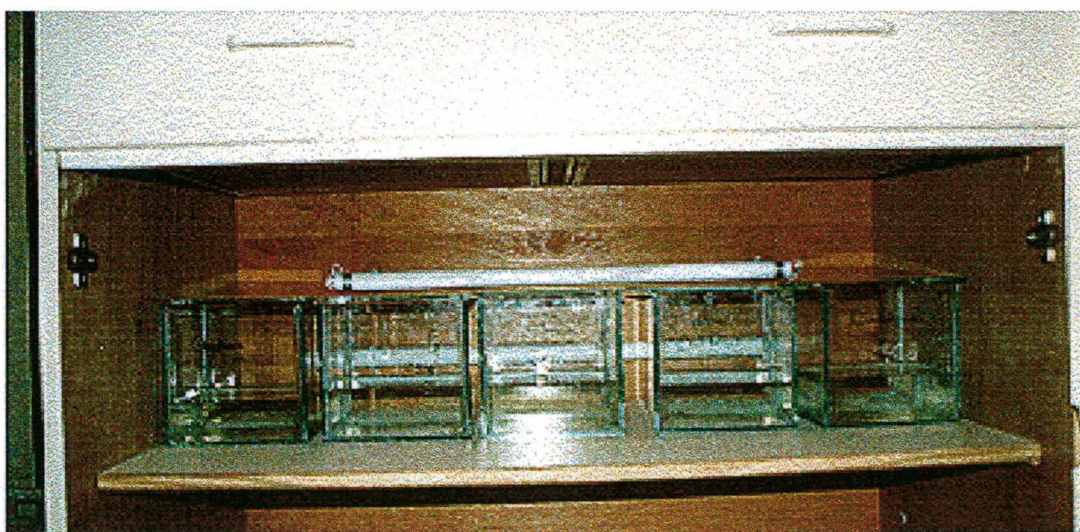


Figura 2.10 Recipientes para cultivo de *Daphnia magna*.

Realizou-se a manutenção dos organismos por meio de transferência através de sifonamento com tubos de vidro, em dias alternados, para um meio de cultivo novo. Removeu-se diariamente o depósito de algas, organismos mortos e carapaças, formados nos recipientes de cultura. Tomou-se o cuidado de separar os organismos jovens dos adultos, descartando-os, abrindo um novo lote ou utilizando-os para teste. A cultura foi descartada sempre que havia a ocorrência de mais de dois efípios (Figura 2.11).



Figura 2.11 Efípio.

### 2.2.2 Desenvolvimento do método

Indivíduos jovens de *Daphnia magna* foram expostos a diferentes concentrações do agente-tóxico carbofuran por um período de 24-48 horas, para observação do efeito agudo através da imobilidade de 50% dos organismos expostos. Expressou-se os resultados utilizando a Concentração Efetiva Média - CE 50 ; 24 - 48 horas.

O método foi executado em duas etapas. A primeira etapa, consistiu num teste preliminar para estabelecer o intervalo das concentrações a serem utilizadas no teste definitivo, e a segunda, teste definitivo para determinar a CE50.

### 2.2.3 Teste de sensibilidade dos organismos

Os testes de sensibilidade para se avaliar os lotes de *Daphnia magna* foram realizados, com uma repetição, em 10 ensaios diferentes com 6 diferentes concentrações (0,70 mg/L, 0,90 mg/L, 1,10 mg/L, 1,30 mg/L, 1,50 mg/L e 1,70 mg/L) por ensaio, da substância de referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), além do controle com água de diluição (Apêndice A). As soluções com dicromato foram realizadas a partir da solução mãe, em balões de 50 mL, com água de diluição e distribuídas em 2 beckers de 25 mL cada uma, identificados como teste e repetição para facilitar a observação e contagem dos organismos imóveis. Efetuou-se o teste com 5 organismos jovens (6 a 24 horas de idade) em cada recipiente, por um período de 24 horas, e o resultado do número de organismos móveis e imóveis foi anotado no final. A solução-mãe de dicromato de potássio foi preparada em balão volumétrico, com capacidade para 500 mL, com água de diluição.

### 2.2.4 Preparo das Soluções do Agente Tóxico Carbofuran

A solução-mãe do agente carbofuran foi preparada com água de diluição em balão volumétrico de 250 mL. O carbofuran granular foi pesado em balança de precisão Libor AEG-120G Shimadzu, e dissolvido com 0,05 mL de álcool etílico (grau pesticida). As soluções ensaio do carbofuran foram realizadas a partir da solução-mãe, em balões de 50 mL, com água de diluição.

### 2.2.5 Testes

Os testes preliminar e definitivos foram realizados em dois beckers de 25 mL para cada diluição. Além do controle com água de diluição, foram utilizados controles com o solvente álcool etílico em água de diluição nas mesmas proporções utilizadas nas concentrações. No início dos testes foram medidas as variáveis pH e oxigênio dissolvido

em cada becker, nos quais foram introduzidas 5 daphnias jovens, separadas por peneiras. O ensaio foi mantido em ambiente escuro, coberto com papel pardo, a uma temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , não alimentando-se os organismos durante os testes (Figura 2.12).



Figura 2.12 Teste de toxicidade com *Daphnia magna*.

O teste preliminar foi realizado com uma série de cinco concentrações (4,69; 9,37; 18,75; 37,50; 75,00  $\mu\text{g/L}$ ) do agente carbofuran e mais os controles. Os resultados obtidos neste teste determinaram as concentrações onde ocorram 0% e 100% de imobilidade. A partir desses valores extremos foi possível determinar a faixa de concentrações (0,7  $\mu\text{g/L}$ , 0,9  $\mu\text{g/L}$ , 1,1  $\mu\text{g/L}$ , 1,3  $\mu\text{g/L}$ , 1,5  $\mu\text{g/L}$  e 1,7  $\mu\text{g/L}$ ) utilizadas no teste definitivo. Calculou-se as diluições para o teste definitivo utilizando-se de um fator de 0,6. Com a aplicação desta constante obteve-se concentrações intermediárias aos valores de 0% e 100% de imobilidade observadas no teste preliminar.

A cada 24h e 48h de exposição, observou-se e anotou-se o número de organismos que não demonstraram qualquer movimento durante 15 segundos. Análises de pH e oxigênio dissolvido foram efetuadas após 48 horas, a partir da maior diluição da amostra onde foi observado 95% de imobilidade.

Os cálculos da toxicidade para se obter a CE50 foram efetuados utilizando-se o "Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays" (Hamilton et al., 1978), a partir do número de organismos imóveis em cada concentração após os períodos de observação de 24h e 48 horas.

## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Percentual do agente ativo carbofuran no produto comercial Furadan da Hokko do Brasil

A Figura 3.1 mostra a sobreposição dos cromatogramas resultantes das análises das amostras contendo 100 mg/L e 500 mg/L de Furadan. Observa-se que, para estas duas diferentes concentrações o tempo de retenção do agente ativo carbofuran nas amostras é praticamente o mesmo por volta de 3,43 minutos correspondendo ao tempo de retenção encontrado para os padrões de carbofuran.

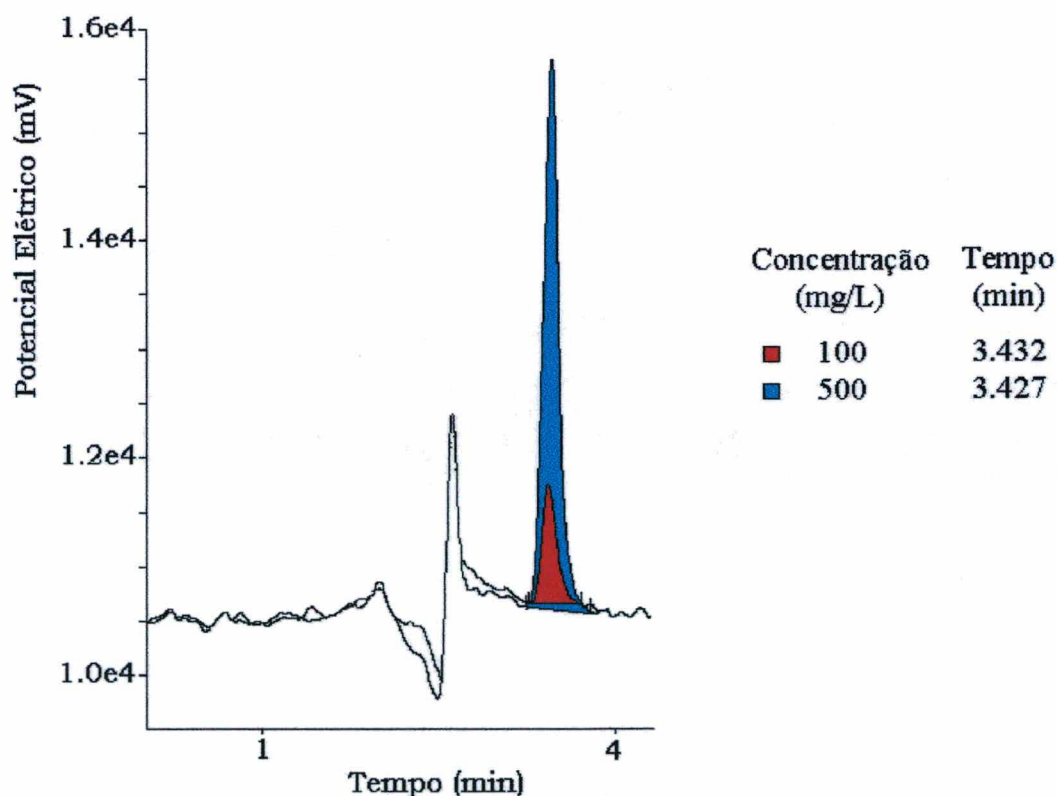


Figura 3.1 Perfil de eluição do carbofuran extraído da solução de Furadan, por HPLC.

A Figura 3.2 apresenta em (a) a curva padrão para o carbofuran e em (b) a curva obtida do produto comercial Furadan. Após análises dos resultados pode-se constatar que a metodologia de extração e dosagem do carbofuran mostrou-se específica, reprodutiva e com alto grau de sensibilidade. Este estudo possibilitou confirmar as especificações do fabricante. A quantidade do produto ativo (carbofuran) encontrado no produto comercial Furadan foi de 5%.

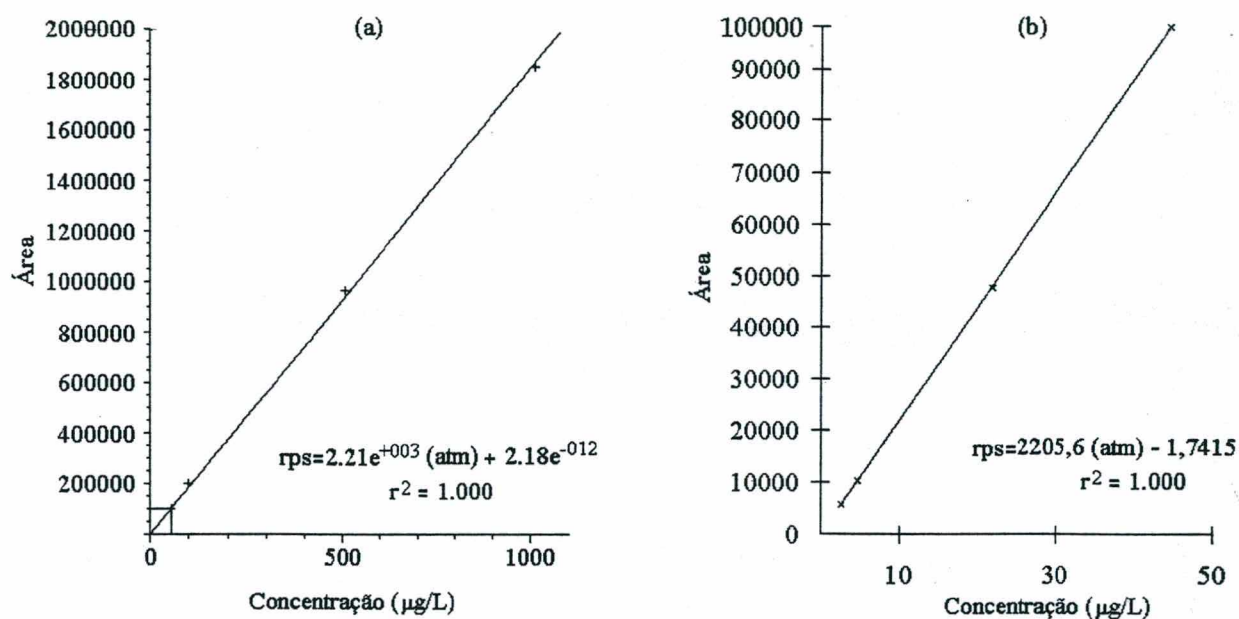


Figura 3.2 (a) Curva padrão do pesticida carbofuran (100, 500, 1000 µg/L), (b) Curva do agente ativo carbofuran presente no produto comercial Furadan.

