

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
ENGENHARIA AMBIENTAL**

Raphael Campitelli Ramos

**Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 CE em ecossistemas  
de água doce por meio de estudos experimentais em laboratório e *in situ***

**São Carlos - SP**

**2013**

Raphael Campitelli Ramos

**Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 CE em ecossistemas de água doce por meio de estudos experimentais em laboratório e *in situ***

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

**Orientadora:** Prof. Dra. Odete Rocha

**São Carlos - SP**

**2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ramos, Raphael  
R175a Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 CE  
em ecossistemas de água doce por meio de estudos  
experimentais em laboratório e in situ / Raphael Ramos;  
orientadora Prof Odete Rocha . São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Engenharia Ambiental e Área de Concentração  
em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,  
2013.

1. Toxicidade do Vertimec. 2. Abamectina. 3.  
Poluição aquática. 4. Organismos-teste. 5. Escoamento  
superficial tóxico. 6. Mesocosmo. I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **RAPHAEL CAMPITELLI RAMOS**.

Título da tese: "Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 CE em ecossistemas de água doce por meio de estudos experimentais em laboratório e *in situ*".

Data da defesa: 10/06/2013

### Comissão Julgadora:

Profª. Drª. **Odete Rocha (Orientadora)**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFScar)

Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espindola**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Profª. Drª. **Eny Maria Vieira**  
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

Profª. Associada **Regina Teresa Rosim Monteiro**  
(Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP)

Drª. **Maria Beatriz Bohrer-Morel**  
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:  
Prof. Dr. **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

### Resultado:

Aprovado

Aprovado.

Aprovado

Aprovado.

Aprovado

*Dedico este trabalho:*

*À minha mãe, Maria Inês, por todo exemplo de luta, humildade e honestidade. E também pelo incansável apoio e incentivo ao estudo.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Odete Rocha, pela amizade, paciência, confiança e também pelos exemplos de cooperação e solidariedade.

A minha namorada Laira, pela paciência, companheirismo e fundamental colaboração em todas as fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, Departamento de Hidráulica e Saneamento, pelo convite e oportunidade referente ao desenvolvimento desta pesquisa junto ao projeto sob sua coordenação.

A Dr<sup>ª</sup> Clarice Maria Rispoli Bota Paschoal, NEEA, Universidade de São Paulo, pela amizade e colaboração durante a fase experimental realizada no CRHEA - USP.

Ao Dr. José Valdecir de Lucca, pela amizade, hospitalidade, conselhos e oportunidades durante os últimos anos.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Suzana Trivinho Strixino, do Departamento de Hidrobiologia da Universidade Federal de São Carlos, pelo auxílio referente à disponibilização de material bibliográfico e biológico e também por sempre colaborar e auxiliar na identificação dos macroinvertebrados bentônicos.

Ao biólogo Ricardo Milanetti Degani, pela amizade, hospitalidade e colaboração, principalmente em relação à elaboração e edição de mapas e imagens utilizadas no presente trabalho e também em outras publicações.

Aos técnicos do NEEA, principalmente ao Amandio, pela colaboração durante o desenvolvimento dos experimentos no CRHEA.

À Maria Luisa, técnica já aposentada do laboratório de Paleolimnologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, pela realização das análises granulométricas.

A todos os amigos da UFSCar e também da USP, que de alguma forma estiveram envolvidos na elaboração deste projeto, principalmente ao Lucas, Cláudia, Haroldo, André, Maressa, Adrislaine e Luciana.

A todos os amigos e amigas do DEBE: Fernanda, Denise, Ana Lúcia, Roberta, Edna, Lidi, Natália, Renata, Raquel, Marcos, Dani, Maíra, Magno, Airton, Alcídio e Luizinho.

Aos verdadeiros amigos que conheci ao longo destes anos aqui em São Carlos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A toda minha família que de alguma forma contribuiu para o desenvolvimento e finalização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

“A vida esconde nos lugares mais simples  
sua grande beleza que revela qual  
o significado de porque persistimos  
em continuar vivendo”

(Pablo Neruda)

## Resumo

---

O pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é amplamente utilizado no controle de pragas na agricultura como inseticida, nematicida e acaricida. Embora aplicado sobre plantações agrícolas, ele pode atingir os sistemas aquáticos via escoamento superficial e afetar muitas espécies não-alvo. Um experimento simulando o escoamento sobre um campo contaminado consistiu em duas áreas separadas por uma distância de 6,0 metros, uma não-contaminada servindo como controle, e a outra contaminada com 0,125 L m<sup>-2</sup> de Vertimec por meio de um pulverizador manual. As amostras do lixiviado oriundo do escoamento foram coletadas na parte inferior das áreas experimentais em declive. Uma fração das amostras foi utilizada para análises físicas e químicas e para realização de testes de toxicidade aguda em laboratório, e o restante da amostra foi inoculado em 12 câmaras cilíndricas, imersas em um tanque preenchido com a água da represa do Lobo, localizado em um mesocosmo construído em área próxima. Além da realização de um ensaio crônico *in situ*, também investigamos os efeitos de amostras ambientais oriundas dos mesocosmos a partir de ensaios agudos e crônicos realizados em laboratório com diferentes espécies de invertebrados aquáticos. Três espécies de invertebrados foram utilizadas como organismos teste neste estudo: *Chironomus sancticaroli* (Insecta Diptera), *Hydra viridissima* (Cnidaria, Hydridae) e *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria). Os valores de LC<sup>50</sup> 96h para o pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18EC foram: 0,14 mL L<sup>-1</sup> (2,52 mg L<sup>-1</sup> de abamectina) para *H. viridissima*, 0,28 mL L<sup>-1</sup> (494,0 µg L<sup>-1</sup> de abamectina) para *G. tigrina* e 0,54 10<sup>-5</sup> mL L<sup>-1</sup> (97,0 ng L<sup>-1</sup> de abamectina) para *C. sancticaroli*. Estes resultados indicam que *C. sancticaroli* tem uma sensibilidade muito mais elevada a este pesticida do que as outras espécies testadas. No experimento em mesocosmos foi observado que no tratamento onde foi inoculado o lixiviado oriundo da área contaminada, o comprimento e a largura do corpo e da cápsula cefálica das larvas sobreviventes foram menores quando comparadas a dos indivíduos que foram expostos aos controles, evidenciando que a exposição crônica ao Vertimec via lixiviado oriundo da área contaminada afetou o crescimento das larvas de *C. sancticaroli*. Além disso, algumas larvas no mesocosmo contaminado (via runoff) tiveram deformidades no mento (4,2%). As análises referentes à comunidade de macroinvertebrados bentônicos total nos mesocosmos ao final do experimento mostraram que no tratamento com aplicação direta do Vertimec houve 100% de mortalidade de *C. sancticaroli* e um decréscimo de quase 80% na riqueza de táxons e na densidade total da comunidade bentônica quando comparada com a comunidade no controle. Nenhum táxon pertencente à Classe Insecta foi registrado no tratamento contaminado diretamente pelo contaminante utilizado corroborando a elevada toxicidade deste inseticida. Considerando todos os resultados, podemos concluir que o Vertimec<sup>®</sup> 18EC é altamente tóxico à comunidade de macroinvertebrados bentônicos e que os ecossistemas aquáticos contaminados

com o escoamento superficial de áreas agrícolas com aplicação deste pesticida serão adversamente afetados.

Palavras-chave: Toxicidade do vertimec, abamectina, poluição aquática, organismos-teste, lixiviado tóxico, mesocosmo.



## Abstract

---

The pesticide Vertimec® 18EC is largely used to control pests in agriculture acting as insecticide, nematicide and acaricide. Although applied in agricultural lands it can reach the aquatic systems via surface runoff and affect many non-target species. A field experiment simulating the runoff over a field plot contaminated which consisted of two 6 m apart agricultural plots, one non-contaminated, acting as control, and the other contaminated with 0.125 L m<sup>-2</sup> of Vertimec using a backpack sprayer. Runoff samples were collected downstream the plots. One fraction was used for physical and chemical analysis and laboratory acute toxicity tests and the remaining sample was inoculated in 12 cylindrical chambers, immersed in a water tank filled with Lobo Reservoir water, in a nearby constructed mesocosm. Three species of freshwater invertebrates were used as test-organisms in this study: *Chironomus sancticaroli* (Insecta, Diptera), *Hydra viridissima* (Cnidaria, Hydridae) and *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria). The values of LC<sub>50</sub> 96 h for Vertimec® 18EC were: 0.14 mL L<sup>-1</sup> (2.52 mg L<sup>-1</sup> of abamectin) for *H. viridissima*, 0.028 mL L<sup>-1</sup> (494 µg L<sup>-1</sup> of abamectin) for *G. tigrina* and 0.54 10<sup>-5</sup> mL L<sup>-1</sup> (97 ng L<sup>-1</sup> of abamectin) para *C. sancticaroli*. These results indicate that *C. sancticaroli* has a much higher sensitivity to this pesticide than the other species tested. In the experiments in mesocosms it was found that in the highest concentration tested, the length and width of the body and cephalic capsules of the larvae in the contaminated runoff were smaller than those of the larvae from both, the control and non-contaminated runoff, evidencing that the chronic exposure to the Vertimec contaminated runoff affected adversely the growth of *C. sancticaroli* larvae. In addition some larvae in the contaminated mesocosm had mentum deformities (4.2%). The analyses of the whole community in the mesocosms at the end of the experiment showed that in the treatment with direct application of Vertimec, there were 100% mortality of all *C. sancticaroli* inoculated larvae, and almost 80% decrease in the richness of taxa and in the total density of benthic organisms when compared with the community in the control. No taxa belonging to the Class Insecta were recorded in the contaminated treatment corroborating the strong toxicity of this insecticide. From all results obtained we conclude that Vertimec® 18EC is highly toxic to benthic macro-invertebrates community and that aquatic ecosystems contaminated by agricultural runoff with this pesticide will be adversely affected.

Key words: vertimec toxicity, abamectin, aquatic pollution, test-organisms, toxic runoff, mesocosms.

## SUMÁRIO

<i>Estruturação da tese</i>	1
<i>Contextualização e justificativa da pesquisa</i>	3
1. Introdução	3
2. Objetivo	11
3. Referências bibliográficas	12

### **CAPÍTULO 1**

#### ***O lixiviado produzido em campos agrícolas simulados tratados com Vertimec® 18 CE é tóxico para a biota aquática? – Experimentos em mesocosmos e em laboratório***

Resumo	20
1. Introdução	22
2. Materiais e métodos	23
3. Resultados	27
4. Discussão	31
5. Conclusões	33
6. Referências bibliográficas	34

### **CAPÍTULO 2**

#### ***Estudos de Campo em Mesocosmos e em Laboratório para a Avaliação dos efeitos tóxicos de Vertimec® 18 CE sobre a comunidade bentônica, com ênfase em Chironomus sancticarloi***

Resumo	41
1. Introdução	44
2. Materiais e métodos	46
3. Resultados e discussão	53
4. Conclusões	69
5. Referências bibliográficas	70

### **CAPÍTULO 3**

#### ***Testes de toxicidade aguda em laboratório para avaliar os efeitos do pesticida Vertimec® 18 CE sobre a biota aquática utilizando a espécie de água doce Hydra viridissima (Cnidaria, Hydrozoa) como um organismo-teste***

Resumo	81
1. Introdução	84
2. Materiais e métodos	86
3. Resultados e discussão	90
4. Conclusões	100
5. Referências bibliográficas	101

### **CAPÍTULO 4**

#### ***A toxicidade aguda do pesticida Vertimec® 18 CE para a planária de água doce Girardia tigrina (Platyhelminthes, Turbellaria)***

Resumo	109
1. Introdução	111
2. Materiais e métodos	112

3. Resultados e discussão	115
4. Conclusões	124
5. Referências bibliográficas	125
<i>Conclusões Gerais</i>	133
<i>Apêndice A</i>	135

---

## Estruturação da tese

---

Esta tese refere-se a um estudo ecológico realizado como parte de um projeto mais abrangente desenvolvido no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, campus de São Carlos. O projeto teve como objetivo geral avaliar os impactos ambientais decorrentes do uso de pesticidas em sistemas agrícolas e os efeitos colaterais dessa atividade para os ecossistemas aquáticos continentais, com ênfase nos diferentes níveis de organização: indivíduos, populações e comunidades.

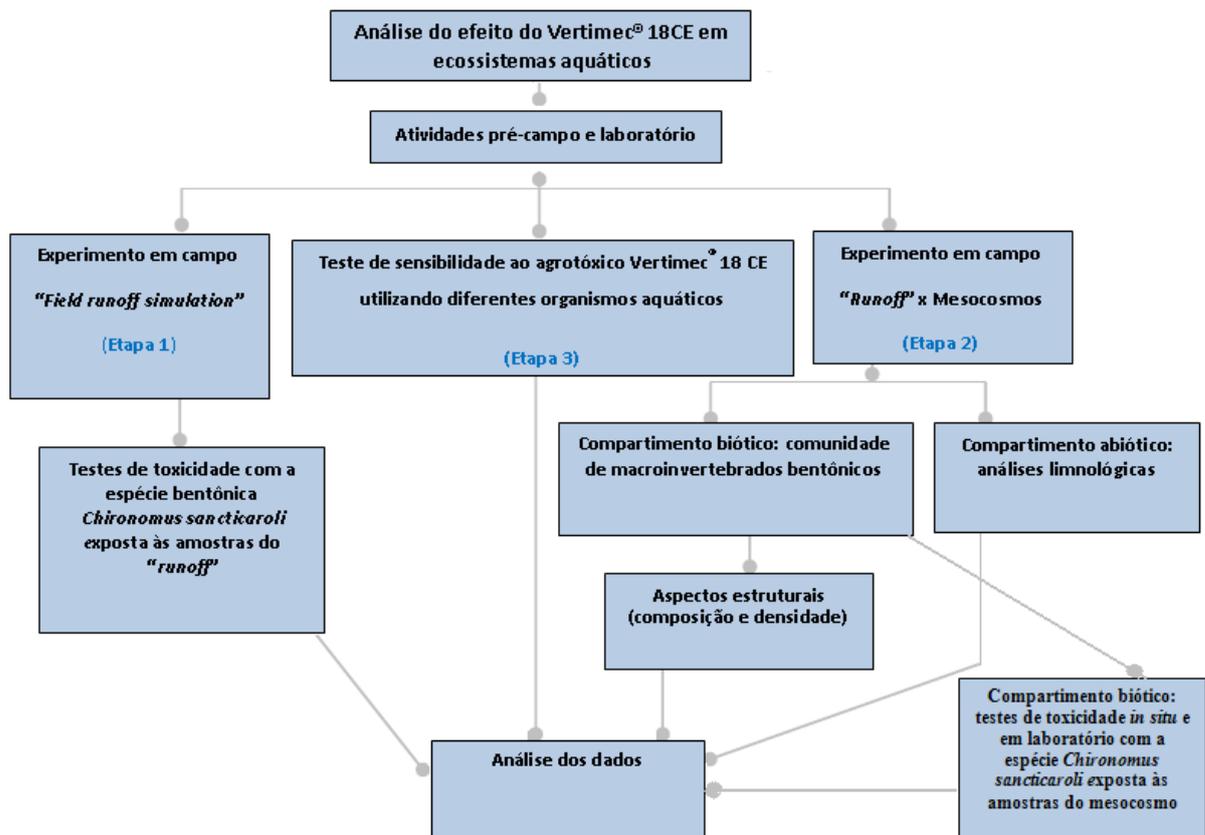
Os estudos aqui apresentados referem-se especificamente à comunidade de macroinvertebrados bentônicos em mesocosmos e a espécies de invertebrados aquáticos pertencentes à comunidade bentônica ou à fauna associada às macrófitas, utilizados como organismos-teste em bioensaios ecotoxicológicos.

A tese foi estruturada em um modelo misto com a Introdução, os Objetivos Gerais e as Referências das partes iniciais separadas em ítems e o restante organizado na forma de quatro capítulos cada um contendo Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusões e referências bibliográficas próprias, já na forma de manuscritos de trabalhos que depois de revisados serão submetidos para publicação em periódicos especializados. Contém ainda breves conclusões gerais e um anexo.

Os capítulos relativos aos manuscritos compreendem dois estudos derivados do experimento de simulação em campo da aplicação direta do pesticida Vertimec sobre o solo e de um evento de *runoff* por meio de chuva artificial em intensidade e duração compatíveis com os níveis médios de chuvas registrados na Estação Meteorológica local. Os trabalhos oriundos deste experimento intitulam-se: “O lixiviado produzido em campos agrícolas simulados tratados com Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é tóxico para a biota aquática? – Experimentos em mesocosmos e em laboratório” e “Estudos de campo em mesocosmos e em laboratório para a avaliação dos efeitos tóxicos de Vertimec<sup>®</sup> 18 CE sobre a comunidade bentônica, com ênfase em *Chironomus sancticarli*” e são apresentados nos capítulos 1 e 2 respectivamente.