## 3.2 Bioensaios com peixes (*Poecilia reticulata*)

### 3.2.1 Teste de sensibilidade com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ )

Os testes de sensibilidade, pelo sistema estático, foram realizados com o objetivo de acompanhar a sensibilidade dos reativos biológicos de cada lote de peixe coletado



através da determinação da CL50; 24 horas, nas condições estabelecidas na metodologia (item 2.1.3) com a substância de referência dicromato de potássio. Os resultados obtidos para estes experimentos são mostrados na Figura 3.3. as quais apresentam o número de peixes mortos por período de observação de 3, 6 e 24 horas de duração do teste, referentes as concentrações de 56 mg/L, 110 mg/L, 320 mg/L, 480 mg/L e 800 mg/L; tendo sido 5 peixes, inicialmente, expostos a cada concentração de dicromato de acordo com a norma da CETESB (1987). No início de cada teste de sensibilidade ao dicromato também foram realizados controles dos parâmetros físico-químicos: condutividade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH (Tabela Ib, Apêndice B). Foram observadas as características recomendadas para água de diluição e controle dos testes, que são: condutividade igual a 160  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , temperatura  $23 \pm 1$  °C, oxigênio dissolvido 40% de saturação, dureza 40-48 mg/L em  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{pH} \cong 7,2$  a 7,6. Os peixes também foram pesados e medidos conforme item 2.1.1, apresentando um peso médio de 0,097g e um comprimento médio de 1,95 mm, não ultrapassando dessa forma o valor recomendado pela CETESB (1987) de 1g/L.

Os resultados dos testes de sensibilidade (Figuras 3.3) mostram que, as concentrações de 480 mg/L e 800 mg/L apresentaram mortalidade elevadas e constantes em todos os testes de sensibilidade, sendo que o inverso acontece com as concentrações de 56 mg/L e 110 mg/L, mas contudo, também foi observado uma certa constância em todos os testes, onde para o tempo de exposição de até seis horas não foi observado nenhuma morte. A concentração intermediária apresenta mortalidade em todos os tempos de exposição observados, porém a letalidade é mais significativa a partir do tempo de exposição de seis horas. Os resultados apresentados para o teste de sensibilidade nos leva a concluir que os lotes coletados possuem sensibilidade muito próxima e portanto foram considerados aptos para serem utilizados nos testes preliminares e definitivos com o carbofuran durante o estudo.

Uma análise estatística foi feita para verificar essa hipótese. Para testar a semelhança entre os resultados do número de peixes mortos após 24 horas nos diferentes testes de sensibilidade com dicromato de potássio (Tabela Ic, Apêndice C), usando amostras independentes de populações normais, foi utilizada a análise de variância ANOVA - fator único (Tabela IIc, Apêndice C).

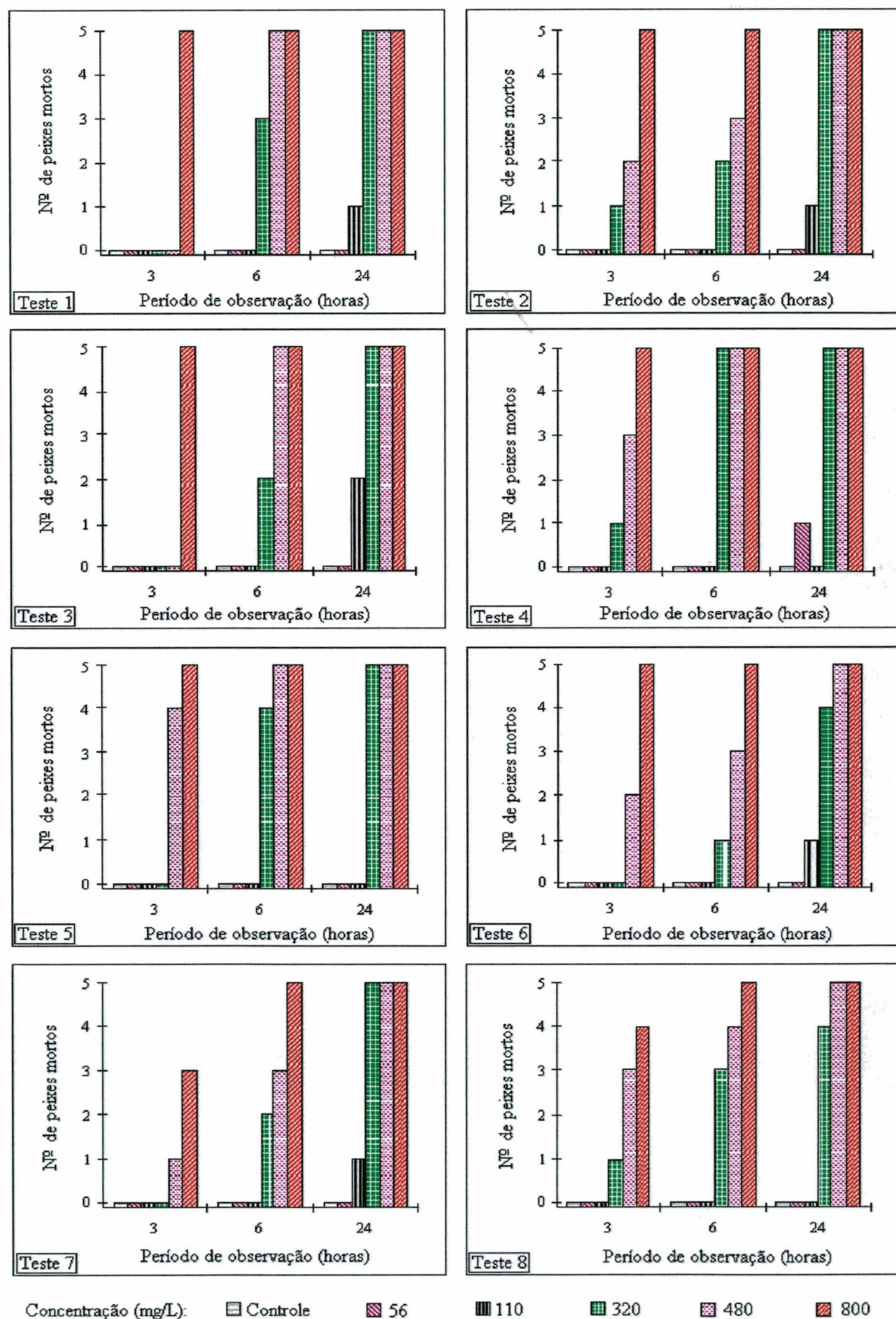


Figura 3.3 Sensibilidade da *Poecilia reticulata* ao dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Com esta análise estatística pôde-se constatar que as diferenças entre o número de peixes mortos após 24 horas, nos diferentes testes com dicromato não foi relevante ao nível de significância  $\alpha = 0,05$ , dentro das condições de laboratório descritas para este trabalho.

A partir dos resultados do número de peixes mortos por período de observação, permitiu-se calcular a Concentração Letal Média (CL50) dos diferentes testes. Estes valores de CL 50 estão transcritos na Tabela 3.1. Com os valores para CL50 em 3h, 6h e 24 horas encontrados nos oito testes com dicromato de potássio, foi feita uma média que resultou em CL50 (24 horas) igual a 171,21 mg/L, desvio padrão igual a 25,71; e coeficiente de variação igual a 0,15. O valor de CL 50 171,21 mg/L  $\pm$  25,7 assim obtido foi adotado como referência de sensibilidade dos organismos para os demais testes preliminares e definitivos com carbofuran, realizados de acordo com as metodologias descritas no item 2.1.3.

Tabela 3.1 Concentração Letal (CL50) em mg/L de dicromato de potássio calculada para *Poecilia reticulata* por período de observação em horas.

Teste Nº	Período de observação		
	3 horas	6 horas	24 horas
1	619,677	251,907	157,607
2	445,238	350,602	157,607
3	619,677	291,894	132,397
4	406,255	187,617	176,810
5	429,526	217,398	187,617
6	515,914	406,255	182,625
7	704,089	350,602	157,607
8	456,582	276,080	217,398
Média	524,620	291,544	171,210
Desvio padrão	109,770	73,914	25,710
Coef. de variação	0,21	0,25	0,15

### 3.2.2 Bioensaios com carbofuran utilizando *Poecilia reticulata* - Testes preliminares

Os experimentos com carbofuran nos testes preliminares foram realizados com a finalidade de estabelecer o intervalo de concentrações a serem utilizadas nos testes definitivos. Para determinar a faixa inicial de concentrações a ser utilizada nos testes preliminares, utilizou-se como base os valores encontrados na literatura estudada. Segundo PMEP (1984), a toxicidade aguda (CL50) para peixes indicada está entre 94 e 2859  $\mu\text{g/L}$ . EXTOUNET (1992) apresenta a Concentração Letal (CL-96 horas) para peixes igual a 150  $\mu\text{g/L}$ . Rollings et al. (1997), citam a alta toxicidade do carbofuran e apresenta a CL-96 horas para peixes na faixa de 100 a 1000  $\mu\text{g/L}$  e Bayer (1998), cita a CL50-96 horas para peixes igual a 240  $\mu\text{g/L}$ . De acordo com estas citações realizou-se um primeiro teste (teste N<sup>o</sup> 1) empregando-se uma ampla faixa de concentrações para que fosse possível obter valores reais de trabalho. A partir dos resultados encontrados no teste N<sup>o</sup> 1 (Figura 3.4) foi possível estreitar a faixa de concentrações utilizadas. Estes novos valores de concentrações foram aplicados no teste seguinte (teste N<sup>o</sup> 2), e os resultados podem ser visualizados na Figura 3.4. A partir do teste N<sup>o</sup> 2 outros 4 testes preliminares foram realizados com pequena variação entre as concentrações para que fosse possível determinar a faixa ideal utilizada nos testes definitivos. Os testes foram realizados com 10 organismos por concentração testada. A Figura 3.4 apresenta o número de peixes mortos por período de observação de 3, 6, 24 e 48 horas de duração do teste.

No início de cada teste preliminar com carbofuran, também foram realizados controles dos parâmetros físico-químicos: condutividade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH (Tabela IIb, Apêndice B). Estes parâmetros foram mantidos o mais próximo possível de acordo com as condições do laboratório, dentro das faixas recomendadas pela CETESB (1988).

A aplicação dos testes preliminares neste estudo mostrou resultados de mortalidade que variaram tanto com relação ao tempo de exposição dos indivíduos ao carbofuran, quanto às diferentes concentrações do referido agrotóxico. As diferenças de mortalidade entre os testes já eram previstas devido a grande variação das concentrações principalmente nos quatro primeiros testes.

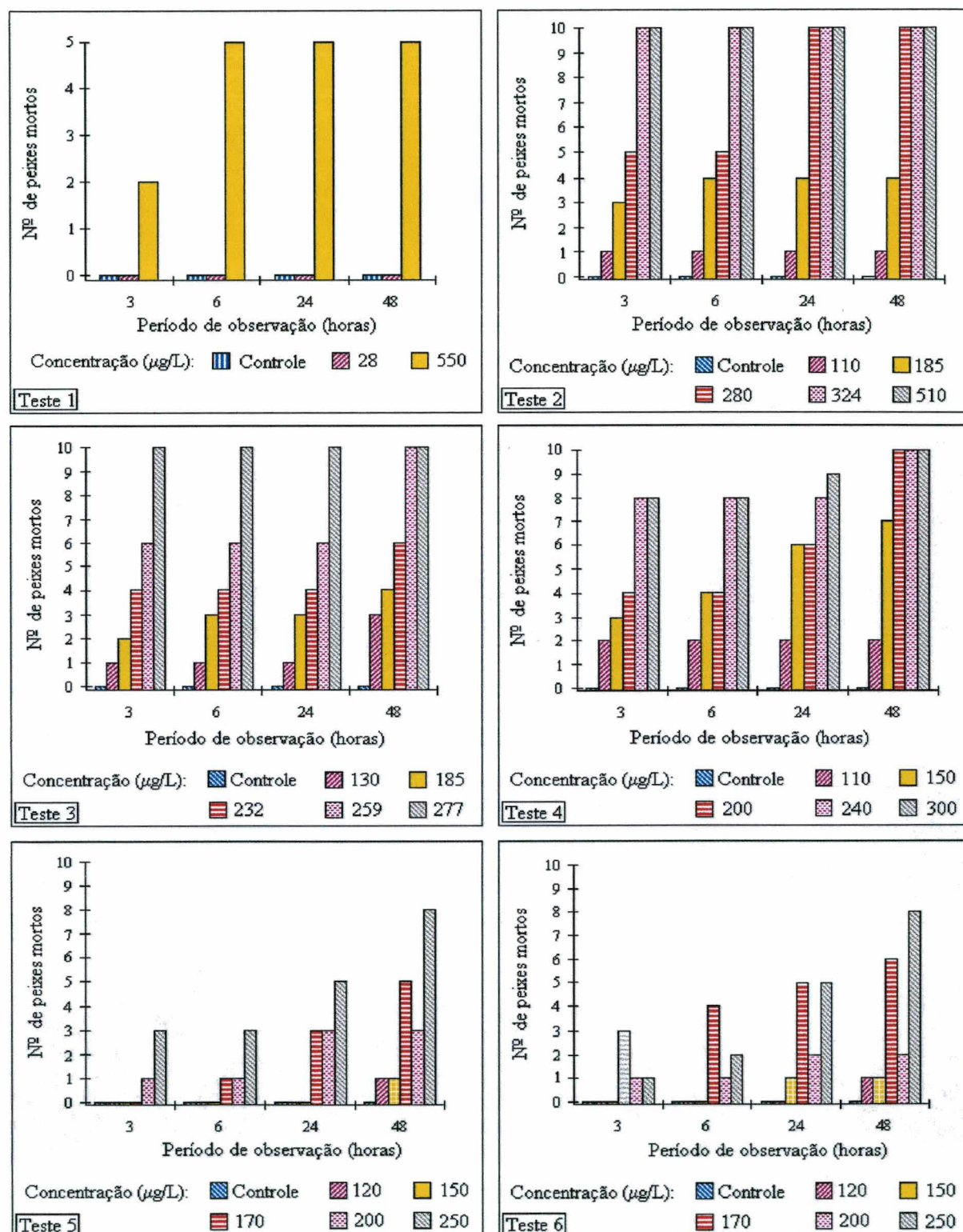


Figura 3.4 Testes preliminares com carbendazim utilizando *Poecilia reticulata*.

Após os testes preliminares, foi possível definir a concentração máxima que não causa nenhum efeito de letalidade, ou seja uma concentração abaixo de 100  $\mu\text{g/L}$ . Os

efeitos de letalidade próximos a 100% apareceram com maior frequência em concentrações que vão de 250 a 300  $\mu\text{g/L}$ . Por esta razão foi apontado o valor de 300  $\mu\text{g/L}$  para a mínima concentração que causa letalidade a 100% da população exposta em 48 horas. Partindo deste valor pôde-se determinar as demais concentrações usadas nos testes definitivos utilizando um fator de 0,7.

### 3.2.3 Bioensaios com carbofuran utilizando *Poecilia reticulata* - Testes definitivos

A partir dos testes preliminares com carbofuran foi possível definir a faixa de concentrações utilizada nos testes definitivos (70, 100, 150, 200, 300  $\mu\text{g/L}$ ). Foram realizados 6 testes definitivos (Figura 3.5), expondo 10 organismos teste às diferentes concentrações. No início de cada teste definitivo, também foram realizados controles dos parâmetros físico-químicos estabelecidos para água de diluição e controle dos teste conforme apresentado nos testes de sensibilidade (Tabela IIIb, Apêndice B).

A Figura 3.5 apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade com carbofuran utilizando como reativo biológico o peixe da espécie *Poecilia reticulata*. Os resultados, segundo a variável tempo de exposição, mostram que os efeitos de mortalidade para as concentrações abaixo de 150  $\mu\text{g/L}$ , mesmo para um tempo de 48 horas, são inferiores a 20%, portanto não suscetível de efeitos agudos, porém apresentam indícios para estudos de efeitos crônicos. Em alguns testes as concentrações acima de 150  $\mu\text{g/L}$ , observou-se um alto grau de mortalidade o que evidenciou os efeitos agudos. Mesmo trabalhando-se em laboratório sob condições rigorosamente controladas, com amostras relativamente homogêneas, pode-se esperar que algumas variações de comportamento ocorram com indivíduos distintos, por tratar-se de um estudo realizado com organismos vivos, podendo resultar neste comportamento não uniforme quanto aos testes definitivos.

Um comportamento frequentemente observado durante o tempo de exposição, foram os efeitos sobre as transmissões nervosas, com o aparecimento de movimentos

acelerados e irregulares e nascimentos prematuros, culminando com a morte dos indivíduos.

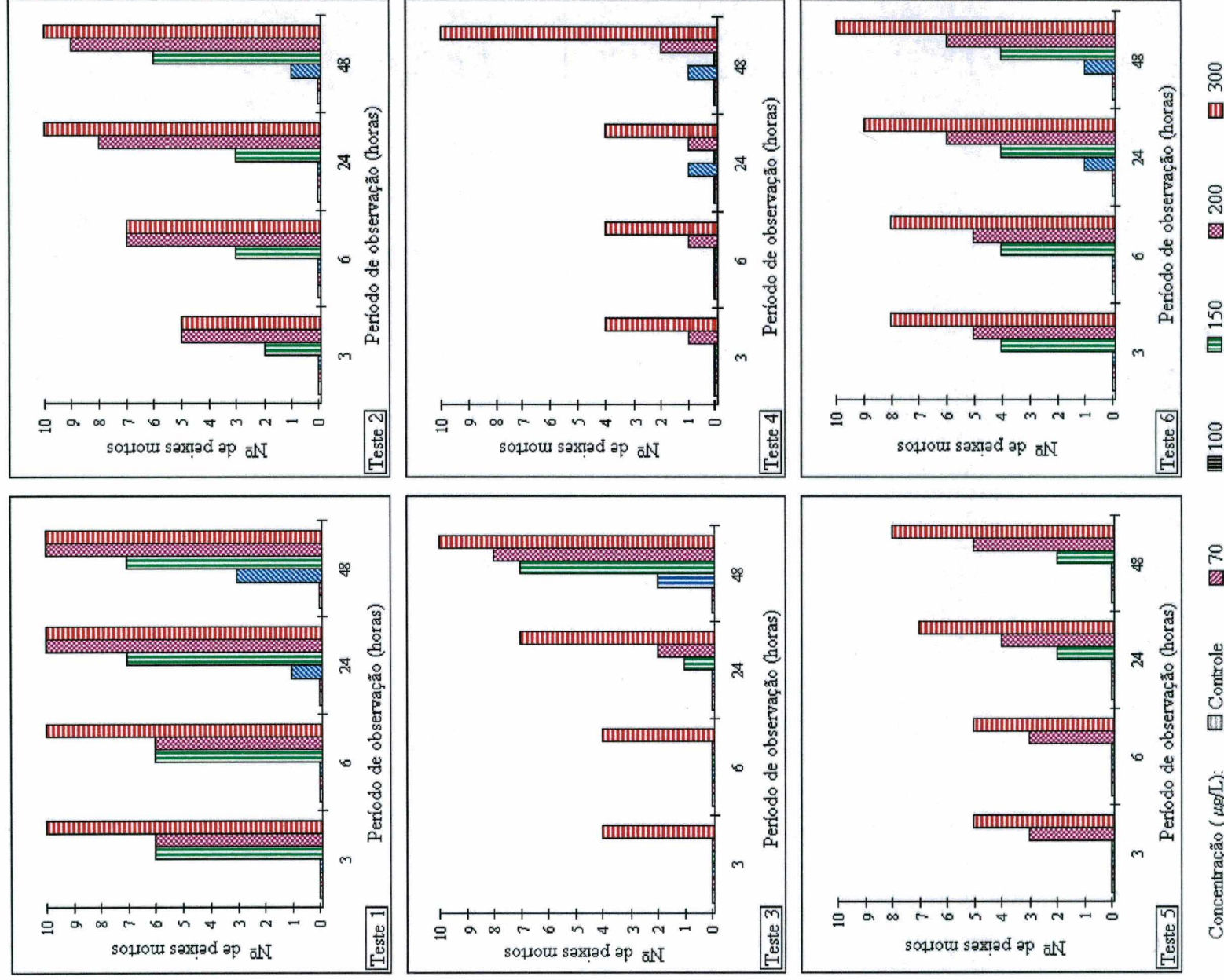


Figura 3.5 Testes definitivos com carbofuran utilizando *Poecilia reticulata*.

Os diferentes resultados do número de peixes mortos encontrados após 48 horas nos testes definitivos com carbofuran (Tabela IIIc, Apêndice C) foram comparados através de análise de variância ANOVA - fator único, para verificar a semelhança dos resultados encontradas nos diferentes testes (Tabela IVc, Apêndice C). De acordo a análise de variância, as diferenças encontradas nos resultados após 48 horas não foram relevantes ao nível de significância  $\alpha = 0,05$ , considerando estes resultados para as condições de laboratório descritas para este trabalho.

Com os resultados do número de peixes mortos por período de observação, permitiu-se calcular a Concentração Letal Média (CL50) dos diferentes testes (Tabela 3.2). Com estes valores de CL50 obtida para 3h, 6h, 24h e 48 horas nos seis testes com carbofuran, calculou-se uma média que resultou em CL50 (48 horas) igual a 164,91  $\mu\text{g/L}$ , desvio padrão igual a 40,46; e coeficiente de variação igual a 0,25, de acordo com as metodologias estabelecidas no item 2.1.6.

Tabela 3.2 Concentração Letal (CL50) em  $\mu\text{g/L}$  de Carbofuran calculada para *Poecilia reticulata* por período de observação em horas

Teste Nº	Período de observação			
	3 horas	6 horas	24 horas	48 horas
1	161,61	161,61	130,81	121,21
2	244,95	173,21	167,31	140,20
3	-	-	255,10	134,96
4	-	-	-	220,38
5	300,00	300,00	228,69	206,00
6	189,81	189,81	173,21	166,73
Média	224,10	206,16	191,02	164,91
Desvio padrão	61,31	63,62	50,10	40,46
Coef. de variação	0,27	0,31	0,26	0,25



A partir das médias de resultados obtidos para CL 50 de carbofuran nos testes definitivos, pode-se estabelecer uma estimativa da taxa de variação da CL50 de carbofuran em relação ao período de 3h, 6h, 24h e 48h de exposição dos organismos teste. Na Figura 3.6, pode-se verificar que o valor da concentração letal média é inversamente proporcional ao tempo em que o organismo fica exposto, ou seja, com o passar do tempo de exposição dentro de um período de 48 horas, o valor encontrado para CL50 decresce gradativamente, porque quanto maior a concentração de carbofuran menor será o tempo de exposição dos organismos apresentar a CL50 e quanto menor a concentração, maior o tempo de exposição até que apresente a letalidade quantificada.

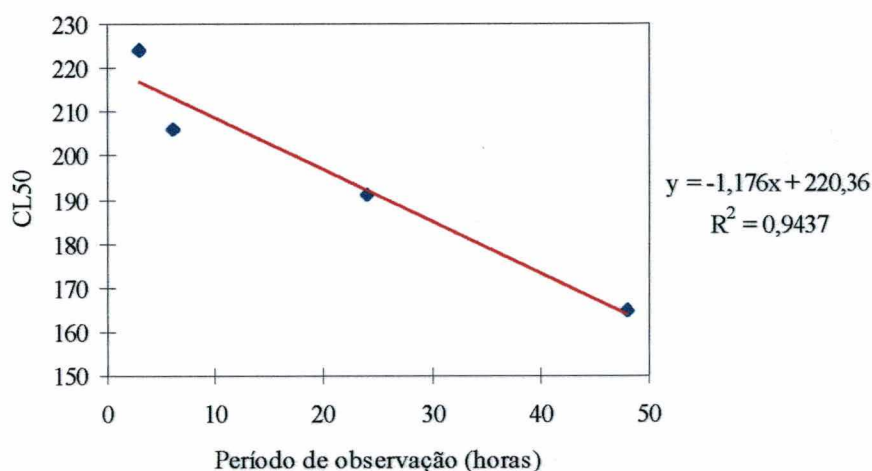


Figura 3.6 CL50 em relação ao tempo no teste definitivo.

A partir dos testes de toxicidade aguda com peixes viu-se a necessidade da utilização de pelo menos uma outra espécie de organismo aquático representativo de um nível trófico diferente e observar a concentração de carbofuran presente no ambiente aquático capaz de causar letalidade a espécies mais sensíveis. Foram então utilizados microcrustáceos (daphnias) que são organismos essenciais ao ambiente aquático por serem um elo de ligação entre os organismos produtores (algas) e os consumidores (peixes) de matéria orgânica, agindo como filtradores de fitoplâncton (algas) e servindo de alimento para organismos maiores, como os peixes.

### 3.3 Bioensaios com microcrustáceos (*Daphnia magna*)

#### 3.3.1 Teste de sensibilidade com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ )

Foram realizados experimentos com a substância de referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), para avaliar a sensibilidade dos organismos teste de acordo com recomendações da norma DIN (1989), sendo as mesmas utilizadas em experimentos de toxicidade realizados pela FATMA. Os resultados obtidos para estes experimentos estão mostrados na Figura 3.7a e b, apresentando o número de daphnias imóveis por período de observação de 24 horas de duração do teste, referentes as concentrações de 0,70 mg/L, 0,90 mg/L, 1,10 mg/L, 1,30 mg/L, 1,50 mg/L e 1,70 mg/L. Inicialmente foram expostas 10 daphnias, a cada concentração de dicromato, sendo 5 daphnias no teste e 5 daphnias na repetição, os quais foram realizados como teste e repetição para facilitar a verificação exata do número de organismos imóveis.