Os outros dois manuscritos apresentados compreendem estudos ecotoxicológicos referentes à avaliação da toxicidade do Vertimec a outros componentes da biota aquática e referem-se a estudos laboratoriais desenvolvidos no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos. Estes

trabalhos tiveram por objetivo testar a sensibilidade de duas outras espécies de organismos-teste e intitulam-se: Testes de toxicidade aguda em laboratório para avaliar os efeitos do pesticida Vertimec® 18 CE sobre a biota aquática utilizando a espécie de água doce *Hydra viridissima* (Cnidaria, Hydrozoa) como um organismo-teste e “A toxicidade aguda do pesticida Vertimec® 18 CE para a planária de água doce *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria)” e encontram-se apresentados nos capítulos 3 e 4 respectivamente.



**Figura 1.** Fluxograma resumido das etapas desenvolvidas no presente estudo.

## 1. Introdução

### 1.1 Contextualização da tese

A agricultura brasileira tem se destacado com números cada vez mais expressivos na produção, em área plantada, na exportação e na diversidade de tecnologias empregadas no campo. Tal crescimento levou também à utilização de maiores quantidades de pesticidas na produção agrícola, colocando o Brasil como o segundo maior consumidor mundial destes insumos em 2006 (ANVISA, 2006). Em 2010, o Brasil liderou o ranking mundial de consumo de pesticidas com o gasto anual de US\$ 7,1 bilhões, ante US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos (Pacheco, 2010).

Este uso intenso de agroquímicos tem ocasionado impactos ambientais crescentes e severos riscos à saúde humana, não só pelo uso excessivo, mas principalmente, pela ausência de medidas de segurança nos procedimentos adotados em suas aplicações e descarte de resíduos.

Dependendo das características ambientais e da maneira como é aplicado nas áreas agrícolas, o uso exacerbado de pesticidas possibilita o carreamento de contaminantes para os corpos de água superficiais ou a sua percolação para o lençol freático levando à contaminação de águas subterrâneas. Nas águas superficiais, sejam rios, lagos ou reservatórios, os pesticidas podem afetar diversas comunidades biológicas e o equilíbrio dos ecossistemas.

Atualmente o pesticida comercialmente denominado Vertimec<sup>®</sup> 18 CE vêm sendo bastante utilizado em culturas agrícolas para o controle de insetos, ácaros e nematóides (Kolar et al., 2008). Seu principal ingrediente ativo é a abamectina, um produto natural obtido a partir da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* descoberto em 1975 pela Merck & Co., Inc (Burg et al., 1979). A classificação toxicológica do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é na classe III, considerada como “medianamente tóxico”, porém este pesticida é considerado como um produto muito perigoso para o ambiente por ser altamente persistente e extremamente tóxico para microcrustáceos e peixes. Porém, informações a respeito dessa substância não são suficientes para comprovar se seus efeitos podem ou não oferecer riscos aos organismos não-alvo (Vieira, 2010).

Assim, com base em pequeno número de informações, diversos órgãos vêm permitindo o uso da abamectina e seus derivados em atividades agropecuárias enquanto que países como os Estados Unidos, Japão e Canadá já vetaram o uso de diversas substâncias

suspeitas de elevar os índices de câncer, mutações e também de causar diversos problemas neurológicos. No estado de São Paulo um projeto de lei em 2009 colocou em avaliação a utilização de 14 princípios ativos que são usados na composição de mais de 200 pesticidas, dentre eles a abamectina, ingrediente ativo do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE (BRASIL 2010). Esse fato demonstra a necessidade de estudos que tenham como objetivo compreender as conseqüências do uso do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE nos ambientes naturais e seus possíveis impactos nas comunidades aquáticas.

É em meio ao crescente uso de pesticidas que os estudos ecotoxicológicos vêm sendo destinados para a avaliação dos possíveis impactos ambientais relacionados à contaminação de ambientes aquáticos por esta classe de compostos ou agentes tóxicos. Estes trabalhos permitem avaliar os danos ocorridos nos diversos ecossistemas após a contaminação e também prever impactos futuros sobre a comercialização de produtos químicos e lançamentos de resíduos num determinado ambiente (Zaggato, 2006).

Para se adquirir conhecimento sobre os efeitos causados por estas substâncias, diversos tipos de testes têm sido utilizados com organismos de diferentes níveis tróficos. Porém por razões práticas, os primeiros estudos sobre o efeito dos poluentes foram desenvolvidos em laboratório e na maioria das vezes em nível individual, avaliando apenas parâmetros particulares. Diferentemente dessas avaliações laboratoriais, os estudos realizados em campo são valiosas ferramentas de pesquisa na ecologia (Odum, 1988).

Estudos em mesocosmos são desenvolvidos para simular partes de ecossistemas aquáticos naturais (OECD, 2006) e fornecem informações para estimar os efeitos ecológicos e o destino de substâncias químicas nas comunidades biológicas e ecossistemas (Pestana, et al., 2009).

Entre os organismos recomendados para ensaios ecotoxicológicos, os pertencentes à fauna bentônica têm sido utilizados no Brasil e no exterior. O uso deste grupo como indicador da saúde ambiental em ecossistemas aquáticos é conhecido por fornecer boas informações sobre a qualidade da água e também do sedimento.

O sedimento representa um importante compartimento no sistema aquático responsável pelo acúmulo e liberação de substâncias, tornando-se, portanto, um sumidouro ou fonte desses elementos. Comportando-se como fonte de poluentes para a coluna d'água, a liberação de substâncias tóxicas pelo sedimento pode causar uma alteração geral nas condições do sistema (Dornfeld, 2006a). Por isso, os bioensaios ecotoxicológicos com

sedimento utilizando organismos bentônicos são ferramentas importantes que fornecem informações sobre o nível de contaminação e também sobre os locais que proporcionam maior risco à biota aquática.

A comunidade de macroinvertebrados bentônicos é representada por uma variedade de espécies, incluindo tanto espécies sensíveis como tolerantes aos agentes tóxicos, e que ocupam diversos níveis e nichos tróficos nos ambientes naturais (Rosenberg & Resh, 1993). Os organismos desta comunidade também constituem um importante recurso alimentar para outros invertebrados e para os vertebrados nas redes tróficas e desempenham importante papel na reciclagem de nutrientes e transferência de energia nos ecossistemas aquáticos de água doce (Esteves, 1988).

### *1.2 Chironomus sancticaroli* como organismo-teste

Entre os principais representantes a comunidade de macroinvertebrados bêntonicos, os organismos da Família Chironomidae representam um grupo de grande importância, principalmente pela sua grande abundância, alta diversidade e ampla distribuição na maioria dos ecossistemas aquáticos continentais (Epler, 1992). Esses invertebrados freqüentemente constituem a proporção mais significativa da biomassa bentônica e são os únicos insetos, além dos representantes da Ordem Hemiptera, a possuírem hemoglobina, o que os torna capazes de tolerar baixas quantidades de oxigênio dissolvido (Almeida, 2002). As trocas gasosas são facilitadas através de ondulações do corpo dentro dos tubos, produzindo fluxo de água ao redor do corpo (Cranston, 1995).

A espécie *C. sancticaroli* (Strixino, 1980; Strixino & Strixino, 1982), erroneamente chamada e classificada como sinônimo de *Chironomus xanthus* (Trivinho-Strixino, 2011), ocorre no Estado de São Paulo, sendo portanto de grande relevância ecológica regional. A partir do estudo do ciclo de vida deste organismo, um protocolo de cultivo laboratorial foi desenvolvido com o objetivo de padronização desta espécie como um organismo teste (Fonseca & Rocha, 2004). A adequação desta espécie como organismo-teste deve-se, principalmente, à facilidade na obtenção de desovas e de sua manutenção em laboratório em elevadas densidades, além do fato de se ter muitas informações biológicas por já ter sido alvo de diversos estudos biológicos e ecotoxicológicos anteriores (Strixino, 1980; Strixino & Strixino, 1982; Fonseca, 1997; Pamplin, 1999; Dornfeld, 2002, Dornfeld, 2006a; Dornfeld,

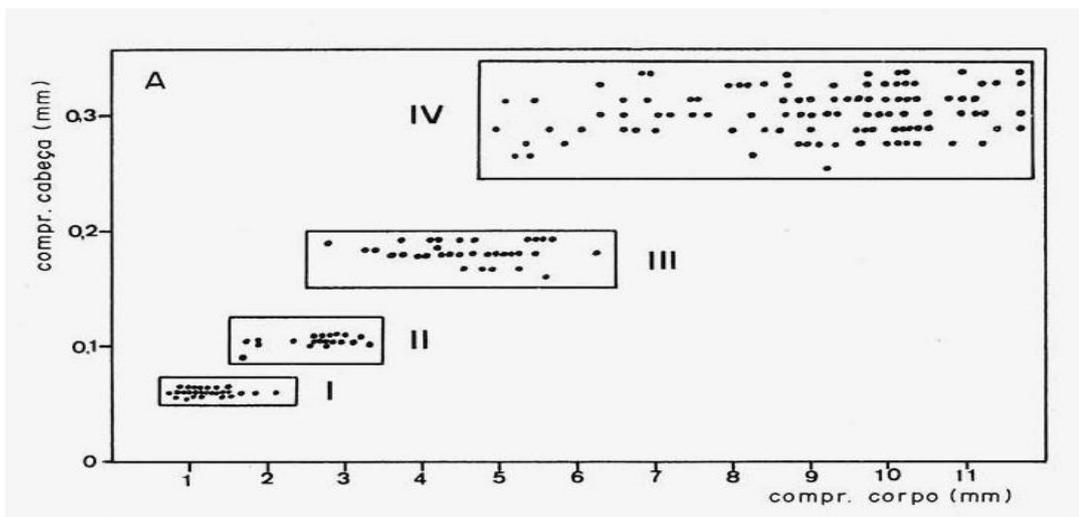
2006b; Fonseca & Rocha, 2004; Almeida, 2002; Sotero-Santos et al., 2007; Printes et al., 2011 e Novelli et al., 2012).

O ciclo de vida da espécie *C. sancticaroli* é dividido em quatro estágios ou fases distintas, sendo três aquáticas: um estágio de ovo, um estágio larval (consistindo em quatro instares), um estágio de pupa e uma fase aérea (estágio adulto). Em condições favoráveis a larva pode chegar ao estágio de pupa emergindo como adulto entre 12 a 15 dias após a eclosão do ovo, em cultivos sob temperatura de  $24^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Fonseca & Rocha, 2004). Com aproximadamente dois dias de vida após a emergência, os adultos copulam e as fêmeas depositam os ovos reunidos numa massa de forma espiralada envolta em mucilagem gelatinosa, a qual é depositada junto à superfície da água, geralmente no início da manhã.

A massa gelatinosa que envolve os ovos, e que de certa forma também os protege de impactos ambientais, serve de alimento para as larvas durante certo tempo como constatado por Strixino (1980). Em média, 500 a 600 ovos são depositados numa massa ovígera. Os ovos eclodem entre 44 e 48 horas após a deposição quando em temperaturas na faixa de  $22^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . As larvas medem em torno de 0,005 - 0,0999 mm de largura da cabeça (Fonseca, 1997). As durações médias de cada estágio larval são: quatro dias para o 1º instar; dois dias para o 2º instar; dois dias para o 3º instar e seis dias para o 4º instar. As larvas iniciam a construção dos casulos a partir do 2º instar. O estágio de pupa corresponde ao final do 4º instar. Após a emergência a duração média do estágio adulto é de 2 dias.

A largura da cápsula cefálica da larva é a melhor variável para definir o instar larval dos quironomídeos (Strixino & Strixino, 1982) (Figura 1).

Cada instar tem um tempo de duração diferente, sendo que o quarto instar é o mais longo devido ao crescimento geométrica do tamanho do corpo (Fonseca & Rocha, 2004). Os machos se distinguem das fêmeas por apresentarem as antenas plumosas, abdomen mais delgado e genitália visível (USEPA, 2000).



**Figura 1.** Relação entre o comprimento da cápsula cefálica (mm) e o comprimento do corpo (mm) em quatro ínstaes larvais para a espécie *Chironomus sancti-caroli*. Fonte: Strixino and Strixino (1982).

Por ser uma espécie bentônica, *C. sancti-caroli* vem sendo utilizado em ensaios com sedimento. Mas isso não significa que ele não seja sensível a contaminantes presentes na coluna d'água, pois o primeiro ínstar da larva (que possui hábito planctônico) e o estágio de pupa não ficam no sedimento. Ainda, quando estão enterrados no sedimento, os quironomídeos podem ser afetados por substâncias presentes na água, muito provavelmente através da presença deste solvente entre os poros do sedimento (Hoke, et al., 1993; Tsui and Chu, 2004).

### 1.3 Estudos ecotoxicológicos utilizando macroinvertebrados bentônicos para avaliar os efeitos de pesticidas

Diferentes espécies de invertebrados aquáticos têm sido utilizadas em laboratório para determinar a toxicidade substâncias químicas e amostras ambientais. Estes organismos são considerados bons indicadores de poluição ambiental por apresentarem baixa mobilidade e habitarem os sedimentos, sendo assim através de seus hábitos alimentares podem refletir bem contaminações ambientais (Gorni & Weber, 2004).

Os efeitos adversos de substâncias químicas nos organismos incluem tanto efeitos letais (que ocasionam mortalidade em bioensaios ou testes de curta duração) quanto efeitos sub-letais (que ocasionam efeitos diversos em bioensaios ou testes de longa duração), como mudanças no crescimento, desenvolvimento e reprodução. Bioensaios de toxicidade aguda são vantajosos por apresentarem respostas em curto período de tempo, sendo muito úteis em

tomadas de decisão e monitoramento. Porém, os bioensaios de toxicidade crônica têm mostrado ser uma importante e eficiente ferramenta para avaliação dos efeitos toxicológicos causados por contaminações, pois estes utilizam diferentes parâmetros finais ou “endpoints” além da sobrevivência ou mortalidade (Dornfeld, 2006a).

Estudos laboratoriais utilizando organismos bentônicos para avaliar a qualidade e toxicidade da água e do sedimento já foram realizados no Brasil e no exterior. No Brasil, espécies já utilizadas foram *Chironomus sancticaroli* (Fonseca, 1997; Pamplin, 1999; Dornfeld, 2002; Almeida, 2002; Dornfeld, 2006b e Sotero-Santos et al., 2007, Printes et al., 2011 e Novelli et al., 2012), *Branchiura sowerbyi* (Almeida, 2007), *Hyaella meinerti* e *Hyaella azteca* (Araújo, 2005 e outros trabalhos citados anteriormente). No exterior, a maior parte dos trabalhos realizados fizeram o uso de espécies e protocolos normatizados para invertebrados bêmtonicos (USEPA, 2000; ASTM, 2000) na realização de estudos ecotóxicológicos.

Em meio à crescente utilização de inseticidas, herbicidas entre outros pesticidas, aliado aos diversos impactos causados à saúde humana e ambiental nas últimas décadas, no Brasil, estudos experimentais utilizando macroinvertebrados bentônicos para avaliação dos efeitos de pesticidas como em Coler et al. (2005) e Novelli et al. (2012) ainda são esparsos. A maior parte dos trabalhos existentes na literatura, tiveram como objetivo quantificar a bioacumulação de pesticidas em comunidades bentônicas naturais (Gorni & Weber, 2004).

No exterior, entre os estudos experimentais laboratoriais com pesticidas ou amostras ambientais contaminadas com estas substâncias, os organismos-teste mais comumente utilizados foram: *Branchiura sowerbyi*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Lumbriculus variegatus*, *Chironomus riparius*, *Chironomus tentans*, *Hyaella azteca* e *Anodonta cygnea*, os quais foram utilizados tanto em ensaios de toxicidade aguda (Naqvi, 1973; Ankley; Collyard, 1995; Moore et al., 1998; Iannacone et al., 2000; Hahn et al., 2001; Tsui & Chu, 2004; Forcella et al., 2007; Saha & Kaviraj, 2007 e Akerblon et al., 2008) como (e/ou) de toxicidade crônica (Kontrenzki, et al., 1997; Sturm & Hanses, 1999; Verrhiest et al., 2001; Péry et al., 2004; Rakotondovelo et al., 2006 e Pestana et al., 2009).

Muitas pesquisas e estudos laboratoriais, como os trabalhos citados anteriormente, tem sido focados na avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade de testes normatizados para laboratórios, analisando apenas aspectos particulares de determinadas espécies. Pouca atenção tem sido voltada para a relação entre os resultados de testes em laboratório e os efeitos de

estudos ecotoxicológicos “in situ”. Porém, alguns trabalhos têm centrado sua atenção para essa questão e através de estudos em laboratório e campo puderam obter informações complementares para os organismos-teste utilizados (Conrad et al., 1999; Faria et al., 2007).