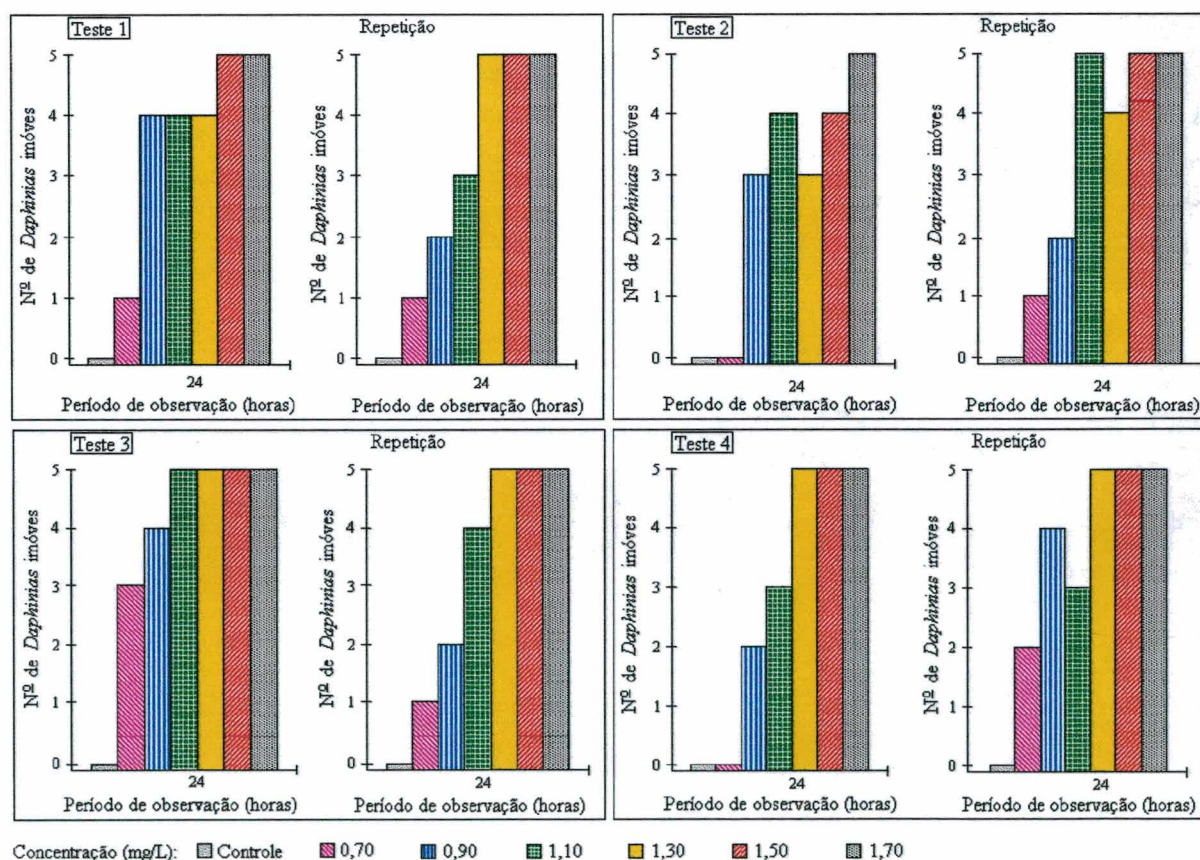


Figura 3.7a Sensibilidade da *Daphnia magna* ao dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

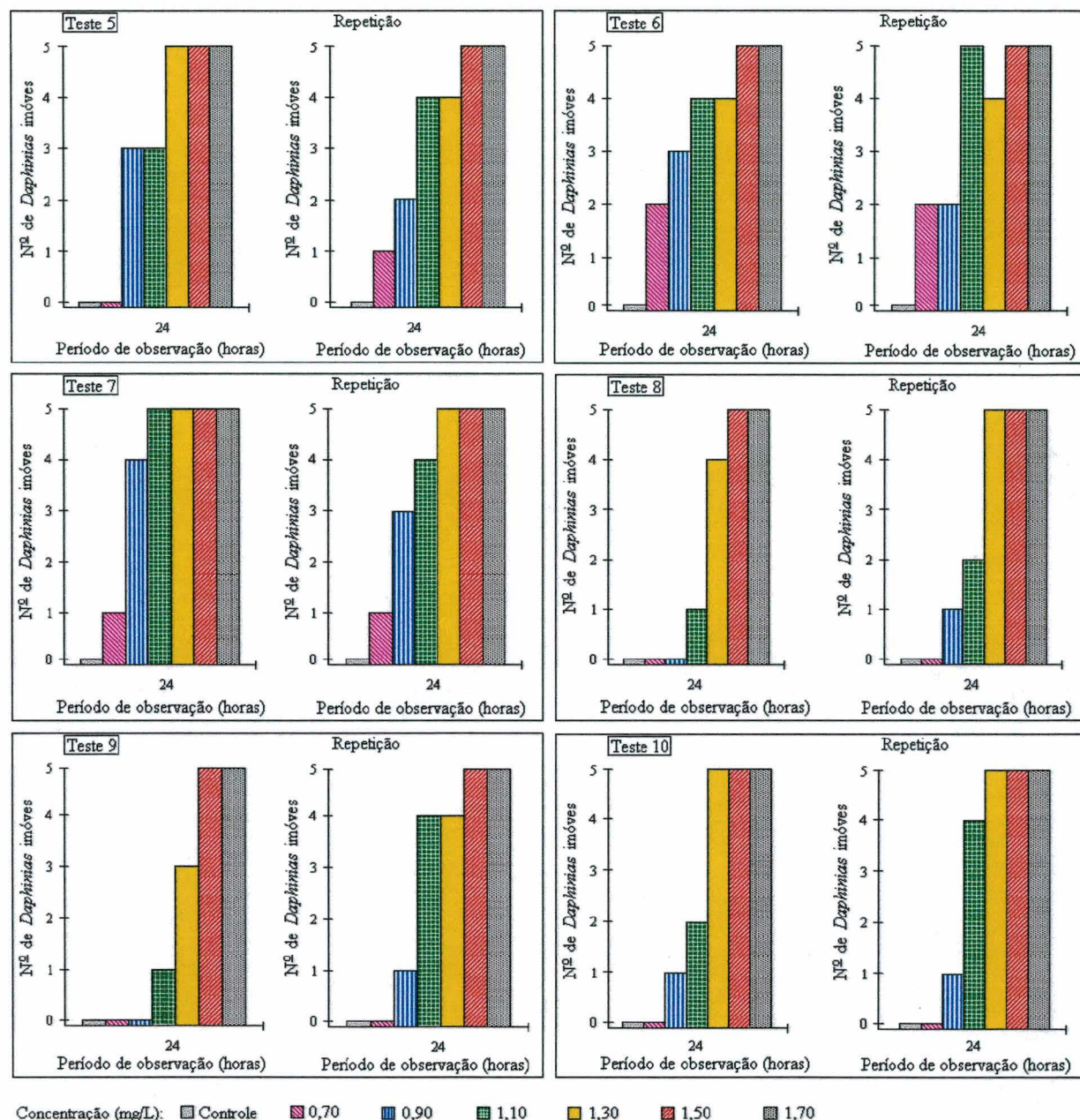


Figura 3.7b Sensibilidade da *Daphnia magna* ao dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

De acordo com recomendações da norma DIN (1989), a água de diluição utilizada nos testes de sensibilidade ao dicromato deve permitir a sobrevivência dos organismos por no mínimo 48 horas sem alimentação, apresentando no controle uma dureza de  $250 \pm 25$  mg/L em  $CaCO_3$ , pH de  $7,8 \pm 0,2$ , oxigênio dissolvido acima de 60% de saturação. Esses parâmetros físico-químicos foram medidos na água de diluição usada para os testes de

sensibilidade, preliminar e definitivos e a média desses valores apresentados na Tabela IVb (Apêndice B).

Os resultados encontrados nos testes de sensibilidade mostram que a partir da concentração de 1,10 mg/L, ocorreram mortalidades elevadas em praticamente todos os testes, enquanto as concentrações abaixo de 1,10 mg/L apresentaram variações no número de mortalidade. Estas variações na sensibilidade dos organismos testados podem ser atribuídas a uma tendência de melhor adaptação dos organismos às condições do laboratório, observadas nos testes N<sup>o</sup> 8, 9 e 10, Figura 3.7b.

Os valores de número de daphnias imóveis após 24 horas encontrados nos testes foram somados a suas repetições para obter-se um valor total de 10 organismos expostos. Esse total de resultados de número de daphnias imóveis encontrados nos diferentes testes (Tabela Vc, Apêndice C) nas diferentes concentrações, foi analisada pela análise de variância ANOVA - fator único para se testar a semelhança entre os resultados encontrados nos diferentes testes (Tabela VIc, Apêndice C). De acordo com esta análise, as diferenças encontradas nos resultados após 24 horas não foram relevantes ao nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Considerando este resultado para as condições de laboratório, os organismos foram considerados aptos a serem utilizados nos demais testes.

A partir dos resultados do número de daphnias imóveis por período de observação de 24 horas, calculou-se a Concentração Efetiva Inicial Média (CE(I)50) dos diferentes testes (Tabela 3.3) para se obter a faixa aceitável (0,9 a 2,0 mg/L) de CE(I)50 para  $K_2Cr_2O_7$ , realizado com água de diluição (DIN, 1989). Os valores de CE(I)50, 24 horas nos 10 testes com dicromato permitiram calcular uma média que resultou em CE(I)50, 24 horas igual a 0,94 mg/L, desvio padrão igual a 0,12; e coeficiente de variação igual a 0,12.

Os resultados dos testes de sensibilidade apresentam as concentrações efetivas médias próximas e dentro da faixa aceitável para o dicromato de potássio. Apesar dos resultados estarem em torno do limite mínimo aceitável, os lotes utilizados nos testes preliminares e definitivos possuíam sensibilidade conforme as exigências da norma DIN. Por outro lado as condições do laboratório de toxicologia propiciam uma sensibilidade menor para as culturas de daphnia e esta sensibilidade manteve-se quase constante com um coeficiente de variação em torno de 10%. Como referência de sensibilidade dos

organismos, foi adotado o valor obtido de CE(I)50 igual a  $0,94 \text{ mg/L} \pm 0,12$ , para os demais testes preliminar e definitivos.

Tabela 3.3 Concentração Efetiva (CE50) em mg/L de Dicromato de Potássio calculada para *Daphnia magna* por período de observação de 24 horas

Teste N <sup>o</sup>	CE(I)50 em 24 horas
1	0,88
2	0,93
3	0,79
4	0,9
5	0,93
6	0,86
7	0,82
8	1,12
9	1,12
10	1,02
Média	0,94
Desvio Padrão	0,12
Coefficiente de Variação	0,12

### 3.3.2 Bioensaios com carbofuran utilizando *Daphnia magna* - Teste preliminar

O experimento com carbofuran no teste preliminar (Figura 3.8) foi realizado com uma ampla faixa de concentrações (4,69  $\mu\text{g/L}$ , 9,37  $\mu\text{g/L}$ , 18,75  $\mu\text{g/L}$ , 37,50  $\mu\text{g/L}$ , 75,00  $\mu\text{g/L}$ ) para se estabelecer o intervalo de concentrações a serem utilizados nos testes definitivos. Os testes foram realizados com 10 organismos, sendo 5 no teste e 5 na repetição, tendo sido utilizado um controle com água de diluição e um controle com água de diluição e álcool na mesma proporção que foi usado para a dissolução do carbofuran.

O teste preliminar nos mostra que os resultados de mortalidade variaram em relação a concentração do carbofuran bem como em relação ao tempo de exposição dos

organismos. De acordo com os resultados encontrados, observou-se que na menor concentração utilizada ( $4,69 \mu\text{g/L}$ ) no teste ocorreu morte ou imobilidade, não servindo como referência como maior concentração que não causa letalidade aos organismos, apesar de não ter sido registrado nenhuma imobilidade na concentração acima ( $9,37 \mu\text{g/L}$ ). Esse comportamento pode estar relacionado à resistência maior ou menor dos indivíduos dentro do universo pesquisado, ou também, por algum erro introduzido durante a manipulação das soluções. Os efeitos de 100% de imobilidade apareceram a partir de  $37,50 \mu\text{g/L}$ , de acordo com esse resultado foi utilizado nos testes definitivos o valor de  $45 \mu\text{g/L}$ , como sendo o valor mínimo que causa morte ou imobilidade a 100% dos organismos durante 48 horas de exposição e determinadas as demais concentrações, utilizando um fator de 0,6. Foi escolhido o valor igual a  $45 \mu\text{g/L}$  por ser um valor intermediário entre as duas menores concentrações onde ocorreu 100% de morte ou imobilidade no teste preliminar, para que fosse possível ter uma maior confiabilidade nos resultados devido ao fato de ter sido feito apenas um teste preliminar.

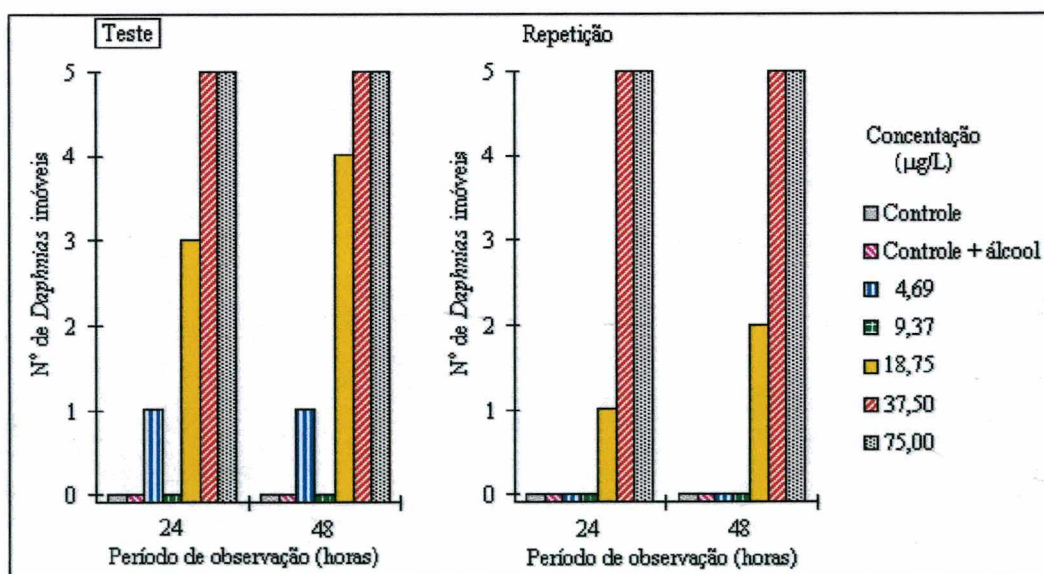


Figura 3.8 Teste Preliminar com Carbofuran utilizando *Daphnia magna*

### 3.3.3 Bioensaios com carbofuran utilizando *Daphnia magna* - Testes definitivos

A partir do teste preliminar com carbofuran foi possível definir a faixa de concentrações utilizada nos testes definitivos (3,5; 5,8; 9,7; 16,2; 27,0; 45,0  $\mu\text{g/L}$ ). Foram realizados nove testes definitivos (Figura 3.9a e b).

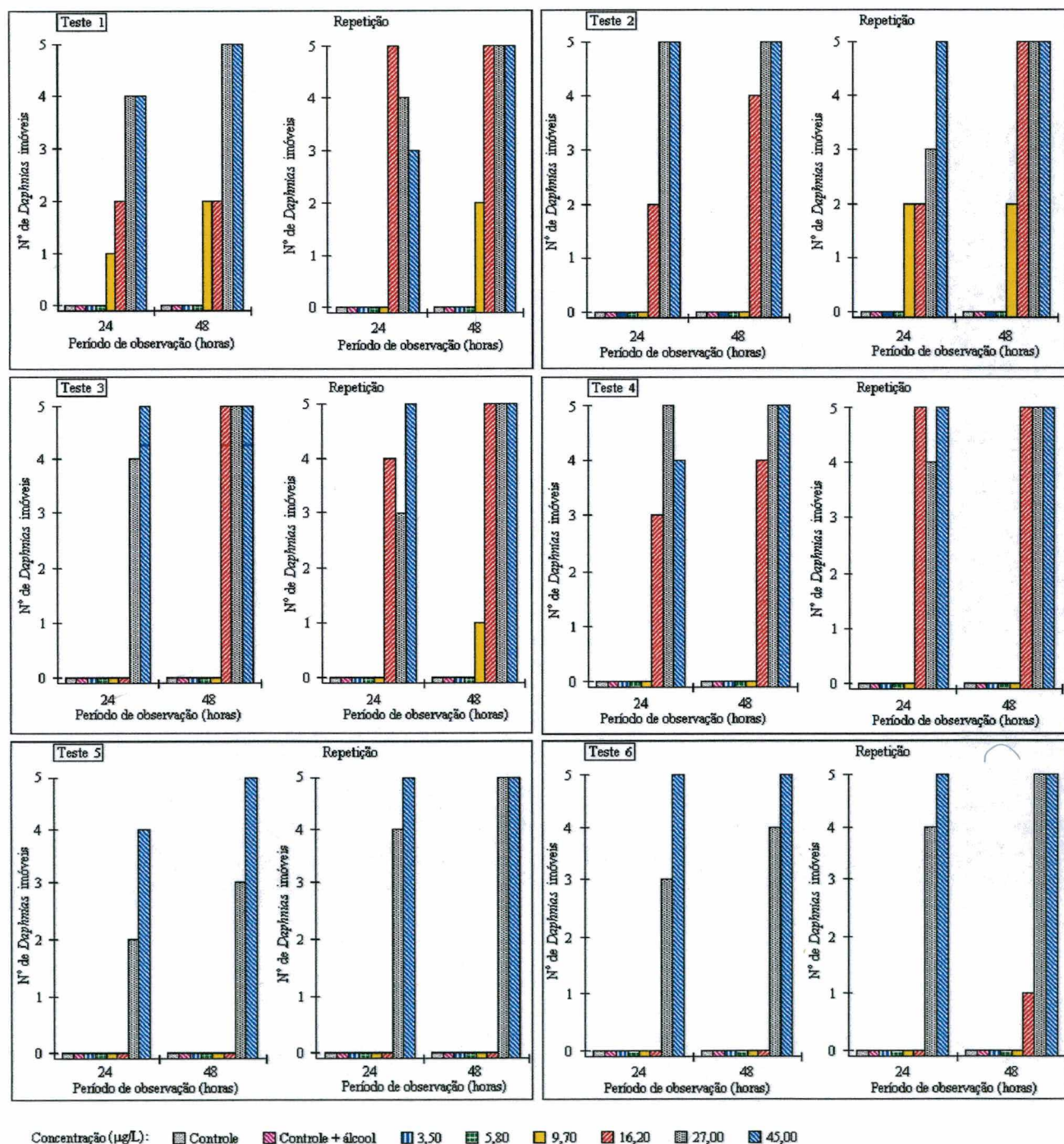


Figura 3.9a Testes Definitivos com Carbofuran utilizando *Daphnia magna*.

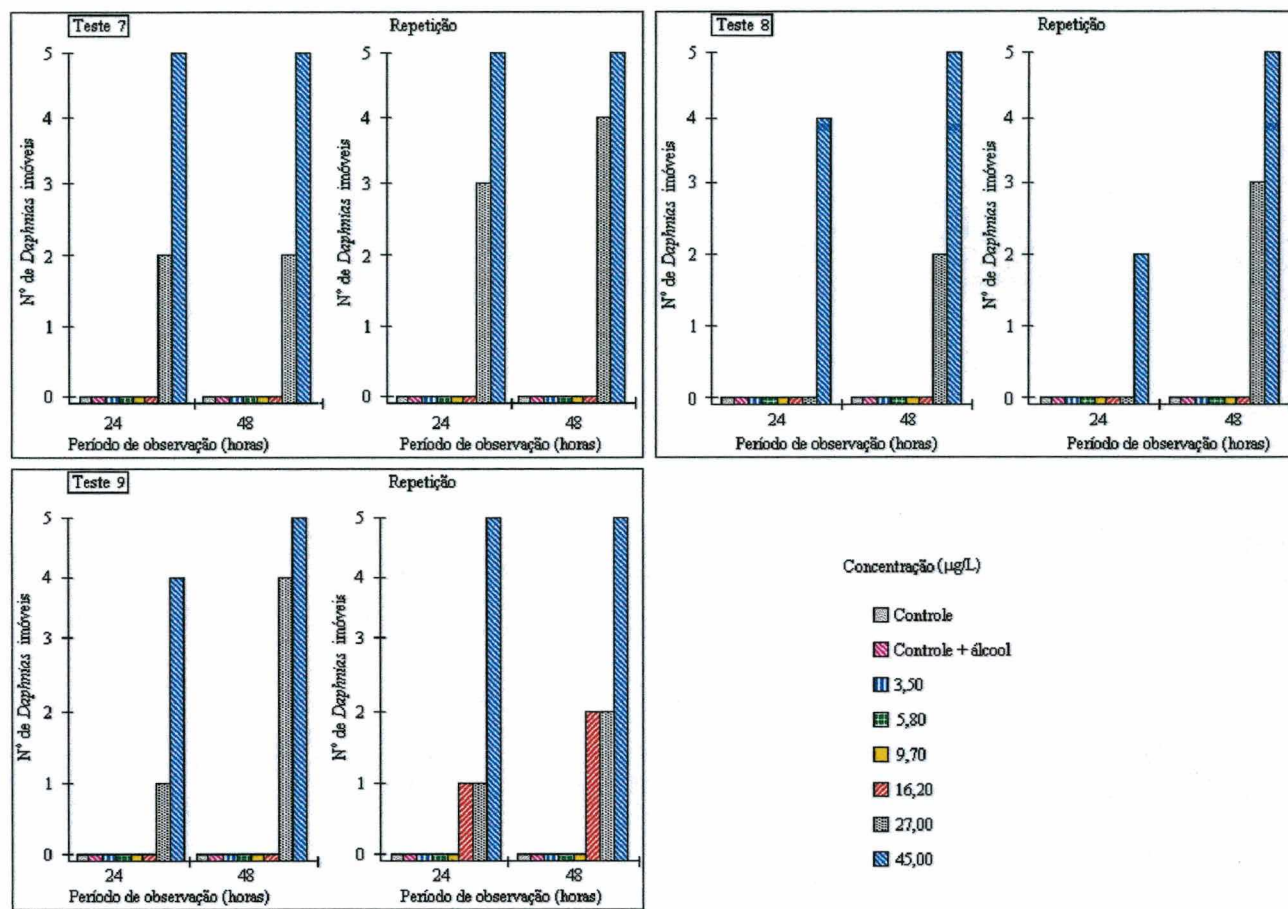


Figura 3.9b Testes Definitivos com Carbofuran utilizando *Daphnia magna*.

Os resultados apresentaram a ocorrência de até 40% de imobilidade nos três primeiros testes avaliados após 48 horas de exposição à concentração de 9,7 µg/L. Nos testes seguintes, ou seja, do quarto ao último teste nenhuma imobilidade foi observada, para essa concentração (0% de imobilidade). Estes valores vem a corroborar os encontrados nos ensaios realizados com dicromato de potássio nos testes de sensibilidade, indicando a possível ocorrência de uma melhor adaptação dos organismos às condições de laboratório. Na concentração de 16,20 µg/L, foi observado um comportamento semelhante, onde até o quarto teste ocorreu até 100% de imobilidade e a partir do quinto teste este valor diminuiu para até 20% de imobilidade, indicando a não ocorrência de efeito agudo. Portanto, deve ser levada em consideração a possibilidade de estudos posteriores sobre a ocorrência de efeitos crônicos. Na concentração de 45 µg/L ficou evidente a ocorrência de efeito agudo sobre os organismos, apresentado 100% de imobilidade em todos os experimentos.



Os diferentes resultados do número de daphnias imóveis encontrados após 48 horas nos testes definitivos (Tabela VIIc, Apêndice C), também foram comparados através da análise de variância ANOVA - fator único, para testar a semelhança dos resultados encontrados nos diferentes testes. De acordo com esta análise, as diferenças encontradas nos resultados após 48 horas não foram relevantes ao nível de significância  $\alpha = 0,05$ , considerando estes resultados para as condições de laboratório descritas para este trabalho (Tabela VIIIc, Apêndice C).

A partir dos resultados do número de daphnias imóveis por período de observação, permitiu-se calcular a Concentração Efetiva Média (CE50) dos diferentes testes (Tabela 3.4). Os valores de CE50 24h e 48 horas nos nove testes com carbofuran, permitiram calcular uma média de CE50 (48 horas) igual a 18,76  $\mu\text{g/L}$ , desvio padrão igual a 6,43; e coeficiente de variação igual a 0,34.

Tabela 3.4 Concentração Efetiva (CE50) em  $\mu\text{g/L}$  de Carbofuran calculada para *Daphnia magna* por período de observação de 24 e 48 horas.

Teste Nº	CE50/ período de observação em horas	
	24	48
1	13,98	11,90
2	17,03	11,91
3	19,86	11,91
4	13,74	13,19
5	26,01	23,16
6	24,38	20,91
7	27,00	25,66
8	41,33	27,00
9	32,70	23,16
Média	24,00	18,76
Desvio Padrão	9,09	6,43
Coefficiente de Variação	0,38	0,34

Nos valores de CE50 48 horas encontrados também foi possível observar a diminuição da sensibilidade dos organismos ao agente carbofuran a partir do teste Nº 4, o

qual mais uma vez confirma uma melhora na adaptação dos organismos ao método de cultura e ao laboratório de toxicologia.