O uso controlado de experimentos semi-naturais, como mesocosmos, fornecem a oportunidade de se realizarem pesquisas em nível de ecossistema que podem gerar informações adicionais aos ensaios laboratoriais. Bioensaios *in situ* instalados em experimentos semi-naturais, tem a vantagem de testar espécies-teste sob condições reais de campo, comparado aos testes de laboratório (Pestana, et al., 2009).

Muitos estudos em mesocosmos, também já foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos de pesticidas sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos, seja por adição (“input”) intencional (Caquet, et al., 2007) ou indireta (escoamento superficial ou runoff) de pesticidas (Schulz & Liess, 1999).

#### 1.4 Vertimec<sup>®</sup> 18 CE

A abamectina, também conhecida pelo nome comercial Vertimec<sup>®</sup> 18 CE, é uma mistura de avermectinas contendo cerca de 80 % de avermectina B<sub>1a</sub> (C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>) e 20 % de avermectina B<sub>2b</sub> (C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>), pertencendo ao grupo químico das Avermectinas. Estas substâncias fazem parte de um grupo de antibióticos macrocíclicos obtidos a partir da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* (Burg et al., 1979; Halley et al., 1989).

As avermectinas possuem alta toxicidade para peixes e invertebrados aquáticos (BURG et al., 1979) e podem ser rapidamente foto-degradadas em água ou adsorvidas nas partículas do solo, sedimentos e matéria orgânica. A classificação toxicológica do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é na classe III, considerada como um produto “medianamente tóxico”. Sendo assim, este produto pode oferecer riscos ao ambiente aquático, especialmente pelo uso freqüente dessa substância (Tišler & Eržen, 2006) e pela sua classificação quanto à periculosidade ambiental (classe II - altamente perigoso e persistente).

O pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é um composto amplamente utilizado em diversas culturas, particularmente nas culturas de morango e batata. Uma recente pesquisa realizada pela ANVISA (2007) destacou que as culturas de tomate, alface e morango são as que mais contêm resíduos de pesticidas entre as culturas de frutas e verduras. Segundo Rodrigues (2006), o município de Bom Repouso (MG) é um exemplo de local onde a utilização dessa substância é realizada com freqüência e em grandes quantidades. O município tem como

principal atividade econômica a agricultura, sendo os principais cultivos os de morango e batata (culturas mais comuns nessa região), sendo responsável por 40% da produção de morango e primeiro produtor de batata inglesa.

Alguns trabalhos desenvolvidos por Brigante e Espíndola (2003) e Rodrigues (2006) nesta região, destacaram os efeitos tóxicos decorrentes da contaminação por pesticidas, principalmente devido ao seu uso nos plantios das culturas citadas anteriormente.

Atualmente, as informações a respeito do uso de Vertimec<sup>®</sup> 18 CE não são suficientes para uma clara compreensão dos efeitos nocivos aos organismos não-alvo. Assim, baseado no pequeno número de informações, diversos órgãos vêm permitindo o uso da abamectina e seus derivados em atividades agropecuárias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar os efeitos do pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE sobre invertebrados aquáticos, por meio de estudos ecotoxicológicos.

### 2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar e comparar a sensibilidade de *Chironomus sancticaroli* às amostras de água provenientes do escoamento superficial das parcelas de solo previamente contaminadas por Vertimec<sup>®</sup> 18 CE, através de testes de toxicidade aguda e crônica parcial, em experimentos laboratoriais e *in situ*;

b) Avaliar algumas características estruturais e funcionais do ambiente aquático (variáveis físicas, químicas e biológicas) em decorrência da aplicação direta do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE e de água proveniente do runoff de um ambiente contaminado por meio de experimentos em mesocosmo;

c) Testar a hipótese de que Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é altamente tóxico para os componentes da biota de água doce usando a espécie de invertebrado *Hydra viridissima* como um organismo-teste em ensaios experimentais de laboratório, avaliando além da mortalidade, alterações morfológicas no corpo e tentáculos dos indivíduos;

d) Avaliar a toxicidade aguda (mortalidade) em relação à espécie *Girardia tigrina* exposta a diferentes concentrações deste pesticida durante 4 dias de experimento (96h).

### 3. Referências

AKERBLUM, N.; ARBJORR, C.; HEDLUND, M.; GOEDKOOP, W. Deltamethrin toxicity to the midge *Chironomus riparius* Meigen - Effects of exposure scenario and sediment quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 70, p. 53–60, 2008.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. *Revista de Saúde Pública*, v.40, n.2, p.361-363, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos: Trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED e LACEN/PR. (Relatório de Atividades 2001 – 2006), 19p., 2007.

ALMEIDA, C.A. Estudo ecotoxicológico do sedimento de represas do Rio Tietê com organismo- teste bentônico: *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera). 2002. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

ANKLEY, G. T.; COLLYARD, S. A. Influence of piperonyl butoxide on the toxicity of organophosphate insecticides to three species of freshwater benthic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 110C, n. 2, p. 149-155, 1995.

ARAÚJO, R. P. A. Avaliação da toxicidade de sedimentos ao anfípodo de água doce *Hyaella meinerti* Stebbing, 1899 (Crustacea, Amphipoda) 1998. 184p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Geral)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ARAÚJO, R. P. A. Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo. 2005. 269p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

AYRES M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *Bio Estat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2000. 272 p.

BRASIL. Diário Oficial. Resolução - RE No- 2.248, de 18 de maio de 2010. Disponível em: [ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpseesp/bibliote/informe\\_eletronico/2010/iels.mai.10/Iels94/U\\_R S-MS-ANVISA-RE-2248\\_180510.pdf](ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpseesp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.mai.10/Iels94/U_R S-MS-ANVISA-RE-2248_180510.pdf) Acesso em: 25 jan de 2010.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLIC, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.15, n. 3, p. 361-367, 1979.

CAQUET, T.; HANSON, M. L.; ROUCAUTE, M.; GRAHAM, D. W.; LAGADIC, L. I. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. II. Benthic macroinvertebrate responses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, N. 6, p. 1280–1290, 2007.

CRANSTON, P.S. (1995). Introduction. In Armitage, P.; Cranston, P.S.; Pinder, L.C.V. eds. *The Chironomidae – The biology and ecology of nonbiting midges*. London, Chapman & Hall, p.1-5

CONRAD, A. U.; FLEMING, R. J.; CRANE, M. Laboratory and field response of *Chironomus riparius* to a pyrethroid insecticide. *Wat. Res.*, V. 33, N. 7, pp. 1603-1610, 1999.

COLER, R.A.; COLER, R. R.; FELIZARDO, E. K. G.; WATANABE, T. Applying weight gain in *Pomacea lineata* (Spix 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a measure of herbicide toxicity. *Braz. J. Biol.*, v. 65, n. 4, p. 617-623, 2005.

DORNFELD, C.B. Utilização de análises limnológicas e bioensaios toxicológicos em macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana -SP). 2002. 196 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

DORNFELD, C.B. Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. 2006. 211 p. Tese de Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006a.

DORNFELD, C.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; NOVELLI, A.; RODRIGUES, B. K. Comparação de bioensaios laboratoriais e *in situ* utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP). Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 1, n. 2, p. 161-166, 2006b.

EPLER, J. H. Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of Florida. Orlando: DER, (Final Report, SP251), 1992.

ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 1988.

EYSINK, G. G. J.; TOLEDO, JR, A.P.; MENEGON, JR, N.; ARAUJO, R. P. A.; ISHIHARA, M. Qualidade ambiental do rio Ribeira de Iguape com relação à presença de metais pesados e arsênio. São Paulo: CETESB, 2000. 70p. Relatório Técnico.

FARIA, M.S.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V.M. The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. Ecotoxicology and Environmental Safety. v.67, n. 2, p. 218-226, 2007.

FORCELLA, M.; BERRA, E.; GIACCHINI, R.; ROSSARO, B.; PARENTI, P. Increased alanine concentration is associated with exposure to fenitrothion but not carbamates in *Chironomus riparius* larvae. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 66, n.3, p.326-334, 2007.

FONSECA, A.L. Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados.1997.211p.Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). Acta Limnologica Brasiliensis, v. 16, n. 2, p. 153-161, 2004.

GORNI, R.; WEBER, R. R. Organochlorine pesticides residues and Pcb's in benthic organisms of the inner shelf of the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Oceanography, v.52, n.2, p.141-152, 2004.

HAHN, T.; LIESS, M.; SCHULZ, R. Effects of the hormone mimetic insecticide Tebufenozide on *Chironomus riparius* larvae in two different exposure setups. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p.171-178, 2001.

HOKE, R. A.; GIESY, J. P.; ZABIK, M.; UNGER, M. Toxicity of Sediments and Sediment Pore Waters from the Grand Calumet River-Indiana Harbor, Indiana Area of Concern. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 26, n.1, p. 86-112,1993.

HALLEY, B. A.; JACOB, T. A.; LU, A.Y. H. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere*, v.18, n. 7-8, p.1543-1563, 1989.

IANNACONE, J.; ALVARIÑO, L.; CABALLERO, C.; SÁNCHEZ, J. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar Lindano y Clorpirifos. *Gayana, Concepción*, v. 64, n. 2, 2000.

KOLAR, L.; ERŽEN, K. N.; LENNY HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, v. 151, n.1, p.182-189, 2008.

KONTRECKY, Cs.; FARKAS, A.; NEMCSÓK, J.; SALÁNKI, J. Short- and Long-Term Effects of Deltamethrin on Filtering Activity of Freshwater Mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 38, p.195–199, 1997.

KUHLMANN, M.L.; HAYASHIDA, C.Y.; ARAUJO, R.P.A. Using *Chironomus* (*Chironomidae*: *Diptera*) mentum deformities in environmental assessment. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v.12, p.55-61, 2000.

MELETTI, P.C.; ROCHA O. Development of a chamber for in situ toxicity tests with small fishes. *Brazilian Journal of Biology*. v.62, p.187-190, 2002.

MEDEIROS, V. M.; TAKAKO, W.; COLER, R. R.; COLER, R. A. Development of methods to assess the impact of herbicide use on the benthos of littoral impoundments in northeast Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 9, p. 67–71, 2001.

MOORE, M. T.; HUGGETT, D. B.; JR, W. B. GILLESPIE.; JR, J. H. RODGERS.; COOPER, C.M. Comparative Toxicity of Chlordane, Chlorpyrifos, and Aldicarb to Four Aquatic Testing Organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.v.34, n.2, p.152-157, 1998.

NAQVI, S. M. Z. Toxicity of twenty-three insecticides to a Tubificidae Worm *Branchiura sowerbyi* from the Mississippi delta. Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 66, p. 70-74, 1973.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. Archiv fur hydrobiologie.v.14, p.14-36, 1980.

ODUM, E. P. Ecologia . Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1983. 434p.

OECD - Organization for Economic Co-Operation And Development Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment n. 53: Guidelines document on simulated freshwater lentic field tests (outdoor microcosms and mesocosms)- Paris, April, 2006.

PACHECO, P. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. O Estado de São Paulo. SP, 22mar.2010. Caderno economia e negócios. Disponível em:  
<[http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not\\_imp414820,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0.php)> Acesso em: 23/06/2010.

PAMPLIN, P. A. Z. Avaliação da Qualidade Ambiental da Represa de Americana (SP) com Ênfase no Estudo da Comunidade de Macroinvertebrados Bentônicos e Parâmetros Ecotoxicológicos. 1999. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

PÉRY, A. R. R.; MONS, R.; DUCROT, V.; GARRIC, J. Effects of Methiocarb on *Chironomus riparius* Survival and Growth With and Without Tube-Building. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.v.72, n.2, p.358-364, 2004.

PESTANA, J.L.T.; ALEXANDER, A.C.; CULP, J.M.; BAIRD, D.J.; CESSNA, A. J.; SOARES, A.M.V.M. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution*. v.157, n.8-9, p.2328-2334, 2009.

PESTANA, J.L.T.; LOUREIRO, S.; BAIRD, D.; SOARES, A. M. V. M. Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology*, v. 93, p.138–149, 2009.

PRINTES, L. B., M. N. FERNANDEZ & E. L. G. ESPÍNDOLA, 2011. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 424-430.

RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E.; ZHU, K. Y. Sublethal Effects of Three Pesticides on Activities of Selected Target and Detoxification Enzymes in the Aquatic Midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* V. 51, p. 360–366, 2006.

RODRIGUES, B. K. Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (CYPRINIDAE, CYPRINIFORMES). Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 135p. 2006.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V.H. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Nova York: Chapman & Hall, 1993.

SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Nova Iorque, v. 80, n. 1, p. 49-52, 2007.

SCHULZ, R.; LIESS, M. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology* v.46, p.155–176, 1999.

SOTERO-SANTOS, R. M. B. ; ROCHA, O. ; POVINELLI, J. . Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms. *Chemosphere (Oxford)* , v. 68, p. 628-636, 2007.

STRIXINO, S. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp (Diptera: Chironomidae). 1980. 349p. Tese, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 349p.1980.

STRIXINO, T.S.; STRIXINO G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, (Diptera:Chironomidae). Revista Brasileira de Entomologia. v. 26, n.2, p.183-189, 1982.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. Biota Neotrop. 11:1-10, 2011.

STURN, A.; HANSEN, P. D. Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 42, p.9-15, 1999.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N.K. Abamectin in the aquatic environment. Ecotoxicology, n. 15, p. 495-502, 2006.

TONISSI, F.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Utilização de bioensaios agudo, crônico parcial e *in situ* com *Danio rerio* para avaliação ecotoxicológica do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), p.483-500. In: E.L.G. ESPÍNDOLA; C.M.R. BOTTAPASCHOAL; O. ROCHA; M.B.C. BOHRER; A.L.OLIVEIRA-NETO, Ecotoxicologia - perspectivas para o século XXI, São Carlos, 2000.

TSUI, M.T.K.; CHU, L.M. Comparative Toxicity of Glyphosate-Based Herbicides: Aqueous and Sediment Porewater Exposures. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.v.46, n.3, p.316-323, 2004.

USEPA- United States Environmental Protection Agency. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates. ed. Washington. D.C., 192 p., 2000.

VERMEULEN, A.C.; LIBERLOO G.; DUMONT, P.; OLLEVIER F.; GODDEERIS, B. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury and b-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. Chemosphere. v. 41, p.1581-1591, 2000.

VERRHIEST, G.; CLÉMENT, B.; BLAKE, G. Single and Combined Effects of Sediment-Associated PAHs on Three Species of Freshwater Macroinvertebrates. *Ecotoxicology*. v. 10, n.6, p.363-372, 2001.

VIEIRA, B. H. Efeitos do agrotóxico Vertimec no fitoplâncton: um estudo laboratorial e "in situ". 2010. 181p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

WAKABARA, Y.; SEREJO, C. S. Malacostraca-Peracarida. Amphipoda, Gammaridea and Caprellidea, pp 561-594, In: YOUNG, P.S. (Ed.), *Catalogue of Crustacea of Brazil*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 717p. 1998.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia, p. 1-12. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática*. São Carlos: Rima, 2006.

## Capítulo 1

### O lixiviado de campos agrícolas simulados tratados com Vertimec® 18 CE é tóxico para a biota aquática? – Experimentos com mesocosmos e em laboratório.

#### Resumo

O Vertimec® 18 CE é um pesticida amplamente utilizado em áreas agrícolas, mas também tóxico para alguns organismos aquáticos. Para avaliar este último efeito, parcelas experimentais de solo sem cobertura vegetal sobre um terreno inclinado foram contaminadas com o pesticida Vertimec e amostras do lixiviado (*runoff*) foram coletadas em valas impermeabilizadas localizadas terreno abaixo. Análises físicas e químicas e testes de toxicidade com larvas do organismo-teste *Chironomus sancticaroli* foram realizadas com o objetivo de testar seu efeito sobre os organismos aquáticos não-alvo. As diluições de 6,25; 25; 50; 75 e 100% do lixiviado foram testadas quanto à toxicidade aguda (CL50 - 96h) e também para o efeito crônico sobre a emergência dos adultos. Comparações referentes à toxicidade do Vertimec no lixiviado contaminado e no produto comercial foram realizadas em várias concentrações. Não foi observado efeito tóxico para qualquer concentração do lixiviado não tratado (controle - RNC), mas a toxicidade foi detectada em todas as concentrações testadas do lixiviado contaminado (RC). A CL50 - 96 h para o RC foi 8,25% (3,30 mg L<sup>-1</sup> de abamectina). Nenhuma das larvas expostas ao RC alcançou o estágio adulto. CL50 - 96 h para a fórmula comercial foi de 0,54 10<sup>-5</sup> mL L<sup>-1</sup> (97 ng L<sup>-1</sup> de abamectina). Portanto, o Vertimec é extremamente tóxico para os organismos aquáticos, representando um risco para a biodiversidade e, eventualmente, para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: abamectina, ecotoxicologia aquática, *Chironomus sancticaroli*, pesticidas.