De acordo com a Resolução CONAMA N. 20/86; decreto 14.250/81, as concentrações máximas permitidas para Compostos Organofosforados e Carbamatos é igual a 10 µg/L em metil paration em rios de Classe II, como é o caso do Rio Cubatão. Em determinações feitas com amostras de água do rio Cubatão em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) da Hawllet Packard®, o maior valor detectado foi de 4,65 µg/L (Gicquel et al., 1997), confirmando sua presença nas águas do rio, porém, abaixo dos valores permitidos por lei, assim como dos valores encontrados neste estudo para CL50 em peixes e CE50 para daphnias.

Mesmo que os valores de carbofuran encontrados no rio Cubatão estejam abaixo dos valores encontrados para CL50 e CE50, não apresentando, assim, uma toxicidade aguda para estes organismos, existe a possibilidade de efeitos crônicos.

A avaliação sobre a saúde humana do efeito destas substâncias presentes na água é muito difícil, pois as concentrações encontradas são em nível de traços. A experimentação animal tradicional não é, em muitos casos, apropriada para elucidar todos os riscos que estas substâncias apresentam a saúde humana. Uma alternativa que vem sendo utilizada no controle de águas destinadas ao consumo humano são os testes de citotoxicidade. A nível de célula humana existem dois tipos de toxicidade:

- Efeito da toxicidade metabólica que intervém sobre o metabolismo celular inibindo reações enzimáticas. Somente se produz por uma concentração mínima do xenobiótico, sendo reversível pela eliminação do agente tóxico;
- Efeito genotóxico que intervém sobre as informações genéticas da célula (contidas no DNA) modificando-as definitivamente.

Os estudos de citotoxicidade (Matias et al., 1996, 1998a, 1998b) das águas avalia a toxicidade de elementos ou compostos químicos nelas contidos, mas poucos pesquisadores abordam as águas destinadas ao consumo humano. No plano sanitário é importante controlar a potencialidade tóxica da água distribuída ao consumidor, tanto quanto os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Além do controle dos mananciais já contaminados, pode-se também diminuir e até mesmo evitar a contaminação através de controles que incluem a administração correta do resíduo, verificando se este é solúvel em água ou se é retido pelo solo, seleção das variedades resistentes, uso de armadilhas nas plantações, aplicação eficiente dos pesticidas, uso de predadores naturais, com conseqüente redução do uso dos pesticidas que é um dos melhores modos de proteger peixes e os recursos da vida animal.

## CAPÍTULO IV

### 4 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- a) Para os testes definitivos com carbofuran utilizando *Poecilia reticulata* a Concentração Letal Média (CL50) 48 horas encontrada foi igual a  $164,9 \mu\text{g/L} \pm 40,46$ . Concentrações abaixo de  $150 \mu\text{g/L}$  mostraram mortalidade inferiores a 20%, portanto não causando efeitos agudos, porém apresentando indícios para estudos de efeitos crônicos.
- b) Comparando-se o resultado do número de peixes mortos por período de observação, nos diferentes testes definitivos com carbofuran, por meio de análises utilizando o método estatístico ANOVA - fator único, constatou-se que não houve diferenças significativas nos resultados encontrados nos diferentes testes.
- c) Os sintomas observados nos peixes durante os testes com carbofuran, confirmam os citados pela literatura: conseqüências sobre as transmissões nervosas com aparecimento de movimentos acelerados e irregulares e nascimentos prematuros, culminando com a morte dos indivíduos.
- d) O valor de CL50 -48horas para carbofuran igual a  $164,9 \mu\text{g/L} \pm 40,46$ , utilizando *Poecilia reticulata*, é superior a concentração máxima de carbofuran detectada nas águas do rio Cubatão nos períodos de experimentos. Mesmo sabendo que não foram detectados concentrações acima do limite máximo permitido pela legislação, salientamos que o estudo realizado por Gicquel et al. (1997) apresenta uma série curta de análises podendo não ser representativa da realidade.
- e) Nos testes definitivos com carbofuran utilizando *Daphnia magna*, a Concentração Efetiva Média (CE50) 48 horas encontrada foi igual a  $18,76 \mu\text{g/L} \pm 6,43$ . Os resultados dos testes de sensibilidade e CE50 48 horas encontrados nos

testes definitivos mostraram a ocorrência de uma melhora na adaptação dos organismos ao laboratório e ao método de cultivo.

- f) Comparando-se o resultado do número de daphnias imóveis por período de observação, nos diferentes testes definitivos com carbofuran, por meio de análises utilizando o método estatístico ANOVA - fator único, constatou-se que não houve diferenças significativas nos resultados encontrados nos diferentes testes.
- g) O valor de CE50 -48horas para carbofuran igual a  $18,76 \mu\text{g/L} \pm 6,43$ , utilizando *Daphnia magna*, é superior a concentração máxima de carbofuran detectada nas águas do rio Cubatão nos períodos de experimento. Apesar desse resultado, as concentrações de carbofuran encontradas nas águas do rio Cubatão são passíveis de apresentar indícios para estudos de efeitos crônicos.

Como recomendações para trabalhos futuros, sugere-se:

- Estudos de toxicidade crônica com peixes e microcrustáceos
- Utilização de outros reativos biológicos de diferentes níveis tróficos
- Avaliação da possibilidade de ocorrência de bioacumulação e bioamplificação.
- Estudos do potencial mutagênico e genotóxico do carbofuran empregando técnicas como Teste do Cometa, Micronúcleo, metilação biológica do DNA, lipoperoxidação etc.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Abstract Book: SETAC 17 TH Annual Meeting. Washington; Nov. 1996.  
<http://www.cciw.ca/green-lane/herpatox/setac-17.html>.
2. AgNIC - AGRICULTURAL NETWORK INFORMATION CENTER Data Base of Occurrence and Distribution of Pesticides in Chesapeake Bay. 1997.  
<http://waffle.nal.usda.gov/cbp/dbdesc.html>.
3. ALCANTARA, R. M. & VANIN, A.J. Armas Químicas. Química Nova, 15 (1), pp. 62-72, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
4. Aquaria Central. Guppy. 1997.  
<http://www.aquariacentral.com/fishinfo/fresh/guppy.htm>.
5. Aquários. Descrição dos peixes. <http://www.planetarium.com.br/betta/aquarios.htm>.
6. ARANA, L.V. Princípios Químicos da Qualidade da Água em Aqüicultura. Editora da UFSC, 166 p. Florianópolis, 1997.
7. ARAÚJO, R. P. A. & ZAGATTO, P.A. Orientação para manutenção, Cultivo e Realização de Testes de Toxicidade com *Daphnia*. CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 19??
8. BAYER-FHC. Entries-Active. Actives products. 1998.  
[Http:uscrop.bayer.com/farmchem/current\\_index.html](Http:uscrop.bayer.com/farmchem/current_index.html).
9. BROWN, L.R.; ALLEY, E.G. & COOK, D. W. Effect of Mirex and Carbofuran on Estuarine Microorganisms. Epa-660/3-75-024. U.S. Environmental Protection Agency, National Research Center, Corvallis, OR. 69 p. 1975.  
<http://earth1.epa.gov/ged/publica/c1202.htm>.

10. BUIKEMA, A. L. & SHERBERGER, S. R. Daphnia. Carolina Biological Supply Company. Vol. XL, No. 10, pp.37-40. 1977.
11. BUIKEMA, Jr. A. L.; NIEDERLEHNER, B. R. & CAIRNS, Jr. J. Biological Monitoring - Part IV - Toxicity Testing. Water Research. 16(3) : 239-262. 1982.
12. Carta online. Life Science: Fish – Guppy. Encarta Encyclopedia Article. 1998.  
<http://encarta.msn.com/index/concise/0vol2B/052ee000.asp>.
13. CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Água: Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia silimis* Claus., 1976 (Cladocera, Crustacea). São Paulo, 1986. 28 p. (Norma CETESB L5.018).
14. CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Água: Teste de Toxicidade Aguda com Peixes - Parte - Sistema Estático. São Paulo, 1987. 28 p. (Norma CETESB L5019-1).
15. CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Treinamento Prático especializado: Testes de Toxicidade com Organismos Aquáticos de Águas Continentais. 1988.
16. CHOMENKO, L. Utilização de Moluscos Gastrópodes do Rio Grande do Sul, Brasil, em Experimentos Toxicológicos como Bioindicadores para Avaliação Espacial. Acta Limnol. Brasil., Vol. 11, pp723-750. 1988.
17. Club-Fish-Livebearers. Guppy- *poecilia reticulata*.  
<http://www.users.globo.balnet.co.uk/~dhandy/liverbears.html>.
18. DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Fischen über Verdünnungsstufen, Norma DIN 38412 Teil 31. Berlin: DIN, 1989. (L31).
19. DIÁRIO OFICIAL. República Federativa do Brasil. Imprensa Nacional, Seção 1. Ano CXXXVI - Nº 151. Brasília - DF, 10 de agosto de 1998.

20. Dr. PEZ. Guppies de Selección. 1997. <http://www.drpez.com/drgupy2.htm>.
21. DRINKING WATER AND HEALTH. Carbofuran. National Primary Drinking Water Regulations. 1997. [Http://www.epa.gov/OGWDW/dwh/t-soc/soc-t.txt](http://www.epa.gov/OGWDW/dwh/t-soc/soc-t.txt).
22. DUGATKIN, L.A. Interface between culturally based preferences and genetic preferences: Female mate choice in *Poecilia reticulata*. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 93, Number 07; pp. 2770-2773. Evolution. 1996.
23. EXTTOXNET - Extension Toxicology Network. Carbofuran. USDA/Extension Service/National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program. pp. 1-6, Oregon State University, 1992.  
[Http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/carbaryl-dicrctophos/carbofuran-ext.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/carbaryl-dicrctophos/carbofuran-ext.html).
24. EXTTOXNET - Extension Toxicology Network. Carbofuran. USDA/Extension Service/National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program. pp. 1-7, Oregon State University, 1993.  
[Http://ace.ace.orst.edu/info/exttoxnet/pips/carbofur.p93](http://ace.ace.orst.edu/info/exttoxnet/pips/carbofur.p93).
25. First Martin Corporation - FMC. Carbofuran Data Summary: Furadan Insecticide-Nematicide. 94 p. 1977.
26. FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE – FATMA. Coletânea da Legislação Ambiental/Florestal. Legislação Federal/Legislação Estadual. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Urbano e do Meio Ambiente. Florianópolis, 1995.
27. GALLO et al. Método de Controle de Pragas: Métodos Químicos in: Manual de Entomologia Agrícola, 2. Ed. São Paulo, Ceres, p. 226-73. 1988.
28. GALVÃO, D.M. Catálogo dos Defensivos Agrícolas. Ministério da Agricultura/ Departamento Nacional de Produção Vegetal/ Divisão de Defesa Sanitária Vegetal/ Seção de Produtos Fitossanitários. Pp.105-109, 374. Ano 1997.



29. GELMINI, G.A. & NOVO, J. P.S. Defensivos Agrícolas: Informações Básicas e Legislação. Fundação Cargill. Campinas, São Paulo. 577 p. 1987.
30. GICQUEL, L.L.; LEÃO, J.C. & COSTA, R.H.R. Investigation of the Cubatão River Contamination by Carbamates and Triazines. International Conference On Sustainable Agriculture In Tropical And Subtropical Highlands With Special Reference To Latin America. Rio de Janeiro/Brazil. 9-13 March 1998.
31. GILLIOM, R.J. Pesticides in Surface Waters. National Water Quality Assessment/Pesticide national Synthesis Project. U.S Geological Survey Fact Sheet FS-039-97. 1997.
32. GIUST, W.M. Defensivos. Associação de Crédito e Assistência Rural de Santa Catarina – ACARESC. Vinculada a Secretaria da Agricultura e Abastecimento. 24 p. Florianópolis, 1978.
33. GOLDSTEIN, E.G. ; FERNICOLA, N.A.G.G.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P. & MOURA, M.C.N. Contribuição da Toxicologia Ambiental para O Controle da Poluição das Águas. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Fortaleza, 1981.
34. GÓMEZ, J.C. GUPPY: *Poecilia reticulata*. WEB ACUARIOFILIA *Cassarius auratus* [cassarius.htm]. 1998 .<http://www.ciudadfutura.com/peces/guppy.htm>.
35. GUPTA, R.C. Carbofuran toxicity. J. Toxicol. Environ. Health. 43(4):383-418; 1994.
36. HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C. and THURSTON, R. V., 1977. Trimed Spearman - Karber Method for estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7) 714 - 719. Correction 12 (4) 417 (1978).