## Abstract

Vertimec<sup>®</sup> 18 EC is a pesticide largely used on agricultural land but also toxic to some aquatic organisms. To assess this latter effect, bare experimental plots on sloping land were contaminated with Vertimec and runoff samples were collected downhill from a water proofed trench. Physical and chemical analysis and toxicity tests were carried out, with *Chironomus sancticaroli* larvae as test-organism, aiming to test its effect upon non-target aquatic organisms. Dilutions of 6.25, 25, 50, 75 and 100% runoff water were tested for acute toxicity (LC50 - 96h) and also for chronic effects on adult emergence. Comparisons on the toxicity of Vertimec in contaminated runoff (CR) and with that of the liquid product were performed at several concentrations. No toxic effect was observed at any concentration of the untreated runoff (control - UR), but toxicity was detected at all concentrations of the contaminated runoff tested. The LC50 - 96 h was 8.25% (3.30  $\mu\text{g L}^{-1}$  abamectin). None of the larvae exposed to contaminated runoff reached the adult stage. LC50 - 96 h for liquid product was 0.54  $10^{-5}$  mL L<sup>-1</sup> (97 ng L<sup>-1</sup> of abamectin). Therefore, Vertimec is potentially highly toxic to aquatic organisms, representing a risk to biodiversity and eventually to the functioning of aquatic ecosystems.

Keywords: abamectin, aquatic ecotoxicology, *Chironomus sancticaroli*, pesticides.

## 1. Introdução

O Vertimec<sup>®</sup> 18 CE tem a abamectina como ingrediente ativo e uma variedade de usos como inseticida, nematicida e acaricida para frutas e hortaliças, bem como para cultivo de plantas ornamentais (MAPA, 2013). De acordo com Schenck e Lagman (1999), a abamectina é uma mistura que contém aproximadamente 80% de avermectina B1a (C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>) e 20% da avermectina B1b (C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>). As avermectinas (por exemplo, abamectina, doramectina, ivermectina) são obtidas a partir dos produtos de fermentação natural do actinomiceto de solo *Streptomyces avermitilis* descoberto em 1975 pela Merck & Co., Inc (Burg et al., 1979). Estes compostos são pouco solúveis em água, mas altamente lipofílicos e facilmente solúveis em muitos solventes orgânicos (Roth et al., 1993). A ivermectina é amplamente utilizada na medicina veterinária contra endo- e ectoparasitas de animais silvestres (bovinos, ovinos, suínos e eqüinos), e como um tratamento profilático para verminoses caninas (por exemplo, como anti-helmíntico) (Fisher & Mrozic, 1992).

A classificação toxicológica oficial do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é na classe III (“moderadamente tóxico”) (MAPA, 2013). Entretanto, a sua classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental enquadra-se na classe II, ou seja, uma substância tóxica muito perigosa, altamente persistente e extremamente tóxica para microcrustáceos e peixes, afetando organismos não-alvo (Campbell et al., 1989).

Algumas estimativas indicam que menos de 0,3% do produto aplicado nos campos agrícolas atinge os organismos-alvo (Pimentel, 1991), enquanto que o restante é perdido, também atingindo os ecossistemas aquáticos via escoamento superficial, percolação e precipitação. De acordo com Tišler e Eržen (2006), o principal alvo das avermectinas é o sistema nervoso central dos parasitas. Por exemplo, em artrópodes e nematóides a interação com os receptores GABAérgicos presentes na membrana pós-sináptica estimula o fluxo de íons cloreto para o interior das célula nervosas causando um forte influxo de cloreto, resultando na interrupção da transmissão dos sinais neurais.

Devido ao seu uso intensivo, e destino final em corpos d'água, o Vertimec<sup>®</sup> 18 CE pode representar um risco para a biota aquática e, possivelmente, também para a saúde humana. Esta hipótese baseia-se no fato de que, em peixes, as avermectinas também podem ultrapassar a barreira hematoencefálica (Høy et al., 1990) e em ratos do sexo masculino ingerindo abamectina, a fertilidade foi significativamente reduzida (Elbetieha & Da'as, 2003).

Neste contexto, buscamos testar a hipótese de que o lixiviado produzido em campos agrícolas tratados com Vertimec<sup>®</sup> 18 CE (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, Brasil), que é uma fórmula concentrada e emulsionável contendo 18 g L<sup>-1</sup> de abamectina, tem efeitos tóxico em organismos bentônicos de água doce não-alvo. Para testar esta hipótese, foi realizada uma simulação do escoamento superficial em campo e experimentos de laboratório.

## 2. Materiais e Métodos

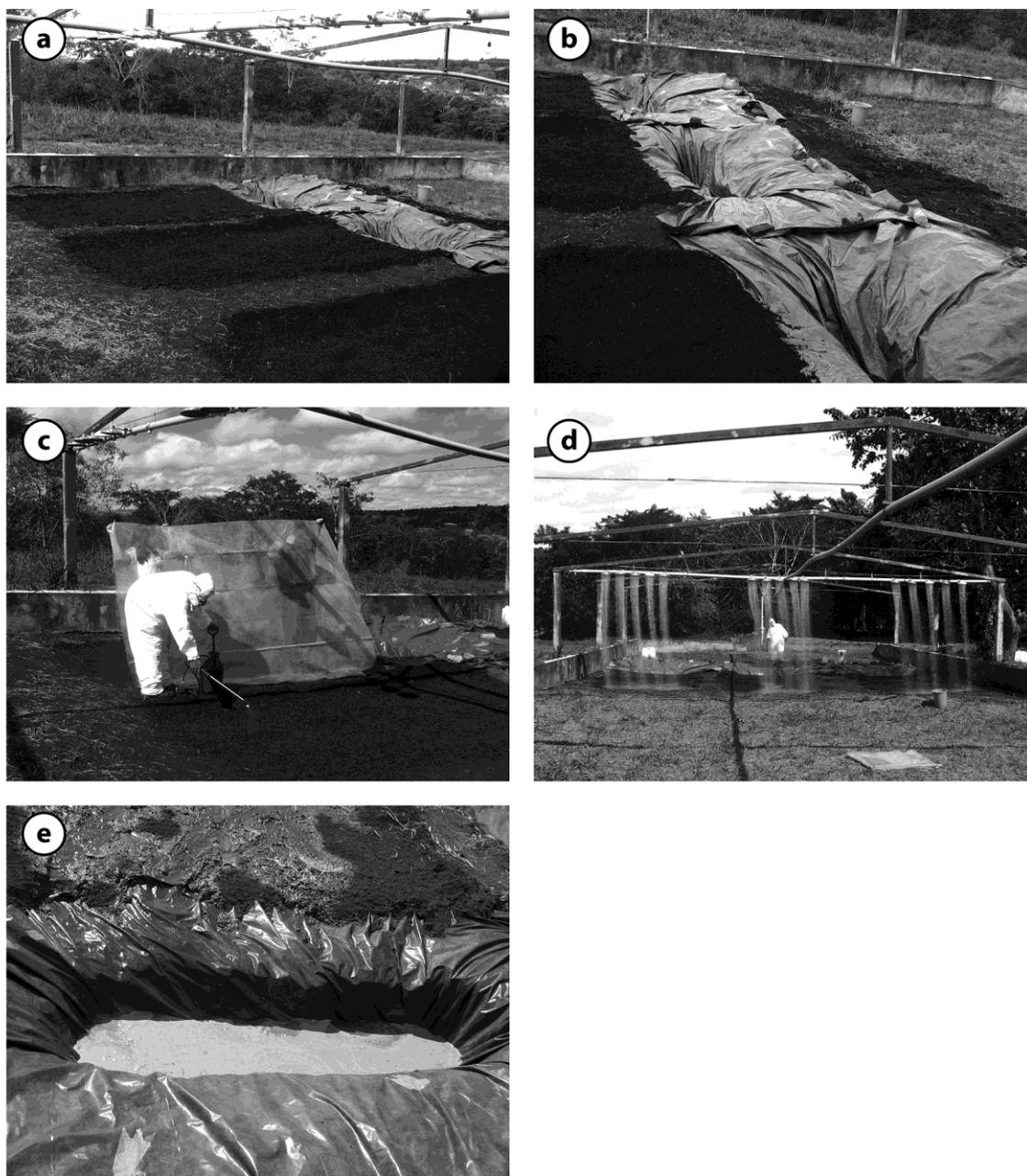
### 2.1 Simulação do escoamento superficial em campo

Este estudo foi realizado no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), localizado no município de Itirapina, São Paulo, Brasil (22° 01' 22'' S, 43° 57' 38'' W). A simulação do escoamento superficial foi realizada em campo em uma área com 6% de inclinação, onde duas parcelas agrícolas medindo 8 m<sup>2</sup> cada, foram estabelecidas, mantendo 6 m de distância. As amostras de solo nas parcelas experimentais foram avaliadas quanto à granulometria e ao teor de matéria orgânica (Suguio, 1973). O solo era predominantemente arenoso na sua maioria composto de areia fina (29,4%), com um teor de matéria orgânica de 4,2%. Antes do experimento, o solo das parcelas foi capinado e arado. Uma parcela foi coberta com uma lona de plástico para evitar a contaminação, de modo a servir como controle, enquanto que a outra foi contaminada com Vertimec<sup>®</sup> 18 CE usando um pulverizador manual (0,125 L m<sup>-2</sup>) seguindo as instruções do fabricante para aplicação em morangueiros (0,75 mL L<sup>-1</sup>) (Figura 1). Uma chuva simulada foi aplicada a montante das parcelas para gerar o lixiviado. O volume de água aplicado foi de 25 mm m<sup>-2</sup> com base nos dados históricos para os meses de verão obtidos na estação meteorológica do CRHEA localizada a poucos metros da montagem experimental. Houve precaução para que no momento da aplicação da chuva não estivesse ventando. As amostras de solo das parcelas experimentais foram analisadas quanto à granulometria e conteúdo de matéria orgânica.

Foram coletadas amostras do lixiviado a jusante das parcelas a partir de lonas de plásticas previamente colocadas em depressões. Parte das amostras foi utilizada para análises físicas e químicas e parte para a realização de testes de toxicidade com *C. sancticaroli*.

Com o objetivo de obter resultados mais realistas sobre o impacto toxicológico deste pesticida em organismos não-alvo sensíveis, no presente estudo, foi utilizada uma formulação comercial da abamectina, o Vertimec. Essa escolha também foi baseada na história de uso

freqüente e indiscriminado deste produto químico no município de Bom Repouso, Minas Gerais, Brasil, conforme reportado por Nunes e Espíndola (2012).



**Figura 1.** Vista da instalação do mesocosmo em campo e terreno abaixo o acúmulo de lixiviado produzido por uma enxurrada artificialmente simulada. A e B: Local de realização do experimento em campo e parcelas utilizadas para o estudo; C: Procedimento de pulverização do pesticida Vertimec nas parcelas, com uso de equipamentos de segurança; D: Simulação de chuva em parcelas previamente contaminadas por Vertimec; E: Depressões para o acúmulo e coleta da água do lixiviado.

## 2.2 Análises físicas e químicas do lixiviado

Medidas da concentração de oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica, temperatura e pH do lixiviado contaminado (RC) e não contaminado (RNC) coletados a partir das parcelas de campo foram realizadas utilizando-se um medidor de OD YSI, um condutivímetro Orion 145A e um potenciômetro Micronal B374. A turbidez foi medida com um espectrofotômetro Hach DR/2000, de acordo com APHA (1995) e os sólidos suspensos foram quantificados por gravimetria após a filtração do lixiviado em filtros de fibra de vidro (GF/C - 47 mm) (Teixeira et al., 1965). A concentração de abamectina foi analisada na amostra 100%, por cromatografia líquida (modelo SCL-10A, marca Shimadzu), com detector SPD-10A UV e confirmação feita por um GC-MS (modelo QP2010, marca Shimadzu) (Lanças, 2004).

## 2.3 Testes de toxicidade

Os procedimentos para os testes com *C. sancticaroli*, bem como a preparação da água de cultivo, seguiram os métodos propostos por Fonseca e Rocha (2004). A dureza da água de cultivo adotada foi em torno de 40 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Nos testes de toxicidade com *C. sancticaroli*, 6 larvas (7-8 dias de idade - IV instar) foram utilizadas em cada uma das três réplicas de cada tratamento e os experimentos foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (23 ± 2 ° C) e fotoperíodo 12h claro : 12h escuro.

Para avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste, a sensibilidade dos indivíduos ao cloreto de potássio foi testada nas concentrações de 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g L<sup>-1</sup>, e expressa em CL50 - 96h. Para realizar estes testes seis larvas de quironomídeos foram expostas em copos de plástico atóxico, contendo 240 mL da solução de teste de KCl. Com o objetivo de reforçar a avaliação das condições fisiológicas dos organismos-teste durante o período dos experimentos, neste estudo também quantificamos a emergência de adultos (%) e a incidência de deformidades no mento dos organismos (%). Para a observação de emergência, a análise foi feita com 400 organismos a partir de duas culturas selecionadas, escolhidas aleatoriamente. Exúvias de pupa foram registradas para confirmar a emergência dos adultos. Para as deformidades no mento 200 larvas (100 organismos escolhidos aleatoriamente em cada cultura) foram analisadas.

Para verificar a incidência de deformidades do mento montamos lâminas semi-permanentes com as peças de bucais dos organismos preservados selecionados (7-8 dias de

idade - IV instar). Os animais foram examinados sob um microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus com aumento de 640 vezes. Foi considerado satisfatório e viável o conjunto de cultivos onde as percentagens de emergência dos adultos foram superiores a 95% (média da emergência obtida em séries históricas no nosso laboratório), e a incidência de deformidades foram inferiores a 1% (Wiederholm, 1984; Swansburg et al., 2002).

Para a realização dos testes de toxicidade com o lixiviado, foram utilizadas amostras diluídas em uma série de concentrações (6,25; 25; 50 e 75%), mais a 100%. Os organismos foram expostos em copos de plástico não tóxico contendo 240 ml de solução de teste e 60 g de sedimento. Dois tipos de controle foram criados, um com água de cultivo e sedimento natural (controle 1 = C1) e outro com água de cultivo e sedimento artificial (areia atóxica com granulometria padronizada) (controle 2 = C2). Os testes duraram 96 horas para observação da toxicidade aguda, após o qual os organismos vivos remanescentes foram contados. Após estes procedimentos, os testes foram prorrogados por mais quatro dias para analisar a emergência dos quironomídeos. Exúvias de pupa foram registradas para confirmar emergência dos organismos. Além disso, nós realizamos testes de toxicidade utilizando o produto comercial em laboratório. Diferentemente dos testes de toxicidade com o lixiviado, neste caso, as amostras foram expostas em copos de plástico, contendo apenas 240 ml de solução-teste (sem sedimento) e quatro réplicas foram utilizadas para cada tratamento.

Testes de toxicidade aguda definitivos foram conduzidos nas seguintes concentrações nominais: 0,09; 0,19; 0,38; 0,75; 1,50; 3,00 e 6,00  $10^{-5}$  mL L<sup>-1</sup> de Vertimec. Estas concentrações foram estabelecidas por meio da realização de testes de toxicidade preliminares, para localizar as concentrações mais baixas em que 100% dos organismos de ensaio morreram e a mais elevada em que 100% dos organismos de teste sobreviveram. Os testes duraram 96 horas para a observação de toxicidade aguda, após o qual os organismos vivos remanescentes foram contados no tempo de 24, 48, 72 e 96h.

O pH (potenciômetro Micronal B374), a concentração de oxigênio dissolvido (medidor OD YSI) e a condutividade elétrica (condutímetro Orion 145A) da água foram medidos no início e no final dos testes de toxicidade realizados com as larvas de quironomídeos.

## 2.4 Statistical analyses

Os resultados dos testes de toxicidade aguda foram analisados utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber e expressos como CL50 - 96h (Hamilton et al., 1977). O Teste de Fisher foi usado para testar diferenças significativas na sobrevivência e emergência dos organismos, comparando todos os tratamentos com o controle. Os testes estatísticos foram realizados com o apoio do programa computacional Toxstat (versão 3.3) (Gulley et al., 1994).

## 3. Resultados

### 3.1 Análise granulométrica do solo e teor de matéria orgânica

Resultados semelhantes para a granulometria dos componentes inorgânicos e teor de matéria orgânica foram registrados entre amostras de solo extraídas de parcelas experimentais não contaminadas e contaminadas (Tabela 1). Os solos eram predominantemente arenosos (acima de 40%) com uma contribuição considerável de silte (cerca de 27%) e argila (30%). O teor de matéria orgânica registrado nos solos foi baixo, cerca de 4%.

**Tabela 1.** Análise granulométrica e teor de matéria orgânica das amostras de solo provenientes das parcelas experimentais. PNC = amostra de solo de parcela não contaminada; PC = amostra de solo de parcela contaminada.