37. HOWARD, P. H. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data For Organic Chemicals. Ed. Lewis Publishers. Volume III. Pesticides. Michigan. USA. P. 73-83. 1989.
38. INSTITUTO EUVALDO LODE -IEL. Sistema Internacional de Unidades - SI.:Unidade de Medida. Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Volume 8. 80p. Rio de Janeiro. 1994
39. KEARNEY ,P.C. IUPAC Commission on Terminal Pesticide Residues: Terminal Carbamate Residues. Journal of the AOAC . Vol. 59, No. 4, pp.881-882; 1976.
40. KENDALL, R. J. Farming with agrochemicals – The Response of Wildlife. ES&T SERIES. Environm. Sci. Technol., Vol. 26 , No. 2, p. 239-245, 1992.
41. LABCHUK, S. P.E.I. Pesticide Update – The Case Against Carbofuran. The PEI propaganda journal. November, 1997.  
<http://www3.pei.sympatico.ca/brad/carbofur.html>.
42. LARINI, L. Toxicologia dos Inseticidas. Ed. Sarvier. São Paulo. 171 p. 1979.
43. Laurel Lake Guppy Hatchery. Facts on the Fancy Guppy-Requirements, Raising & Breeding. 1996. <http://www.guppies.com/facts.shtml>.
44. LEÃO, J. C. Estudo do Movimento do Carbofuran no Perfil de Um Solo Agrícola. Dissertação de Mestrado. Depto Eng. Sanitária e Ambiental. UFSC. Florianópolis, SC. 1997.
45. LIMA, O. S. Utilização de Planárias de Água Doce como Indicadores Biológicos de Quaidade das Águas. Revista DAE, Vol. 45, No. 141, p. 164, junho de 1985.
46. LING, C.F.; MELIAN, G.P.; JIMENEZ-CONDE, F. & REVILLA, E. High-performance liquid chromatographic analysis of carbofuran residues in tomatoes grown in hydroponics. J. Chromatogr. 643(1-2):351-355; 1993.

47. MABURY, S.A.; COX, J.S. & CROSBY, D.G. Environmental fate of rice pesticide in California. Ver. Environ. Contam. Toxicol., 147:71-117. 1996.
48. MACHADO, P.A.L. Direito Ambiental Brasileiro. 5ª Ed. Revista Atualizadas e Ampliada. 696 p. 1995.
49. MATIAS, W.G. ; COSTA, R.H.R. & PANITZ, C. Estudo da Eficiência da Estação de Tratamento de Esgoto da CELESC, utilizando bioensaios. Arquivos do Laboratório de Toxicologia Ambiental - UFSC, 1992.
50. MATIAS, W. G.; BONINI, M. & CREPPY, E.E. Inhibition of protein synthesis in a cellfree system and Vero cells by okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin. J. Toxicol. Environ. Health. 48: 101-109. 1996.
51. MATIAS, W. G. & CREPPY, E.E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. Environmental Toxicology and Water Quality. 13: 83-88. 1998<sup>a</sup>
52. MATIAS, W. G. & CREPPY, E.E. Lipoperoxidação induzida pelo ácido ocaáico, uma toxina marinha promotora de tumores, em cultura de células Vero: Proteção pela superóxido dismutase + catalase, vitamina C e vitamina E. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 04: 40-44. 1998<sup>b</sup>.
53. MILES, J.R.W.; TU, C.M. & HARRIS, C.R. J.Environ. Sci. Health. 6(4), pp. 409 – 17. 1981.
54. MOORE, W. JAWS Breeding Info- *Poecilia reticulata*.  
wysiwyg://6/http://www.badgerstate.com/JAWS/breeding-  
info/poecilia\_reticulata.html.
55. MUCCI, J.L.N.; DAMATO, M.; MALAGRINO, W. & ROCHA, A.R. Estudos Comparativos da Ação Tóxica de Efluentes da Indústria Petroquímica Sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivipara* (Pisces: Poeciliidae). Revista DAE, São Paulo. Vol. 47, No. 150. Pp.275. Dezembro, 1987.

56. MUKHOPADHYAY, P.K.; MUKHERJI, A.P. & DEHADRAI. Certain biochemical responses in the Air-breathing catfish *Clarias batrachus* exposed to sublethal carbofuran. Toxicology, 23. pp. 337- 345. 1982.
57. NORMAS E MANUAIS TÉCNICOS II. Praguicidas em Saúde Pública. Ministério da Saúde. Brasília. Pp. 13-21. 1982.
58. OHS - Occupational Health Services. MSDS for Carbofuran. OHS Inc., Secaucus, NJ. Oct 29, 1991.
59. OPAS/OMS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília. 69 p. 1997.
60. OSHEIM, D. L. ROSS, P. F.; KECK, L. D. & TIPTON, B. L. Carbofuran Toxicosis in Cattle: case histoty and analytical method. Vet. Hum. Toxicol. 27(5):386-387; 1985.
61. PALMER, W. E.; BROMLEY, P.T. & ANDERSON, J.R.Jr. Pesticides & Wildlife-Small Grains. Department of Entomology, NCSU. 1992.  
[http://ipm.www.ncsu.edu/wildlife/small\\_grains\\_wildlife.html](http://ipm.www.ncsu.edu/wildlife/small_grains_wildlife.html).
62. PARRISH, P.R.; DYAR, E.E.; LINDBERG, M.A.; SHANIKA, C.M. & ENOS, J.M. Chronic Toxicity of Methoxychlor, Malathion, and Carbofuran to Sheepshead Minnows (*Cyprinodon variegatus*). Epa-600/3-77-059. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, FL. 36 p. 1977. <http://earth1.epa.gov/ged/publica/c1102.htm>.
63. PARRISH, P.R. Acute Toxicity Tests. In: G.M. Rand & S.R. Petrocelli (eds.). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publ. Co. Washington. P.32-36. 1985.
64. PASCHOAL, A.D. Pragas, Praguicidas & A Crise Ambiental: Problemas e Soluções. Fundação Getúlio Vargas. 101 p., 1979.

65. PILINSKAIA, M.A. & STEPANOVA, L.S. [Effect of the biotransformation of the insecticide furadan on in vivo and in vitro manifestations of its cytogenetic activity]. Tsitol Genet. 18(1):17-20; 1984.
66. PINTO, W. de D. Legislação Federal de Meio Ambiente: Substâncias Químicas – 10.1. Agrotóxicos. Volume I, pp. 1273-1340, Brasília, 1996 a.
67. PMEP - The Pesticide Management Education Program at Cornell University -. Carbofuran. Page 9, 1984. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/cadusafos-cyromazine/carbofuran/insect-prof-carbofuran.html>.
68. POLLUTED WATERS – TOXICITY TO FISH/Test Materials – pp. 572-575
69. ROLLINS, D.; FUCHS, T.W. & WINN, J. Reducing Pesticide Risks to Wildlife in Small Grains and Sorghum. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System. Pp. 1-9. 1997.
70. RONDAY, B.; KAMMEN-POLMAN, A.M.M.; DEKKER, A.; HOUX, N.W.H. & LEISTRA, M. Persistence and Toxicological Effects of Pesticides in Topsoil: Use of the Equilibrium Partitioning Theory. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 16, No. 4, pp. 601-607, 1997.
71. SANTOJANNI, A.; GORBI, G. & SARTORE, F. Prediction of Mortality in Chronic Toxicity Tests on *Daphnia magna*. Wat. Res. Vol. 29, No. 6, pp 1453-1459, 1995.
72. SAXENA, P.K & MANI, K. Effect of safe concentrations of some pesticides on testicular recrudescence in the freshwater murrel, *Channa punctatus* (BI): a morphological study. Ecotoxicol. Environ. Saf. 14(1):56-63; 1987.
73. SEWELL, G. H. (1993). Administração e Controle da Qualidade Ambiental. São Paulo: EPU: Ed. da Universidade de São Paulo: CETESB, 1978.
74. SOUZA CRUZ. Agrotóxicos Informações Para Uso Médico: Sintomas de Alerta e Tratamento das Intoxicações. 1ª Ed. 1993 a.

75. SOUZA CRUZ. Agrotóxicos: Orientações, Uso e Cuidados. 16p. 1993 b.
76. STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 18<sup>o</sup> ed., America Public Health Association, washington, 1995.
77. SWAYER C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. Chemistry for Environmental Engineering. 4th ed. McGraw-Hill, Inc, New York. 1994.
78. TALEKAR, N. A.; SUN, L. T.; LEE, E.M. & CHEN, J.S. J. Agric. Food Chem. 25(2). Pp. 348-52. 1977.
79. USDA - United States Department of Agriculture, Soil Conservation Service. SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database: Version 2.0 (summary). – Soil Conservation Service, Syracuse, NY. Nov. 1990.
80. USEPA - United States Environmental Protection Agency. Health Advisory Summary for Carbofuran., Washington, DC. Jan. 1989.
81. ZAGATTO, P.A. Sensibilidade de *Daphnia similis*: Controle de Qualidade de Culturas. Ambiente, Vol. 2, No. 2, pp. 79-82. 1988.

## **APÊNDICE A**

### **Técnicas de Análises**

## ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA TESTES DE TOXICIDADE COM PEIXES

A água de diluição é uma água reconstituída, preparada pela dissolução de sais em água destilada ou deionizada. A água de diluição deve ter  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$ ; dureza total de 40 a 48 mg/L em  $\text{CaCO}_3$  e condutividade aproximadamente de 160  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

As Normas para peixes da CETESB (1987) foram adaptadas, nas condições do laboratório, utilizando-se de modificações nas concentrações dos sais, a partir das Normas para *Daphnias* da CETESB (1987), com o objetivo de se obter os valores exigidos para pH, dureza e condutividade.

### Preparo da água de diluição

Para o preparo da água de diluição utilizar água destilada ou deionizada, com condutividade menor que 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### • Solução 1

Sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).....1,5 g

Água destilada.....1000 mL

#### • Solução 2

Cloreto de potássio (KCl).....0,2 g

Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ).....4,8 g

Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).....6,1 g

Preparar a água de diluição adicionando 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água destilada ou desionizada.

Anota-se o número do lote da água, na ficha de controle; introduz-se aeração durante pelo menos 24 horas, para a solubilização e manutenção da saturação de oxigênio dissolvido e pH.



Antes de qualquer uso, registram-se os teores de oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza total. Caso o pH esteja fora da faixa de  $7.4 \pm 0.2$ , este poderá ser ajustado com soluções de ácido clorídrico, HCl 1N ou hidróxido de sódio NaOH 1N. Após o acerto de pH, a água não deve ser mais aerada. Se a dureza estiver fora da faixa 40 a 48 mg/L em CaCO<sub>3</sub>, esta água deve ser desprezada e um novo lote deve ser preparado.

### PREPARO DO MEIO DE CULTIVO DE *Daphnia magna*

A água de cultivo segue a Norma DIN.

Os organismos-teste devem ser cultivados no meio descrito neste item. Para estas águas a dureza total é de  $250 \pm 25$  mg/L expressas em CaCO<sub>3</sub> razão Ca/Mg  $\cong$  4:1, o pH =  $7,8 \pm 2$  e Oxigênio Dissolvido (OD) acima de 80% de saturação.

#### a) MEIO BÁSICO

Solução 1.1 Solução de CaCl <sub>2</sub> 73,52 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Dissolvido em 1 litro de água destilada
Solução 1.2 Solução de MgSO <sub>4</sub> 123,3 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Dissolvido em 1 litro de água destilada
Solução 1.3 Solução de KCl 5,8g KCl	Dissolvido em 1 litro de água destilada
Solução 1.4 Solução de NaHCO <sub>3</sub> 64,8g NaHCO <sub>3</sub>	Dissolvido em 1 litro de água destilada Efetuar filtração estéril na solução

**MEIO M4 (M4-Medium)****2.1 Solução Catiônica**

3605mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3060 mg LiCl 710 mg RbCl 1520 mg $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 167,5 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$ 130 mg $\text{ZnCl}_2$ 100 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Dissolver para 1 litro de água bidestilada.  * Pesar em vidro ou parafilm * Não usar papel alumínio
--	--

**2.2 Solução Aniônica**

548 mg - $\text{NaNO}_3$ 5719 mg - $\text{H}_3\text{BO}_3$ 32 mg - NaBr 126 mg - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,5 mg - KI 4,38 mg - $\text{NaSe}_2\text{O}_3$ 1,15 mg - $\text{NH}_4\text{VO}_3$	Completar para 1 litro de água bidestilada
---	--

**2.3 Solução de Silicato**

21,465 mg - $\text{Na}_2\text{SiO}_3$	Dissolver em um litro de água bidestilada, deixando em agitação até o clareamento da solução. Após, efetuar filtração estéril.
---------------------------------------	--

**2.4 Solução de Fe/EDTA**

500 mg - Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	Preparar as soluções separadamente, cada uma com 500 mL de água bidestilada.  Após , mistura as duas soluções e levar imediatamente para autoclave a 121°/15 minutos.
199,1 mg FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	

**2.5 Solução de Fosfato**

286 mg - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Preparar para 1 litro de água bidestilada
368 mg - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	

**2.6 Solução Vitamínica**

750 mg - Hidrocloreto de Tiamina	Completar para 1 litro de água bidestilada. Estocar no freezer em pequenas porções e em recipiente fechado
10 mg - Cianocabalina	
7,5 mg - Biotina	

**c) Preparo para uso de 10 litros do Meio BÁSICO/M4, para Dureza total de 80 mg/L**

40 mL da solução básica 1.1

10 mL da solução básica 1.2

10 mL da solução básica 1.3

10 mL da solução básica 1.4

1 mL da solução catiônica 2.1

5 mL da solução aniônica 2.2

2 mL da solução de silicato 2.3

50 mL da solução de Fe/EDTA 2.4

5 mL da solução de fosfato 2.5

1 mL da solução Vitamínica 2.6, descongelada e imediatamente adicionada.