Parcela experimental	PNC	PC
<b>Matéria Orgânica (%)</b>	<b>4,50</b>	<b>4,00</b>
Areia fina (%)	0,40	0,20
Areia média (%)	14,00	12,00
Areia fina (%)	28,40	30,30
Silte (%)	27,20	27,40
Argila (%)	30,00	30,10

### 3.2 Caracterização física e química das amostras do lixiviado

Valores próximos de pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, turbidez e sólidos suspensos inorgânicos foram registrados para as amostras de RNC e RC (Tabela 2). O pH da água foi ligeiramente ácido (entre 6,0 e 7,0) com uma baixa condutividade elétrica (abaixo de 28  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ). A concentração de oxigênio dissolvido foi superior a 6,5  $\text{mg L}^{-1}$  e os níveis de turbidez (acima de 3000 NTU) e os sólidos suspensos totais (acima de 3800  $\text{mg L}^{-1}$ ) foram muito elevados.

No entanto, a concentração de sólidos orgânicos em suspensão foi baixa no RC (824,00 mg L<sup>-1</sup>), quando comparada com aquela do RNC (2822,67 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.** Valores de pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, turbidez, sólidos suspensos orgânicos e inorgânicos (SSO and SSI respectivamente) para amostras contaminadas e não contaminadas do lixiviado.

Amostras do lixiviado	pH	Condutividade (μS cm <sup>-1</sup> )	OD (mg L <sup>-1</sup> )	Turbidez (NTU)	SSI (mg L <sup>-1</sup> )	SSO (mg L <sup>-1</sup> )
RNC	6.27	18.3	6.88	3240	3536.7	2822.7
RC	6.68	27.3	6.77	3360	2898.7	824.0

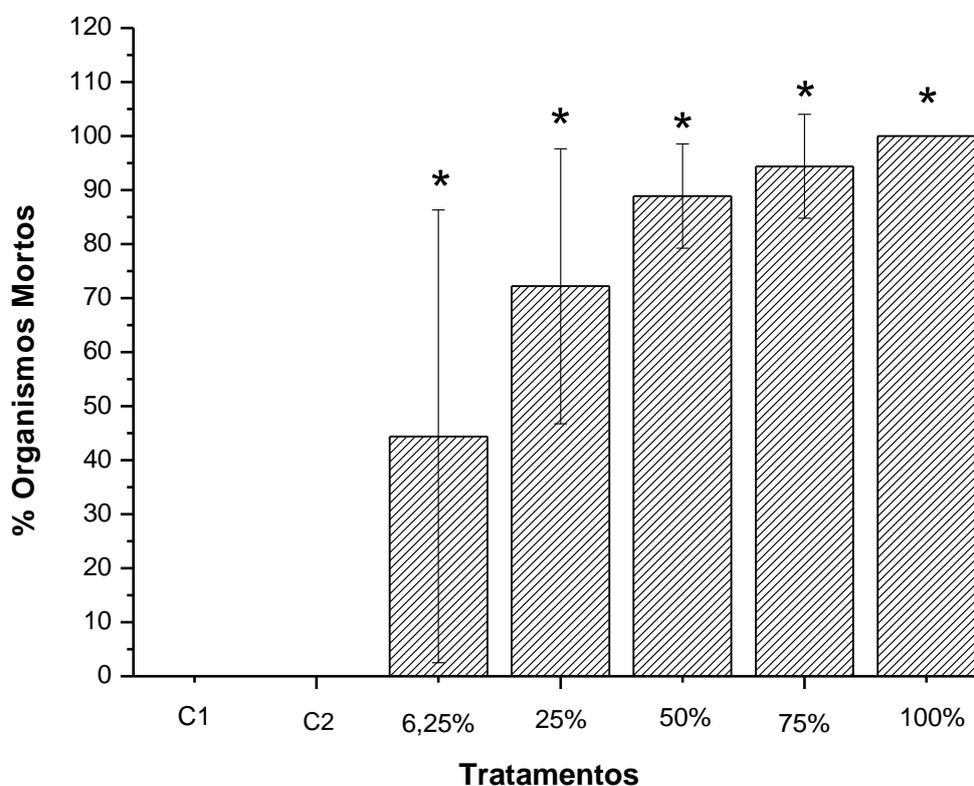
A concentração de abamectina foi zero no controle (RNC) e 40,0 mg L<sup>-1</sup> no lixiviado contaminado (RC). Assim, as concentrações de abamectina calculadas para as diluições do lixiviado em testes de toxicidade foram baseados apenas na concentração nominal inicial do RC 100%.

### 3.3 Testes de toxicidade

Durante o período do experimento, as premissas para a utilização dos organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos foram satisfeitas. Os resultados para a emergência dos adultos (99,5%) e a incidência de deformidades no mento dos quironomídeos (0,0%) indicam as condições saudáveis das culturas. A CL50 - 96h para o cloreto de potássio em *C. sancticaroli* foi de 3,49 g L<sup>-1</sup>, dentro do intervalo de sensibilidade previamente estabelecido a partir de testes laboratoriais (3,03 - 4,03 g L<sup>-1</sup>).

Durante os testes de toxicidade com o lixiviado, o pH mensurado nas soluções-teste permaneceu dentro do intervalo 6,7 - 7,0 e não variou mais do que uma unidade em cada ensaio. A condutividade elétrica variou entre 25,5 e 86,1 μS cm<sup>-1</sup> e do teor de oxigênio dissolvido variou entre 6,8 e 7,6 mg L<sup>-1</sup>. As medidas de dureza da água para as soluções-teste variaram de 40,0 a 44,0 mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Nos testes de toxicidade aguda com *C. sancticaroli* exposto diretamente às amostras do lixiviado, não foi observado efeito tóxico para qualquer concentração do tratamento RNC, mesmo para as réplicas da solução 100%. No entanto, comparando o tratamento RC com o controle de laboratório, os resultados mostraram que houve diferenças significativas a partir de da concentração de 6,25% (Figura 2), o que corresponde a cerca de 2,5 μg L<sup>-1</sup> de abamectina. A CL50 - 96 h foi de 8,25%, o que corresponde a cerca de 3,30 μg L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo para o pesticida utilizado, com limites inferior e superior de 3,16% e 21,51%, respectivamente.

Similarmente aos resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda, no teste de toxicidade crônica (parâmetro: emergência dos quironomídeos adultos) nenhum efeito tóxico foi registrado em todas as concentrações dos tratamentos referentes ao RNC. A emergência dos quironomídeos adultos foi registrada em todas as repetições para todos os indivíduos. No entanto, quando se compara o controle laboratorial com os tratamentos do RC, os resultados mostraram que houve diferenças significativas em todas as concentrações (valores significativamente diferentes do controle, em  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Fisher) e nenhum organismo sobrevivente emergiu, mesmo no tratamento de menor concentração (6,25% da amostra do RC).

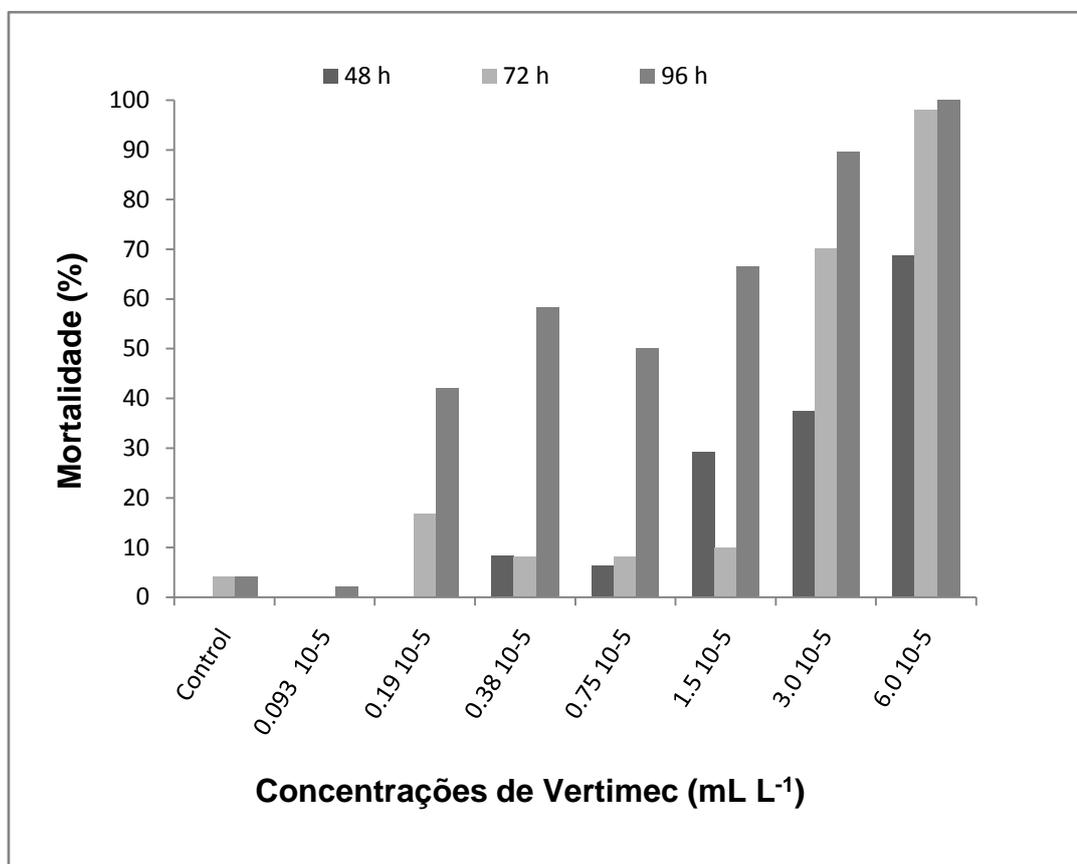


**Figura 2.** Valores médios de mortalidade e desvio padrão obtidos em testes de toxicidade aguda com amostras do lixiviado contaminado (RC) e suas diluições utilizando o organismo-teste *C. sancticaroli*. \* Indica um valor significativamente diferente do controle em  $p \leq 0,05$  pelo Teste de Fisher, ( $n = 18$ ).

Nos testes de toxicidade com o produto comercial, os valores de pH mensurados nas soluções-teste permaneceram dentro do intervalo 7,1 - 8,1 e também não variaram mais do que uma unidade em cada teste. Os valores de condutividade elétrica variaram entre 132,6 e

279  $\mu\text{cm}^{-2}$  e o teor de oxigênio dissolvido variou entre 6,4 e 7,5  $\text{mg L}^{-1}$ . A dureza da água não se alterou (42  $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ).

A CL50 - 96h média para o Vertimec foi de  $0,54 \cdot 10^{-5} \text{ mL L}^{-1}$ . Este valor representa uma concentração nominal de abamectina de 97  $\text{ng L}^{-1}$ . A CL50 - 48 e 72h média para o Vertimec foi de  $4,3 \cdot 10^{-5}$  and  $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mL L}^{-1}$  respectivamente. Considerando-se as porcentagens médias de mortalidade durante os testes de toxicidade aguda, um aumento dos valores foi observado durante o desenvolvimento dos testes (48, 72 e 96h) (Figura 3), mas a CL50 - 24h não pôde ser calculada. Por esta razão, os valores de mortalidade não aparecem na Figura 3.



**Figura 3.** Valores médios de mortalidade (%) para *C. sancticaroli* expostos às concentrações de Vertimec em ensaios de toxicidade aguda em laboratório durante 48, 72 e 96h.

#### 4. Discussão

Os altos valores de turbidez e sólidos totais suspensos que nós obtivemos para as amostras são principalmente uma consequência das características do lixiviado, que são derivados de terras agrícolas sem cobertura vegetal e com predominância de areia e baixo teor de matéria orgânica, sendo facilmente erodidos, facilitando assim o seu transporte pela água da chuva a partir do evento de escoamento superficial simulado.

Vertimec é um pesticida emulsionável concentrado com aparente presença de substâncias surfactantes na sua formulação, que rompe a tensão superficial da água e resulta em baixas concentrações de sólidos orgânicos suspensos no lixiviado contaminado. Deve ser salientado que o fabricante não fornece qualquer informação além do ingrediente ativo para a composição do produto.

Considerando a sobrevivência das larvas e também a emergência dos adultos, mesmo para uma solução 100% do lixiviado não contaminado, não foram observados efeitos adversos aos organismos em nenhuma das réplicas. Parece, portanto, que, apesar da alta turbidez e deposição de sólidos em suspensão devido às características do lixiviado, não foi observado efeitos adversos no desenvolvimento e sobrevivência de *C. sancticaroli*, mesmo até o estágio adulto. Este resultado difere dos dados da literatura sobre os efeitos da alta turbidez sobre macroinvertebrados bentônicos (por exemplo, Rabeni et al., 2005) e organismos planctônicos (por exemplo, Meyer & Heritage, 1941, Hart, 1986). No entanto, Schulz e Liess (1999) conduziram um estudo de campo sobre os efeitos da entrada de inseticidas derivados da agricultura sobre macroinvertebrados bentônicos de corredeiras e também não encontraram correlação entre o componente hidráulico (descarga de água), turbidez, teor de nutrientes e os efeitos toxicológicos observados sobre a fauna aquática.

Embora muitas investigações sobre os efeitos toxicológicos de ivermectinas sobre espécies invertebrados bentônicos já foram realizadas (Brinke et al., 2010, Allen et al., 2007, Burrige & Haya, 1993, Freitas et al., 1996, Davies et al., 1997, Davies et al., 1998), informação para a toxicidade de abamectina em invertebrados foram quase completamente restrito a organismos do solo (e.g. Athanassiou & Korunic, 2007, Kolar et al., 2008, Hussain et al., 2012 e Abdel-Wali, 2012).

Quironomídeos são importantes componentes muitas vezes dominantes das comunidades de macroinvertebrados bentônicos (Trivinho-Strixino, 2011). Devido à sua

importância ecológica (Huryn & Wallace, 1986, Wallace, 1987) estes invertebrados também têm sido usados como organismos-teste no monitoramento ambiental, incluindo a avaliação da toxicidade de pesticidas (Rakotondravelo et al., 2006, Faria et al., 2007, Pestana et al., 2009).

De acordo com Novelli et al. (2012a) a abamectina é altamente tóxica para microcrustáceos, insetos e peixes. Em seu estudo, o organismo-teste foi *C. sancticaroli* e a CL50 - 96h deste composto puro foi de 2,67  $\mu\text{g L}^{-1}$ , uma concentração mais elevada do que a encontrada para o Vertimec no presente estudo. Os nossos resultados indicaram que a formulação comercial é consideravelmente mais tóxica do que o seu ingrediente ativo, uma vez que a CL50 - 96h do Vertimec para *C. sancticaroli* foi de apenas 97,0  $\text{ng L}^{-1}$ , uma concentração três vezes mais baixa do que a encontrada para a abamectina pura.

Considerando a maior toxicidade do Vertimec para *C. sancticaroli*, em comparação com a da abamectina pura, infere-se que outros compostos presentes na fórmula comercial poderiam causar fortes efeitos tóxicos sobre este organismo. Talvez isso seja consequência do fato de que a abamectina pura pode ser facilmente e rapidamente degradada em comparação com a formulação comercial de Vertimec que incluem outros compostos que podem até aumentar a persistência da abamectina (Novelli et al., 2012b).

As condições favoráveis no cultivo dos organismos, e também durante os ensaios de toxicidade em laboratório, tais como: a quantidade e qualidade do alimento fornecido, a temperatura elevada, resultando em um desenvolvimento rápido ao longo de todo o ciclo de vida (Strixino & Strixino, 1985), provavelmente contribuíram para as altas porcentagens de sobrevivência nos tratamentos sem contaminação. A relação filogenética próxima dos quironomídeos com outros artrópodes (insetos) que são o principal alvo da aplicação da abamectina pode explicar os valores elevados de mortalidade e o desenvolvimento incompleto registrado para *C. sancticaroli*. Considerando a ampla utilização deste pesticida, a sua presença em ambientes aquáticos é altamente provável, o que representa um risco para todos os artrópodes aquáticos, incluindo um dos grupos bentônicos mais importantes, os quironomídeos.

Os nossos resultados revelam que o pesticida Vertimec representa um sério risco para a biota aquática e concluímos que seu uso indiscriminado, como reportado por Nunes e Espíndola (2012) também pode impor riscos para a conservação da biodiversidade.

## 5. Conclusões

O pesticida Vertimec é extremamente tóxico ambos, diretamente dissolvido na água, ou indiretamente através da contaminação via lixiviado, mesmo em baixas concentrações, provocando efeitos significativos sobre a sobrevivência e desenvolvimento dos quironomídeos. Este pesticida foi considerado mais tóxico para *C. sancticaroli* que a abamectina, o seu ingrediente ativo, com base na comparação dos resultados aqui obtidos com os dados da literatura. Como o pesticida Vertimec tem sido amplamente utilizado na produção de batata e morango no Brasil e por seu efeito altamente prejudicial sobre os organismos aquáticos, o uso deste produto representa um risco grave para a conservação da biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos e deve ser controlado.

## 6. Referências bibliográficas

Abdel-Wali, M., T. Mustafa & M. Al-Lala, 2012. Residual toxicity of abamectin, milbemectin and chlorfenapyr to different populations of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on Cucumber in Jordan. *World Journal of Agricultural Sciences* 8: 174-178.

Allen, Y. T., J. E. Thain, S. Haworth & J. Barry, 2007. Development and application of long-term sublethal whole sediment tests with *Arenicola marina* and *Corophium volutator* using Ivermectin as the test compound. *Environmental Pollution* 146: 92-99.

Apha, American Public Health Association (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 Ed. Washington D. C.

Athanassiou, C. G. & Z. Korunic, 2007. Evaluation of two new diatomaceous earth formulations, enhanced with abamectin and bitterbarkomycin, against four stored-grain beetle species. *Journal of Stored Products Research* 43: 468-473.

Brinke, M., S. Höss, G. Fink, T. A. Ternes, P. Heiningerc & W. Traunspurger, 2010. Assessing effects of the pharmaceutical ivermectin on meiobenthic communities using freshwater microcosms. *Aquatic Toxicology* doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.008.

Bilotta, G. S. & R. E. Brazier, 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research* 42: 2849-2861.

Braun, A. S., A. Novelli, B. H. Vieira & E. L. G. Espindola, 2012. Ecotoxicological effects of Vertimec<sup>®</sup> on plankton. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 7: 23-29.

Burg, R. W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. A. Currie, R. Hartman, Y. KONG, R. L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J. B. Tunac, H. Wallick, E. O. Stapley, R. Oiwa & S. Omura, 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 15: 361-367.

Burridge, L. E. & K. Haya, 1993. The lethality of ivermectin, a potential agent for treatment of salmonids against sea lice, to the shrimp *Crangon septemspinosa* *Aquaculture* 117: 9-14.

Campbell, W. C., 1989. Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.

Davies, I. M., P. A. Gillibrand, J. G. McHenry & G. H. Rae, 1998. Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. *Aquaculture* 163: 29-46.

Davies, I. M., P. A. Gillibrand, J. G. McHenry & G. H. Rae, 1997. Environmental risk from dissolved ivermectin to marine organisms. *Aquaculture* 158: 263-275.

Elbetieha, A. & S. I. Da'as, 2003. Assessment of antifertility activities of abamectin pesticide in male rats *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 307-313.

Faria, M. S., A. J. A. Nogueira & A. M. V. M. Soares, 2007. The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 218-226.

Fisher, M. H. & H. Mrozik, 1992. The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32: 537-53.

Fonseca, A. L. & O. Rocha, 2004. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). *Acta Limnologica Brasiliensia* 16: 153-161.

Freitas, R. M. C., M. A. Faria, S. N. Alves & A. L. Melo, 1996. Effects of ivermectin on *Culex quinquefasciatus* larvae. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 38: 293-297.

Gulley, D. D., A. M. Boelter & H. L. Bergman. 1994. Toxtat 3.4 Computer Program.

Hamilton, M., R. C. Russo & R. V. Thurston, 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology* 11: 714-719.

Hart, R. C., 1986. Zooplankton abundance, community structure and dynamics in relation to inorganic turbidity, and their implications for a potential fishery in subtropical Lake le Roux, South Africa. *Freshwater Biology* 16: 351-371.

Høy, T., T. E. Horsberg & I. Nafstad, 1990. The disposition of ivermectin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Pharmacology & Toxicology* 67: 307-312.

Hurn, A. D. & J. B. Wallace, 1986. A method for obtaining in situ growth rates of larval Chironomidae (Diptera) and its application to studies of secondary production. *Limnology and Oceanography* 31: 216-222.

Hussain, R., M. Ashfaq & M. A. Saleem, 2012. Effect of Abamectin on Body Protein Content and Activity of Selected Enzymes in Adults of Insecticide-Resistant and -Susceptible Strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pakistan Journal of Zoology* 44: 1159-1163.

Kolar, L., N. K. Erzen, L. Hogerwerf, A. M. Cornelis & V. Gestel, 2008. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution* 151: 182-189.

Lanças, F. L., 2004. Validação de métodos cromatográficos de análise. Rima, São Carlos, São Paulo.

Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Agrofit, sistemas de agrotóxicos fitossanitários.

[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_f](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5314&p_tipo_janela=NEW)  
[ormulado\\_tecnico=5314&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5314&p_tipo_janela=NEW). Accessed 14 February 2013.

Meyer, B. C. & A. Heritage, 1941. Effect of turbidity and depth of immersion on apparent photosynthesis in *Ceratophyllum demersum*. *Ecology* 22: 17-22.

Nunes, M. E. T. & E. L. G. Espíndola, 2012. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology* doi 10.1007/s10646-012-0859-6.

Novelli, A., B. V. Vieira, D. Cordeiro, L. T. D. Cappelini, E. M. Vieira & E. L. G. Espíndola, 2012a. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere* 86: 36-40.

Novelli, A., B. V. Vieira, A. M. Vasconcelos, A. C. Peret & E. L. G. Espíndola, 2012b. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec<sup>®</sup> 18EC on *Daphnia similis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87: 93-75.

Pestana, J. L. T., S. Loureiro, D. J. Baird & A. M. V. M. Soares, 2009. Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology* 93:138-149.

Pimentel, J. R., 1991. Pesticide use. *Science* 252-358.

Rabeni, C. F., K. E. Doisy & L. D. Zweig, 2005. Stream invertebrate community functional responses to deposited sediment. *Aquatic Sciences* 67: 395-402.

- Rakotondravelo, M. L., T. D. Anderson, R. E. Charlton & K. Y. Zhu, 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 360-366.
- Roth, M., R. H. Richards & C. Sommerville, 1993. Current pesticides in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture, a review. *Journal of Fish Diseases* 16: 1-26.
- Schenck, F. J. & L. H. Lagman, 1999. Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of AOAC International* 82: 1340-1344.
- Schulz, R. & M. Liess, 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology* 46: 155-176.
- Strixino, G. & S. T. Strixino, 1985. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sanctocaroli* (Diptera: Chironomidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 3: 177-180.
- Suguio, K., 1973. *Introducao a sedimentologia*. Edgard Blucher, São Paulo.
- Trivinho-Strixino, S., 2011. *Larvas de Chironomidae: Guia de identificação*. São Carlos.
- Tisler, T. & N. K. Erzen, 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology* 15: 495-502.

Teixeira, C., J. G. Tundisi & M. B. Kutner, 1965. Plankton studies in mangrove environmental. II. The standing stock and some ecological factors. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 24: 23-41.

Wallace, J. B., T. F. Cuffney, C. C. Lay and D. Vogel, 1987. The influence of an ecosystem-level manipulation on prey consumption by a lotic dragonfly. *Canadian Journal of Zoology* 65: 35-40.

### **Estudos de campo em mesocosmos e em laboratório para a avaliação dos efeitos tóxicos de Vertimec<sup>®</sup> 18 CE sobre a comunidade bentônica, com ênfase em *Chironomus sancticaroli***

#### **Resumo**

O pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é um composto químico com uma ampla utilização na agricultura para o controle de pragas animais, em diversas culturas. No entanto, é um composto muito perigoso, altamente persistente e extremamente tóxico. Um grande problema em relação à sua aplicação é que, além dos insetos-praga, muitas outras espécies não-alvo podem ser afetadas, mesmo as aquáticas, por exemplo, por meio da água do escoamento superficial (lixiviado) contaminada. No presente estudo, um experimento de campo, simulando o escoamento superficial ao longo de uma parcela de solo contaminada com este pesticida foi realizado com o objetivo de investigar o efeito tóxico do lixiviado de terra agrícola tratada com Vertimec sobre as espécies de macroinvertebrados bentônicos (em nível de população e de comunidade). O desenho experimental consistiu de duas parcelas agrícolas a 6m de distância, uma não-contaminada, servindo como controle, e outra que foi contaminada com 0,125 L m<sup>-2</sup> de Vertimec utilizando um pulverizador manual portátil. Amostras do lixiviado foram coletadas logo após a jusante das parcelas. Uma fração foi utilizada para análises físicas e químicas e a amostra restante foi inoculada em 12 câmaras cilíndricas, imersas em um tanque cheio com a água do Reservatório do Lobo, em um mesocosmo construído nas imediações. Além das câmaras não contaminadas (controles) havia dois tratamentos, um contaminado via lixiviado (RC) e outro com a adição direta do Vertimec<sup>®</sup> 18EC (V), o que correspondia a 4 e 40 µg L<sup>-1</sup> de abamectina, respectivamente. Em todos os tratamentos 10 larvas de *Chironomus sancticaroli* foram inoculadas como organismos-teste (dentro de uma gaiola), juntamente com a comunidade de macroinvertebrados bentônicos dos mesocosmos naturais. O experimento teve duração de sete dias (168 h), com as amostragens sendo realizadas no tempo 0 (antes da contaminação) e 3,

48, 96, 120 e 168h após a contaminação. Os testes de toxicidade aguda foram realizados em laboratório com as amostras coletadas após 3 horas. Os resultados mostraram efeitos tóxicos apenas para o tratamento com a maior concentração de Vertimec, em que a mortalidade das larvas de quironomídeos foi de 100%. Depois de 168 horas os organismos-teste foram checados quanto à toxicidade crônica. O comprimento e a largura do corpo das larvas no tratamento RC foram menores do que os das larvas de ambos, o controle e o lixiviado não contaminado (RNC), evidenciando que a exposição crônica ao tratamento RC afetou o crescimento das larvas de *C. sancticaroli*. Além disso, algumas das larvas (4,2%) apresentaram deformidades no mento no mesmo tratamento. A análise da comunidade nos mesocosmos no final do experimento mostrou que no tratamento com a aplicação direta do Vertimec (V), houve uma redução de quase 80% na riqueza de táxons e na densidade total de macroinvertebrados bentônicos em comparação com a comunidade existente no controle. Nenhum táxon pertencente à Classe Insecta foi registrado no tratamento contaminado corroborando o forte efeito inseticida do produto utilizado. De todos os resultados obtidos podemos concluir que Vertimec é altamente tóxico para comunidade de macroinvertebrados bentônicos e que os ecossistemas aquáticos contaminados pelo escoamento superficial oriundo de campos agrícolas, onde este produto tem sido utilizado serão adversamente afetados.

Palavras-chave: ecotoxicologia aquática, pesticidas, abamectina, lixiviado, mesocosmo.

### **Abstract**

The pesticide Vertimec<sup>®</sup> 18 EC is a chemical compound with a large use on agriculture to control animal pests in many crops. It is however a very dangerous toxicant, highly persistent and extremely toxic. A great problem regarding its application is that besides the pest insects, many other non-target species can be affected even the aquatic ones via contaminated runoff. In the present study a field experiment simulating the runoff over a field plot contaminated with this pesticide was carried out aiming to investigate the toxic effect of the runoff from agricultural land treated with Vertimec on benthic macroinvertebrates species (at population and community level). Experimental set up consisted of two 6 m apart agricultural plots, one

non-contaminated, acting as control, and the other that was contaminated with  $0.125 \text{ L m}^{-2}$  of Vertimec using a portable sprayer. Runoff samples were obtained soon after collected downstream the plots. One fraction was used for physical and chemical analysis and the remaining sample was inoculated in 12 cylindrical chambers, immersed in a water tank filled with Lobo Reservoir water, in a nearby constructed mesocosm. Besides uncontaminated chambers (controls) there were two treatments, one contaminated via runoff and other with the direct application of pure Vertimec, corresponding to 4 and  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  of abamectin respectively. In all treatments 10 *Chironomus sancticaroli* larvae were inoculated as test organisms (inside each enclosure), together with the natural mesocosm benthic community. The experiment lasted 7 days (168h), with samplings carried out at time 0 (before contamination) and 3, 48, 96, 120 and 168h after contamination. Laboratory acute toxicity tests were performed in the laboratory with the samples collected after 3 hours. The results showed toxic effect only for the treatment with the highest concentration of Vertimec, where the chironomid larvae mortality was 100%. After 168 hours the test-organisms were checked for chronic toxicity. The body length and the width of the larvae in the contaminated runoff were smaller than those of the larvae from both the control and non-contaminated runoff, evidencing that the chronic exposure to the runoff affected the growth of *C. sancticaroli* larvae. In addition some larvae in the contaminated mesocosm (4.2%) had mentum deformities. The analyses of the whole community in the mesocosms at the end of the experiment showed that in the treatment with direct application of vertimec (V), there was an almost 80% decrease in the richness of taxa and in the total density of benthic organisms in comparison with the control community. No taxa belonging to the Class Insecta were recorded in the contaminated treatment, corroborating the strong insecticide effect of this product. From all results obtained we conclude that Vertimec is highly toxic to benthic macroinvertebrates community and that the aquatic ecosystems contaminated by the agricultural runoff of this product will be adversely affected.

Keywords: aquatic ecotoxicology, pesticides, abamectin, runoff, mesocosm.

## Introdução

Os problemas causados pelo uso intenso de pesticidas e seus resíduos no meio ambiente tornaram-se uma área de pesquisa consolidada em estudos ambientais, incluindo a avaliação de risco ecológico para estas substâncias nos ecossistemas aquáticos (Scorgie, 1980; Whiles & Wallace, 1992; Lugthart & Wallace, 1992; Solomon et al., 1996; Schulz & Liess, 1999; Neumann & Dudgeon, 2002; Faria et al., 2007; Pestana et al., 2009). Embora os efeitos benéficos de pesticidas em aumentar a produtividade agrícola sejam considerados uma exigência, o seu uso indiscriminado pode causar vários problemas que são motivos de grande preocupação hoje em dia, principalmente em relação à saúde humana e conservação da biodiversidade. Algumas estimativas indicam que menos de 0,3% de um produto aplicado nos campos agrícolas atinge os organismos-alvo (Pimentel, 1991), enquanto que o restante é perdido, atingindo os ecossistemas aquáticos por meio de processos de escoamento superficial, percolação e precipitação.

O Vertime<sup>®</sup> 18 CE é um químico com múltiplos usos na agricultura, principalmente como inseticida, nematicida ou acaricida. É utilizado no mundo todo em mais de 50 culturas (Syngenta, 2013), incluindo frutas, legumes e algodão, bem como para flores e outros cultivos de plantas ornamentais (MAPA, 2013). Este pesticida tem a abamectina como ingrediente ativo, que consiste de uma mistura contendo cerca de 80% de avermectina B1a (C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>) e 20% de avermectina B1b (C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>) (Wislocki et al., 1989).

As avermectinas (por exemplo, abamectina, doramectina, ivermectina) são obtidas a partir dos produtos de fermentação natural do actinomiceto de solo *Streptomyces avermitilis* descoberto em 1975 pela Merck & Co., Inc (Burg et al., 1979). Estes compostos são pouco solúveis em água, mas altamente lipofílicos e facilmente solúveis em muitos solventes orgânicos (Roth et al., 1993). Devido ao caráter lipofílico sua distribuição no solo é limitada (Kolar et al., 2008).

A abamectina difere da ivermectina apenas pelo fato de possuir um 22-, 23-olefina enquanto que a ivermectina é saturada nestas posições. Embora a toxicidade de ambas também seja semelhante (Fisher & Mrozik, 1992), a ivermectina é considerada um pouco menos tóxica (Lankas & Gordon, 1989) e é, portanto, amplamente utilizada na medicina veterinária contra endo e ectoparasitas de bovinos, ovinos, suínos e eqüinos, assim como anti-helmíntico no tratamento profilático para algumas verminoses caninas (Omura, 2008). Apesar

do grande sucesso como um anti-parasiticida animal, seu uso na medicina humana tem sido menos proeminente, com uma notável exceção, atualmente, é o fármaco de escolha para a prevenção dos efeitos de uma das mais graves infecções humanas causadas pela filaria do nematóide *Onchocerca volvulus*, o agente causador da doença tropical denominada oncocercose (Fisher & Mrozik, 1992).

A classificação toxicológica oficial do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE é na classe III (“moderadamente tóxico”) (MAPA, 2013). Entretanto, a sua classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental está enquadrado na classe II, isto é, um composto muito perigoso, altamente persistente e extremamente tóxico para microcrustáceos e vertebrados, afetando os organismos não-alvo (Campbell et al., 1989).

De acordo com Tišler e Eržen (2006) o principal alvo das avermectinas é o sistema nervoso central (SNC) das pragas. Por exemplo, em artrópodes e nematóides a interação destes compostos com os receptores GABAérgicos presentes na membrana pós-sináptica estimula o fluxo de íons cloreto para o interior das célula nervosas causando um intenso influxo de cloreto, resultando na interrupção dos sinais neurais e produzindo sintomas de excitação e/ou paralisia.