As soluções acima são adicionadas para um volume de 10 litros de água destilada, deionizada ou bidestilada, misturadas na ordem , uma a uma. Para saturação de oxigênio, deixar aerar pelo menos 24 horas antes da utilização. A correção do pH deve ser feita com soluções de NaOH e HCL 1 N.

### **PREPARO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA *Daphnia magna* EM TESTES DE TOXICIDADE**

Preparar utilizando somente as soluções do meio básico. aerar até a saturação do oxigênio.

A água de diluição deve permitir a sobrevivência dos organismos no mínimo 48 horas sem alimentação. Para estas águas a dureza total é de  $250 \pm 25$  mg/L expressas em  $\text{CaCO}_3$  razão Ca/Mg  $\cong$  4:1, o pH =  $7,8 \pm 2$  e Oxigênio Dissolvido (OD) acima de 80% de saturação.

#### **a) MEIO BÁSICO**

<p><b>Solução 1.1</b> Solução de <math>\text{CaCl}_2</math> 73,52 g <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></p>	<p>Dissolvido em 1 litro de água destilada</p>
--	--

<b>Solução 1.2</b> Solução de $MgSO_4$ 123,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Dissolvido em 1 litro de água destilada
<b>Solução 1.3</b> Solução de KCl 5,8g KCl	Dissolvido em 1 litro de água destilada
<b>Solução 1.4</b> Solução de $NaHCO_3$ 64,8g $NaHCO_3$	Dissolvido em 1 litro de água destilada Efetuar filtração estéril na solução

### MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE *Scenedesmus subspicatus*

Para a produção contínua de culturas unialgais, em fermentadores, como fonte de alimento para *Scenedesmus subspicatus*, foi seguido o procedimento descrito na Norma DIN e CETESB (1987).

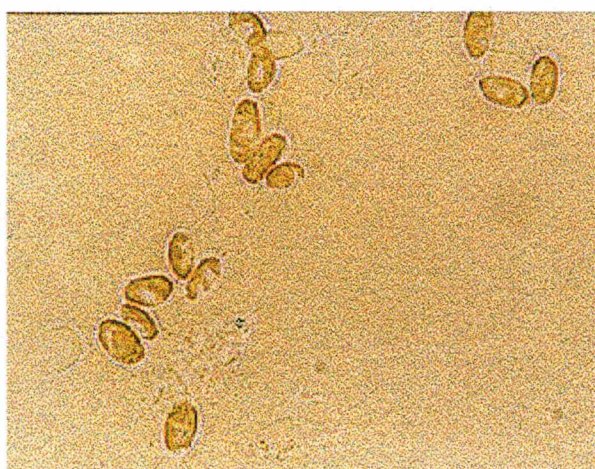


Figura .1a - *Scenedesmus subspicatus*

## MEIO CHU

Solução estoque	Substância	Peso	Água
Solução I	NaNO <sub>3</sub>	25 g	1000 mL
Solução II	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5 g	1000 mL
Solução III	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5 g	1000 mL
Solução IV	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g	1000 mL
Solução V	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5 g	1000 mL
Solução VI	NaCl	2,5 g	1000 mL
Solução VII	Tritriplex KOH	31 g	1000 mL
Solução VIII	FeSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,49 g	500 mL*
Solução IX	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,71 g	500 mL
Solução X	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O MoO <sub>3</sub> CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	8,82 mg 1,44 mg 0,71 mg 1,57 mg 0,49 mg	1000 mL

\* acidificar a solução com 1 mL de HCl 1N

A partir das soluções-estoques (mantidas em refrigerador a - 4°C). listadas acima preparou-se o meio de cultura para manutenção de culturas estoque e culturas em fase exponencial de crescimento, que foram servidas frescas diariamente aos organismos.

## 2. Modo de preparo do Meio de cultura líquido CHU

10 mL/litro das soluções I a VI

1 mL/litro das soluções VII a X

Adicionou-se as soluções uma a uma no próprio frasco do fermentador, misturando-as bem. O frasco foi, então, tampado, os tubos de borracha de silicone fechados com pinças para prevenir que o meio seja expelido durante a autoclavagem e o tubo com rosca levemente fechado. Em seguida, o fermentador foi autoclavado durante 20

minutos a uma temperatura de 120°C. O inóculo foi adicionado ao fermentador utilizando técnicas assépticas.

Após a inoculação o fermentador foi conectado ao suprimento de ar (Filtro de ar coalescente Schrader Bellows - Parker), incubar a temperatura de  $24 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , com iluminação constante de aproximadamente 2000 lux.



Figura IIa - Fermentador para cultura de *Scenedesmus subspicatus*.

## **APÊNDICE B**

Tabelas com resultados dos parâmetros físico-químicos



Tabela Ib Médias dos parâmetros físico-químicos nos testes de dicromato de potássio com *Poecilia reticulata*

Concentração (mg/L)	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	O.D. (mg/L)
Controle	149,11	22,54	7,32	5,26
56	207,69	22,41	6,41	5,57
110	257,64	22,41	6,04	18,67
320	398,38	22,39	5,64	5,63
480	507,00	22,36	5,25	5,51
800	672,63	22,28	5,13	5,17

Tabela IIb Médias dos parâmetros físico-químicos nos testes preliminares com carbofuran utilizando *Poecilia reticulata*

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	O.D. (mg/L)
controle	146,94	22,7	7,38	3,82
28	147,9	23,1	7,26	
110	145,2	23,3	7,35	4,19
120	152,75	23,9	7,6	4,5
130	144,5	23,2	7,36	4,1
150	152,1	22	7,38	4,23
170	153,2	23,4	7,5	4,24
185	144,6	23,2	7,32	3,6
200	150	22,6	7,45	4,22
232	146,2	23,4	7,28	3,36
240	148,6	22	7,14	4,21
250	152,45	23,3	7,48	4,35
259	145,7	23,4	7,12	3,46
277	146,3	23,3	6,98	3,42
280	144,5	23,3	7,29	3,82
300	148,7	22,9	7,18	4,11
324	144,6	23,3	7,33	4,2
510	146,2	23,4	7,27	3,36
550	131,3	23,1	7,25	

Tabela IIIb Médias dos parâmetros físico-químicos nos testes definitivos com de carbofuran utilizando *Poecilia reticulata*

Início do Teste					
Concentração (µg/L)	Temp. (°C)	pH	cond. (µS/cm)	OD (mg/L)	Dureza (mg/L em CaCO <sub>3</sub> )
controle	23,00	7,34	153,1	5,36	42,60
70	23,42	7,48	152,2	4,47	46,25
100	23,40	7,55	152,6	4,85	46,25
150	23,45	7,59	152,8	4,75	45,30
200	23,48	7,64	153,5	4,80	44,35
300	23,45	7,66	154,1	4,67	44,25

Após 24 horas de observação				
Concentração (µg/L)	Temp. (°C)	pH	cond. (µS/cm)	OD (mg/L)
controle	23,43	7,25	160,2	4,93
70	23,40	7,35	162,5	4,51
100	23,40	7,42	161,6	5,03
150	23,45	7,46	160,2	5,92
200	23,43	7,47	160,2	5,23
300	22,77	7,42		4,87

Após 48 horas de observação				
Concentração (µg/L)	Temp. (°C)	pH	cond. (µS/cm)	OD (mg/L)
controle	22,60	7,33	174,4	4,10
70	23,25	7,31	166,1	3,98
100	23,25	7,27	167,9	4,17
150	23,25	7,28	164,9	3,98
200	23,25	7,28	165,3	4,38
300	24,00	7,33		3,59

Tabela IVb Média dos Resultados dos parâmetros físico-químicos controlados na água de diluição utilizada nos testes de sensibilidade com dicromato de potássio e nos testes preliminar e definitivo com carbofuran utilizando *Daphnia magna*

Parâmetros	valores
Dureza em mg/L de CaCO <sub>3</sub>	243,3
pH	7,73
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	7,0

## **APÊNDICE C**

**Tabelas com Análises Estatísticas**

Tabela Ic Número de peixes mortos em cada teste após um período de 24 horas de exposição ao dicromato de potássio

Concentração (mg/L)	Nº de peixes mortos em 24 horas							
	teste 1	teste 2	teste 3	teste 4	teste 5	teste 6	teste 7	teste 8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	1	0	0	0	0
110	1	1	2	0	0	1	1	0
320	5	5	5	5	4	4	5	4
480	5	5	5	5	5	5	5	5
800	5	5	5	5	5	5	5	5

Tabela Iic Análise de variância ANOVA fator único para os diferentes testes de sensibilidade, a partir do número de peixes mortos após um período de 24 horas de exposição.

## RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	16	2,667	6,667
Coluna 2	6	16	2,667	6,667
Coluna 3	6	17	2,833	6,167
Coluna 4	6	16	2,667	6,667
Coluna 5	6	14	2,333	6,667
Coluna 6	6	15	2,500	5,900
Coluna 7	6	16	2,667	6,667
Coluna 8	6	14	2,333	6,667

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,333	7	0,190	0,029	1,000	2,249
Dentro dos grupos	260,333	40	6,508			
Total	261,667	47				

Tabela IIIc Número de peixes mortos em cada teste após um período de 48 horas de exposição ao carbofuran nos teste definitivos

Concentração (µg/L)	Nº de peixes mortos em 48 horas					
	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5	teste6
0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0
100	3	1	2	1	0	1
150	7	6	7	0	2	4
200	10	9	8	2	5	6
300	10	10	10	10	8	10

Tabela IVc Análise de variância ANOVA: fator único para os diferentes testes definitivos, a partir do número de peixes mortos após um período de 48 horas de exposição

## RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	30	5,000	21,600
Coluna 2	6	26	4,333	21,067
Coluna 3	6	27	4,500	19,100
Coluna 4	6	13	2,167	15,367
Coluna 5	6	15	2,500	11,100
Coluna 6	6	21	3,500	15,900

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	39,333	5	7,867	0,453	0,808	2,534
Dentro dos grupos	520,667	30	17,356			
Total	560	35				

Tabela Vc Número de daphnias imóveis em cada teste após um período de 24 horas de exposição ao dicromato de potássio

Concentração mg/L	Nº de daphnias imóveis após um período de observação de 48 horas									
	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5	teste6	teste7	teste8	teste9	teste10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,7	2	1	4	2	1	4	2	0	0	0
0,9	6	5	6	4	5	5	7	1	1	2
1,1	7	9	9	6	7	9	9	3	5	6
1,3	9	7	10	10	9	8	10	9	7	10
1,5	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10
1,7	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabela VIc Análise de variância ANOVA: fator único para os diferentes testes de sensibilidade ao dicromato de potássio, a partir do número de daphnias imóveis após um período de 24 horas de exposição.

## RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	7	44	6,28571	15,5714
Coluna 2	7	41	5,85714	16,1429
Coluna 3	7	49	7	15
Coluna 4	7	42	6	17,3333
Coluna 5	7	42	6	17,3333
Coluna 6	7	46	6,57143	13,9524
Coluna 7	7	48	6,85714	17,4762
Coluna 8	7	33	4,71429	22,5714
Coluna 9	7	33	4,71429	19,9048
Coluna 10	7	38	5,42857	22,2857

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	40,3429	9	4,48254	0,25244	0,984467	2,0401
Dentro dos grupos	1065,43	60	17,7571			
Total	1105,77	69				

Tabela VIIc Número de daphnias imóveis em cada teste após um período de 48 horas de exposição ao carbofuran no teste definitivo

concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	N <sup>o</sup> de daphnias imóveis após um período de observação de 48 horas								
	teste1	teste2	teste3	teste4	teste5	teste6	teste7	teste8	teste9
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9,7	4	2	1	0	0	0	0	0	0
16,2	7	9	10	9	0	1	0	0	2
27	10	10	10	10	8	9	6	5	6
45	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabela VIIIc Análise de variância ANOVA para os diferentes testes com carbofuran a partir do número de daphnias imóveis após um período de 48 horas de exposição no teste definitivo

## RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	7	31	4,42857	21,2857
Coluna 2	7	31	4,42857	24,619
Coluna 3	7	31	4,42857	27,2857
Coluna 4	7	29	4,14286	26,8095
Coluna 5	7	18	2,57143	19,619
Coluna 6	7	20	2,85714	20,8095
Coluna 7	7	16	2,28571	16,5714
Coluna 8	7	15	2,14286	15,4762
Coluna 9	7	18	2,57143	15,619

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	57,0793651	8	7,13492	0,34139	0,94573	2,11522
Dentro dos grupos	1128,57143	54	20,8995			
Total	1185,65079	62				