De acordo com Syngenta (2013), o Vertimec é um dos poucos produtos agrícolas (pesticidas) com uso em baixas concentrações confirmando assim a sua eficácia e alto nível de toxicidade para invertebrados do solo (Nunes & Espíndola, 2012), e também para outros organismos aquáticos (Braun et al., 2012 e Novelli et al., 2012a). Devido ao seu uso intensivo, e destino final em corpos d'água, este pesticida pode representar um risco para a biota aquática e, possivelmente, também para a saúde humana.

Neste contexto, procuramos testar a hipótese de que o escoamento produzido em campos tratados com Vertimec<sup>®</sup> 18 CE (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, Brasil) tem efeitos tóxicos sobre organismos bentônicos de água doce. Para testar esta hipótese, foi realizada uma simulação de escoamento superficial em campo mais experimentos em laboratório e mesocosmo localizado ao ar livre, utilizando a espécie *Chironomus sancticaroli* como organismo-teste. Os quironomídeos são componentes importantes e muitas vezes dominantes nas comunidades de macroinvertebrados bentônicos (Trivinho-Strixino, 2011a). Devido à sua importância ecológica (Huryń & Wallace, 1986, Grimm, 1988, Jones et al, 2008) este grupo também têm sido utilizado na monitoramento ambiental (Rakotondravelo et al, 2006, Pestana et al, 2009). *C. sancticaroli* já foi utilizado

para avaliar os efeitos tóxicos de pesticidas em ecossistemas aquáticos (Printes et al., 2011, Novelli et al., 2012b).

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. escoamento superficial em campo e experimento em mesocosmo*

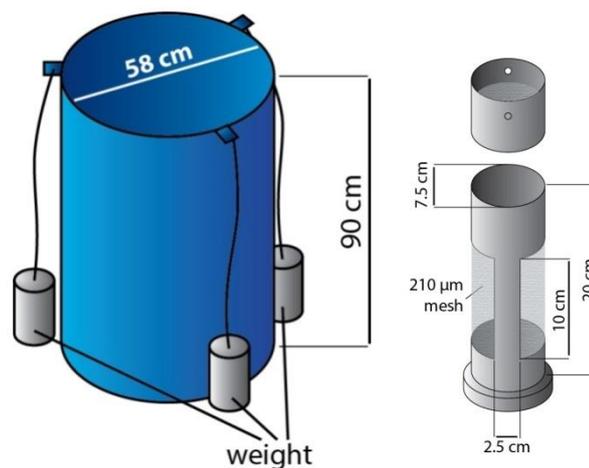
O presente trabalho foi realizado no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), localizado no município de Itirapina, São Paulo, Brasil (22° 01' 22'' S, 43° 57' 38'' W). Para a simulação do escoamento superficial em campo, em uma área com 6% de inclinação, duas parcelas agrícolas medindo 8 m<sup>2</sup> cada foram estabelecidas, capinadas e aradas. As amostras de solo nas parcelas experimentais foram analisadas quanto à granulometria e teor de matéria orgânica (Suguio, 1973). Elas foram consideradas arenosas, compostas predominantemente por areia fina (29,4%) e com 4,2% de matéria orgânica. Antes do experimento uma parcela foi coberta com uma lona plástica para evitar a contaminação, a fim de servir como controle, enquanto a outra foi contaminada com Vertimec usando um pulverizador portátil para aplicar 0,125 L m<sup>-2</sup>, seguindo as instruções do fabricante para morangueiros (0,75 mL L<sup>-1</sup> de Vertimec). Uma chuva simulada foi aplicada a montante das parcelas de solo para gerar o lixiviado. O volume de água aplicado foi de 25 mm m<sup>-2</sup> baseado nos dados históricos para os meses de verão obtidos na estação meteorológica do CRHEA localizada a poucos metros da área experimental. Houve precaução para que no momento de simulação da chuva não estivesse ventando. As amostras do lixiviado foram coletadas imediatamente a jusante das parcelas, onde este se encontrava acumulado em lonas de plásticas previamente colocadas em depressões. Parte das amostras foi utilizada para análises físicas e químicas e o restante da amostra foi inoculado em 12 câmaras cilíndricas, imersas em um tanque cheio com a água do Reservatório do Lobo. As câmaras foram feitas de polietileno de alta densidade (PEAD), com 60 cm de diâmetro, 90 cm de altura, volume aproximado de 200L e abertas em ambas as extremidades, topo e fundo. As câmaras foram previamente lavadas com ácido nítrico a 5%, acetona e água destilada. Alguns dias antes do início do experimento as câmaras foram colocadas em um tanque de concreto construído próximo à margem e preenchido com água do Reservatório do Lobo, medindo 10,24 m<sup>2</sup> de comprimento por 1,14 m de profundidade, com uma camada de aproximadamente 10 cm de sedimento natural e uma comunidade biológica completamente estabelecida. Em seguida, as 12 câmaras

referidas como mesocosmos, foram colocadas no tanque, mantendo contato direto com o sedimento. Pesos de concreto com 12 kg foram usados para fixar os mesocosmos no fundo do tanque, impedindo-os de flutuar e também impedindo a troca de água, sedimento e biota aquática entre as câmaras. O mesocosmo foi deixado em repouso por dois dias para permitir a estabilização antes do início do experimento.

A formulação comercial da abamectina, o Vertimec, foi selecionada como um tóxico para o presente estudo ao invés da abamectina pura, previamente testada por Novelli et al. (2012b), com o objetivo de obter resultados mais realistas sobre o impacto toxicológico deste pesticida sobre organismos não-alvo sensíveis. Essa escolha também foi baseada na história recente do uso freqüente e indiscriminado deste produto químico no município de Bom Repouso, Minas Gerais, Brasil, conforme relatado por Nunes e Espíndola (2012).

Após a produção experimental de escoamento superficial em campo, as amostras de lixiviado contaminado e não contaminado, bem como a formulação do pesticida foram adicionadas nos mesocosmos, em todos os casos com uma contaminação única. O experimento foi realizado com quatro tratamentos (Figura 1) e com três repetições cada: (1) câmara de controle (C), sem contaminação, mantendo as mesmas condições da água quando colocadas no tanque de concreto, (2) câmaras com o escoamento superficial não contaminado (RNC), que receberam água não contaminada a partir da parcela de campo. Para este efeito, um total de 20 L de água foi removida da câmara e substituído pelo escoamento não contaminado, resultando em 10% do escoamento superficial em relação ao volume total de água (200 L), (3) câmara com lixiviado contaminado (RC), que recebeu o escoamento superficial do terreno contaminado com Vertimec, na mesma proporção do tratamento RNC, e (4) câmara com Vertimec (V), na qual 0,4 mL de Vertimec foi adicionado à água da câmara. Nos tratamentos RC e V, os valores reportados correspondem às concentrações nominais de cerca de 4 e 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. A concentração deste último tratamento baseou-se na concentração real medida no escoamento da água contaminada em um estudo anterior (Novelli, 2010), e representando cerca de 100% da concentração de Vertimec no escoamento superficial. As concentrações de abamectina finais reportadas para cada câmara foram baseadas apenas na concentração nominal inicial. As concentrações finais não foram medidas, uma vez que a formulação comercial contém outros compostos que podem ter toxicidade igual ou superior à da abamectina pura, embora estas informações não sejam fornecidas pelo fabricante.

Depois do início do experimento com a contaminação dos mesocosmos, as amostras de água foram coletadas para a realização dos ensaios ecotoxicológicos e para a análise das variáveis físicas e químicas. O período experimental foi de sete dias (168 h), com amostragens realizadas no tempo 0 (antes da contaminação) e 3, 48, 96, 120 e 168h após a contaminação. Os testes iniciais de toxicidade foram realizados três horas após a contaminação e *C. sancticaroli* foi adotado como organismo-teste. Durante todo o experimento, as câmaras foram cobertas com lonas de plástico transparente durante a noite para evitar os efeitos da precipitação e, possivelmente, de diluição.



**Figura 1.** Vista da área experimental em tanque de mesocosmo instalado perto da Represa do Lobo e um esquema das câmaras experimentais de polietileno (além das gaiolas que abrigaram os organismos-teste durante o bioensaio crônico).

## 2.2 Análises físicas e químicas da água

Medidas da concentração de oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica, temperatura e pH do lixiviado contaminado (RC) e não contaminado (RNC), coletados a partir das parcelas de campo foram realizadas utilizando-se um medidor de OD YSI, um condutivímetro Orion 145A e um potenciômetro Micronal B374. Estas mesmas variáveis foram mensuradas no início e no final dos testes de toxicidade em laboratório com larvas de quironomídeos utilizando os mesmos métodos e equipamentos.

No teste de toxicidade *in situ* as análises foram feitas com o auxílio de um multi-sensor da marca Horiba, modelo U-10.

A turbidez foi medida com um espectrofotômetro Hach DR/2000, de acordo com APHA (1995) e os sólidos suspensos foram quantificados por gravimetria após filtração em filtros de fibra de vidro (GF / C - 47 mm) de acordo com os procedimentos descritos por Teixeira et al. (1965). A dureza foi medida por titulação com EDTA, de acordo com APHA (1995). As concentrações de nutrientes (analisadas somente no bioensaio em mesocosmos): nitrogênio orgânico total, fósforo total e dissolvido, fosfato inorgânico (APHA, 1995), nitrito, nitrato (Mackereth et al., 1978.), amônio (Koroleff, 1976), silicato e pigmentos (clorofila e feofitina) (Golterman et al., 1978) foram também analisadas por espectrofotometria.

## 2.3 Testes de toxicidade em laboratório

Os procedimentos para os testes com *C. sancticaroli*, bem como a preparação da água de cultivo, seguiram os métodos propostos por Fonseca e Rocha (2004). A dureza da água de cultivo adotada foi em torno de 40 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Para avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste, a sensibilidade ao cloreto de potássio foi testada nas concentrações: 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g L<sup>-1</sup>, e as diferenças testadas estatisticamente pelo método Trimmed Spearman-Kärber e expressas como CL50 - 96h (Hamilton et al., 1977). Para realizar estes testes seis larvas de quironomídeos (7 - 8 dias de idade - IV instar) foram expostas em copos de plástico atóxico, contendo 240 mL de solução de teste KCl, com três repetições para cada tratamento. Os testes foram mantidos em sala com temperatura controlada (23 ± 2 ° C) e fotoperíodo 12h/12h (claro/escuro).

Com o objetivo de reforçar a avaliação das condições fisiológicas dos organismos-teste durante o período dos experimentos, neste estudo também quantificamos a emergência de adultos (%) e a incidência de deformidades no mento dos organismos (%). Para a

observação de emergência, a análise foi feita com 400 organismos a partir de duas culturas selecionadas, escolhidas aleatoriamente. Exúvias de pupa foram registradas para confirmar a emergência dos adultos. Para as deformidades no mento 200 larvas (100 organismos escolhidos aleatoriamente em cada cultura) foram analisadas. Para verificar a incidência de deformidades foram montadas lâminas semi-permanentes com as peças de bucais dos organismos preservados selecionados (7-8 dias de idade - IV instar). Os animais foram examinados sob um microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus com aumento de 640 vezes. Foi considerado satisfatório e viável o conjunto de cultura de conjuntos onde as percentagens de emergência dos adultos foi superior a 95% (média da emergência obtidas em séries históricas no laboratório), e a incidência de deformidades foram inferiores a 1% (Wiederholm, 1984, Swansburg et al., 2002).

A análise de deformidade no mento dos quironomídeos nos testes de toxicidade foi conduzida de acordo com a mesma metodologia descrita acima. A decisão de utilizar este parâmetro como índice de toxicidade crônica foi baseada na observação de deformidades em alguns indivíduos durante os testes preliminares, quando foram utilizadas amostras de lixiviado contaminado e não contaminado. Os testes de toxicidade em laboratório foram realizados com amostras de água dos mesocosmos sem diluição. Dois tipos de controle foram estabelecidos, um com água de cultivo e sedimento natural (controle 1 = C1) e outro com água de cultivo e sedimento artificial (areia atóxica com granulometria padronizada) (controle 2 = C2). Antes da sua utilização na montagem dos testes de toxicidade, o sedimento natural foi peneirado em peneira com malha de 500 µm de abertura (para remoção da fauna local, como por exemplo, dípteros e oligoquetos), armazenado em baldes de plástico não tóxico e colocados dentro de um congelador. Os procedimentos adotados no presente estudo ainda permitiram a passagem de alguns organismos, como pequenos oligoquetos, razão pela qual o sedimento foi deixado no congelador por três dias com o objetivo de exterminar estes organismos.

Nos testes de toxicidade aguda com *Chironomus sancticaroli*, 6 larvas (7 - 8 dias de idade - IV instar) foram utilizadas em cada uma das três repetições para cada tratamento e os experimentos foram mantidos em sala com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  ° C) e fotoperíodo 12h/12h (claro/escuro). As amostras foram expostas em copos de plástico atóxicos contendo 240 ml de solução de teste e 60g de sedimento natural. O teste teve a duração de 96 horas, após o que os organismos vivos sobreviventes foram contados.

Para a realização dos testes crônicos foi utilizada a metodologia descrita por Fonseca (1997). Os seguintes parâmetros foram analisados: sobrevivência, incidência de deformidades nos quironomídeos, comprimento e largura do corpo e da cápsula cefálica. Quarenta indivíduos do segundo instar foram selecionados aleatoriamente a partir das mesmas culturas e medidos em relação às mesmas variáveis. Larvas do segundo instar foram expostas em recipientes de plástico atóxico (1L), contendo 800 mL de solução-teste e 200g de sedimento natural. Um total de 12 organismos foi adicionado em cada réplica (duas réplicas para cada tratamento), perfazendo um total de 24 indivíduos para cada tratamento. Antes de se adicionarem os organismos-teste, adicionou-se o alimento para peixes (ração TetraMin<sup>®</sup>) e a aeração (por 24 horas) foi incorporada em todas as réplicas. Os experimentos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e de fotoperíodo descritas anteriormente nos procedimentos para os testes de toxicidade aguda. O teste de toxicidade crônica em laboratório teve a duração de 7 dias (168 horas).

#### 2.4 Testes de toxicidade *in situ*

Após a montagem da estrutura experimental básica, a instalação das gaiolas foi feita 24h antes do experimento a fim de se realizar o teste de toxicidade *in situ*. As gaiolas foram feitas de tubo de PVC, com 20 cm de comprimento, 7,5 cm de diâmetro e com o volume de 900 ml (com água e sedimento natural na proporção de 4:1), tendo uma abertura superior e inferior mais duas aberturas laterais paralelas, todas fechadas por uma malha com 210 µm de abertura. O conjunto consistiu em três gaiolas (em triplicata) em cada mesocosmo, fixadas na parte inferior. Um total de 10 organismos-teste foram adicionados em cada gaiola, totalizando 30 indivíduos para cada unidade dos mesocosmos e 90 indivíduos para cada tratamento. Servia et al. (1998) consideram 30 quironomídeos como um tamanho amostral mínimo necessário para um cálculo confiável da incidência de deformidades (%). Assim, sugere-se que o tamanho da amostra em cada tratamento foi suficiente e satisfatória.

Baseado nas densidades naturais de quironomídeos registradas na comunidade de macroinvertebrados bentônicos também analisada no presente estudo (Figura 6, neste capítulo) e na área da superfície inferior (sedimento) da gaiola utilizada no presente estudo, a densidade de 10 larvas por gaiola foi expressivamente menor do que a densidade média registrada nos mesocosmos, sem considerar a presença de outras espécies. Estas condições provavelmente reduziram o estresse em relação à concorrência por espaço e alimento,

permitindo que os quironomídeos tivessem as condições apropriadas para o crescimento. O experimento *in situ* durou 7 dias (168h) e os mesmos parâmetros avaliados no teste crônico em laboratório foram considerados para a análise. Os procedimentos metodológicos utilizados na montagem das gaiolas no experimento de campo seguiram as recomendações de Burton (1992), Burton et al. (1996), Tonissi (2000), Meletti e Rocha (2002) e Dornfeld (2006).

### *2.5 Análise da comunidade de macroinvertebrados bentônicos nos mesocosmos*

Com o intuito de estender a avaliação dos efeitos do pesticida Vertimec em organismos aquáticos, além da realização de testes de toxicidade em laboratório e em campo, no presente estudo foi avaliada a comunidade de macroinvertebrados bentônicos nos sedimentos dos mesocosmos. A riqueza de táxons e a densidade (organismos m<sup>-2</sup>) foram analisadas com a intenção de obter dados mais realistas em relação aos aspectos do risco ecológico (em relação à abordagem em mesocosmos). O conteúdo de matéria orgânica das amostras de sedimento dos mesocosmos e também das amostras naturais de sedimento utilizadas na preparação do controle C1 (experimentos em laboratório) foram analisadas. As amostragens foram realizadas em cada um dos mesocosmos (em triplicata), no final do experimento (após 168 horas). As coletas das amostras de sedimento foram feitas com o auxílio de uma Draga de Eckman (225 cm<sup>2</sup>). As amostras foram peneiradas em uma rede com malha de 0,21 mm. O material retido foi preservado em formol 8%. No laboratório, os organismos foram separados e identificados sob microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi SV 6) e microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2 Plus), utilizando-se literatura especializada, principalmente: Righi (1984), Brinkhurst e Marchese (1992), Trivinho-Strixino (2011), Souza et al. (2007) e Pinho (2008) chaves taxonômicas. A densidade de cada espécie ou táxon foi calculada a partir do número de indivíduos nas amostras e em seguida estimada para a área de 1 m<sup>2</sup> (Welch, 1948).

### *2.6 Análises estatísticas*

O teste de Fisher foi usado para avaliar diferenças significativas na sobrevivência dos organismos (em relação aos dados dos testes de toxicidade), comparando todos os tratamentos e o controle. Os testes estatísticos foram realizados com o apoio do programa computacional Toxstat (versão 3.3) (Gulley et al., 1994). Para verificar se existem diferenças significativas entre os resultados obtidos nos diferentes tratamentos para os parâmetros crescimento do

corpo e da cápsula cefálica em testes de toxicidade crônica (além das densidades de macroinvertebrados bentônicos nos mesocosmos) foi utilizada uma análise de variância one-way (Anova) (Teste de Tukey HSD - paramétrico), após a verificação dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Quando essas premissas não puderam ser cumpridas foi utilizado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Anova). Os dados foram analisados pelo *software* Statistica (versão 7.0 Stat Soft Inc.). Com o objetivo de verificar o nível de semelhança entre os tratamentos dos testes de toxicidade *in situ* com base na composição da comunidade de macroinvertebrados foi realizada uma análise de agrupamento, utilizando-se o Índice de Similaridade de Jaccard. Os dados foram analisados por meio do programa computacional Past (versão 2.02).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Análise granulométrica do solo e teor de matéria orgânica

Resultados semelhantes para a granulometria dos componentes inorgânicos e do teor de matéria orgânica foram obtidos entre as amostras de solo extraídas das parcelas experimentais não contaminadas e contaminadas (Tabela 1). Os solos eram predominantemente arenosos (acima de 40%) com uma contribuição considerável de silte (cerca de 27%) e argila (30%). O teor de matéria orgânica registrada nos solos foi baixo, cerca de 4%. Então, considerando a predominância de areia e o baixo teor de matéria orgânica, os solos podem ser considerados facilmente erodíveis, com facilidade de transporte no caso de escoamento de águas pluviais.

**Tabela 1.** Análise granulométrica e teor de matéria orgânica das amostras de solo nas parcelas experimentais. PNC = amostra de solo de parcela não contaminada; PC = amostra de solo de parcela contaminada.

Parcela experimental	PNC	PC
<b>Matéria Orgânica (%)</b>	<b>4,5</b>	<b>4,0</b>
Areia fina (%)	0,4	0,2
Areia média (%)	14,0	12,0
Areia fina (%)	28,4	30,3
Silte (%)	27,2	27,4
Argila (%)	30,0	30,1

### 3.2 Caracterização física e química das amostras do lixiviado

Valores próximos de pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, turbidez e sólidos suspensos inorgânicos foram registrados para as amostras de RNC e RC (Tabela 2). O pH da água foi ligeiramente ácido (entre 6,0 e 7,0) com uma baixa condutividade elétrica (menor que  $28 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). A concentração de oxigênio dissolvido foi superior a  $6,5 \text{ mg L}^{-1}$  e os níveis de turbidez (acima de 3000 NTU) e os sólidos suspensos totais (acima de  $3800 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram muito elevados.

No entanto, a concentração de sólidos orgânicos em suspensão foi baixa no RC ( $824,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), se comparada com o RNC ( $2822,67 \text{ mg L}^{-1}$ ).

O Vertimec é um pesticida emulsionável e concentrado com aparente presença de substâncias surfactantes na sua formulação, que rompem a tensão superficial da água e resultam em baixas concentrações de sólidos orgânicos suspensos no lixiviado contaminado. Deve-se salientar que o fabricante não fornece qualquer informação para a composição do produto, além do ingrediente ativo. Os altos valores de turbidez e sólidos suspensos totais que foram obtidos para as amostras de escoamento superficial são dados principalmente pelas características da amostra, que são oriundas do escoamento superficial em solos sem cobertura vegetal.

**Tabela 2.** Valores de pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, turbidez, sólidos suspensos orgânicos e inorgânicos (SSO and SSI, respectivamente) para as amostras contaminadas e não contaminadas do lixiviado.

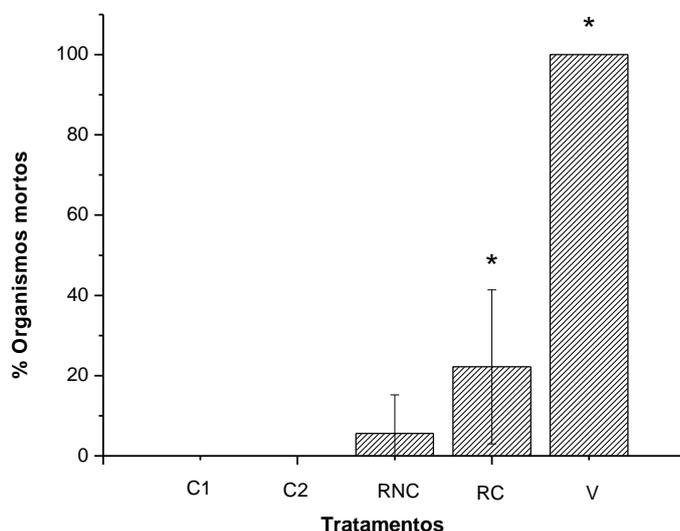
Amostras do lixiviado	pH	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	OD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)	SSI ( $\text{mg L}^{-1}$ )	SSO ( $\text{mg L}^{-1}$ )
RNC	6.27	18.3	6.88	3240	3536.7	2822.7
RC	6.68	27.3	6.77	3360	2898.7	824.0

### 3.3 Testes de toxicidade: viabilidade das culturas

Durante o período experimental, as premissas para a utilização dos organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos foram satisfeitas. Os resultados para a emergência dos adultos (99,5%) e a incidência de deformidades no mento dos quironomídeos (0%) indicam as condições saudáveis das culturas. A CL50 - 96h do cloreto de potássio para *C. sancticaroli* foi de  $3,49 \text{ g L}^{-1}$ , dentro do intervalo de sensibilidade previamente estabelecido para a espécie, a partir de testes laboratoriais ( $3,03 - 4,03 \text{ g L}^{-1}$ ).

### 3.4 Testes de toxicidade em laboratório

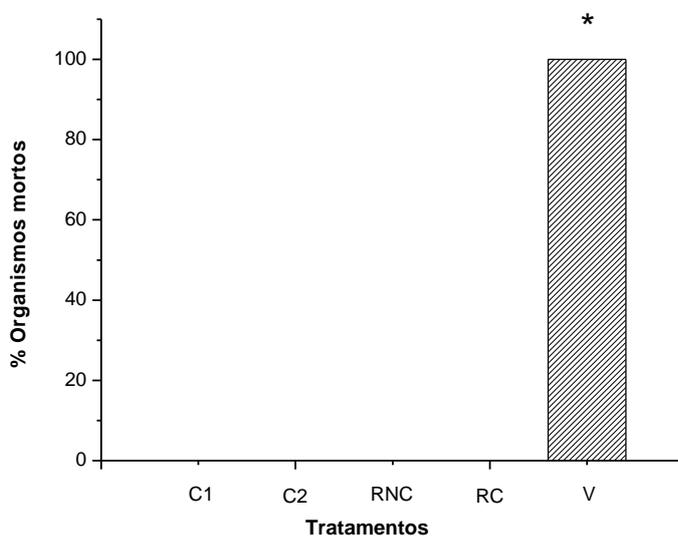
Durante os testes de toxicidade aguda (96h) em laboratório com *Chironomus sancticaroli* exposto diretamente às amostras dos mesocosmos, os valores de pH para as soluções-teste permaneceram dentro do intervalo 6,7 - 7,0; a condutividade elétrica variou entre 31,0 e 71,0  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; a concentração de oxigênio variou entre 6,5 a 7,5  $\text{mg L}^{-1}$  e a dureza entre 20 a 38  $\text{mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ . Os efeitos tóxicos foram observados em dois tratamentos: RC e V, com valores de sobrevivência significativamente diferentes do controle, com  $p \leq 0,05$  pelo Teste de Fisher (Figura 2).



**Figura 2.** Valores médios de mortalidade e desvios- padrão obtidos no teste de toxicidade aguda em laboratório com as amostras dos mesocosmos utilizando o organismo-teste *Chironomus sancticaroli*. \* Indica um valor significativamente diferente do controle com  $p \leq 0,05$  pelo Teste de Fisher, ( $n = 18$ ) (C1 = Controle 1 e C2 = controle 2).

No teste de toxicidade crônica realizado em laboratório com *Chironomus sancticaroli* exposto diretamente às amostras dos mesocosmos, os efeitos tóxicos foram observados unicamente em um tratamento, o Vertimec (V). Neste tratamento a mortalidade registrada foi de 100% (com todos os valores de sobrevivência significativamente diferentes do controle em  $p \leq 0,05$ , a partir do Teste de Fisher) (Figura 3). O pH mensurado para as soluções-teste permaneceu dentro do intervalo 6,8 -7,9. A condutividade elétrica variou entre 27,1 e 99,4  $\mu\text{S}$

cm<sup>-1</sup> e a concentração de oxigênio dissolvido variou entre 6,2 - 7,9 mg L<sup>-1</sup>. Os valores registrados para a dureza da água variaram entre 20 e 44 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>.



**Figura 3.** Valores médios de mortalidade e desvios- padrão obtidos em teste de toxicidade crônica em laboratório com as amostras dos mesocosmos utilizando o organismo-teste *Chironomus sancticaroli*. \* Indica um valor significativamente diferente do controle com  $p \leq 0,05$  pelo Teste de Fisher, (n = 24) (C1 = Controle 1 e C2 = controle 2).

No presente trabalho, um parâmetro adicional, a incidência de deformidades no mento dos quironomídeos, também foi utilizado para verificar os efeitos crônicos do pesticida Vertimec sobre as larvas de quironomídeos. Foi testada a hipótese de que a frequência de deformidades no mento dos quironomídeos pode ser maior nos tratamentos contaminados em comparação com as frequências obtidas no controle. Mas, em laboratório os resultados não confirmaram essa hipótese, uma vez que nenhum indivíduo apresentou qualquer tipo de deformidade no mento em todas as réplicas de todos os tratamentos. Foi ainda testada a hipótese de que o desenvolvimento e crescimento dos quironomídeos também podem ser afetados nos tratamentos contaminados diferentemente daqueles nos controles (Tabela 3). Em relação aos indivíduos do inóculo inicial (40 larvas), os resultados do teste paramétrico de Tukey HSD não indicaram diferenças significativas para todos os parâmetros (dimensões avaliadas para o corpo e cápsula cefálica) ( $p > 0,05$ ). Assim, estes dados foram utilizados como medições das dimensões iniciais dos indivíduos. Para avaliar uma possível diferença significativa entre o comprimento e a largura do corpo e da cápsula cefálica dos indivíduos

sobreviventes nos testes de toxicidade crônica realizados com a espécie *C. sancticaroli* no laboratório, foi utilizado um teste não-paramétrico.

**Tabela 3.** Valores médios ( $\pm$  DP) do comprimento e largura da cápsula cefálica e do corpo de organismos sobreviventes aos ensaios de toxicidade crônica realizados em laboratório e *in situ*, e do inóculo inicial (40 indivíduos) (C, C1 e C2: controles, RNC: lixiviado não contaminado, RC: lixiviado contaminado, V: aplicação direta do Vertimec).

Teste de toxicidade crônica em laboratório				
Tratamento	Comp. Cápsula ( $\mu\text{m}$ )	Larg. Cápsula ( $\mu\text{m}$ )	Comp. corpo ( $\mu\text{m}$ )	Larg. corpo ( $\mu\text{m}$ )
C1	740,0 ( $\pm 54,1$ )	508,3 ( $\pm 34,8$ )	10550,0 ( $\pm 1604,6$ )	757,5 ( $\pm 115,8$ )
C2	710,0 ( $\pm 63,8$ )	485,0 ( $\pm 27,8$ )	8800,0 ( $\pm 664,0$ )	645,8 ( $\pm 100,0$ )
RNC	732,5 ( $\pm 63,2$ )	505,0 ( $\pm 32,4$ )	11093,0 ( $\pm 1125,1$ )	835,0 ( $\pm 121,6$ )
RC	707,5 ( $\pm 42,5$ )	480,8 ( $\pm 37,5$ )	9731,3 ( $\pm 1550,3$ )	705,0 ( $\pm 99,3$ )
V	-	-	-	-
Teste de toxicidade crônica <i>in situ</i>				
Tratamento	Comp. Cápsula ( $\mu\text{m}$ )	Larg. Cápsula ( $\mu\text{m}$ )	Comp. corpo ( $\mu\text{m}$ )	Larg. corpo ( $\mu\text{m}$ )
C	641,8 ( $\pm 59,1$ )	569,0 ( $\pm 921,2$ )	8193,0 ( $\pm 1631,1$ )	647,8 ( $\pm 110,4$ )
RNC	657,3 ( $\pm 71,9$ )	459,6 ( $\pm 43,5$ )	9001,1 ( $\pm 1253,8$ )	680,9 ( $\pm 104,1$ )
RC	519,2 ( $\pm 118,8$ )	380,0 ( $\pm 88,1$ )	6789,6 ( $\pm 999,6$ )	472,9 ( $\pm 118,5$ )
V	-	-	-	-
Inóculo Inicial				
-	Comp. Cápsula ( $\mu\text{m}$ )	Larg. Cápsula ( $\mu\text{m}$ )	Comp. corpo ( $\mu\text{m}$ )	Larg. corpo ( $\mu\text{m}$ )
0 indivíduos	440,0 ( $\pm 21,72$ )	306,0 ( $\pm 21,34$ )	5554,5 ( $\pm 593,12$ )	432,5 ( $\pm 52,56$ )

Os resultados indicaram não haver diferenças significativas em relação ao comprimento da cápsula cefálica ( $p > 0,05$ ), no entanto, ocorreram diferenças significativas entre a largura da cápsula cefálica das larvas quironomídeos expostas aos tratamentos C1 e RC ( $Z = 2,8601$  e  $p = 0,0254$ ). Quanto aos parâmetros comprimento e largura do corpo, os resultados do teste de Tukey HSD indicaram diferenças significativas para ambos os parâmetros entre as larvas expostas aos tratamentos RNC e RC, C1 e C2, e também para C2 e RNC ( $p \leq 0,05$ ), sendo o comprimento e a largura do corpo das larvas expostas ao lixiviado contaminado menores do que os das larvas do lixiviado não contaminado.

### 3.5 Testes de toxicidade realizados *in situ*

#### 3.5.1 Condições físicas e químicas da água durante os testes

Em todos os tratamentos, um pequeno aumento dos valores de pH da água pode ser observado ao longo do experimento, mas houve apenas pequenas mudanças para esta variável entre os mesocosmos, com um valor médio mínimo de 4,87 no início do experimento, no tratamento RNC e um valor máximo de 7,01 também no início do experimento, no tratamento C (Tabela 4). Em relação à temperatura da água, ocorreram apenas pequenas alterações para

esta variável, desde o início até o final do experimento. A condutividade elétrica aumentou durante o experimento, com valores médios entre 20  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , no início, em todos os tratamentos, até 40  $\mu\text{S cm}^{-1}$  no final, nos tratamentos C e RNC.

**Tabela 4.** Valores médios ( $\pm$  DP) das variáveis físicas e químicas medidas na água das câmaras do mesocosmo durante o período experimental (C: controle, RNC: lixiviado não contaminado, RC: lixiviado contaminado, V: aplicação direta do Vertimec).

ríodo (horas)	pH	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	OD ( $\text{mg L}^{-1}$ )
C				
0h	4,98 ( $\pm 0,08$ )	20,07 ( $\pm 0,01$ )	20,00 ( $\pm 0,00$ )	6,11 ( $\pm 0,65$ )
3h	6,48 ( $\pm 0,17$ )	21,53 ( $\pm 0,01$ )	20,00 ( $\pm 0,00$ )	7,15 ( $\pm 0,35$ )
48h	7,01 ( $\pm 0,15$ )	19,87 ( $\pm 0,01$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	5,74 ( $\pm 0,56$ )
96h	6,68 ( $\pm 0,14$ )	19,97 ( $\pm 0,01$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	5,44 ( $\pm 0,49$ )
120h	6,59 ( $\pm 0,11$ )	20,63 ( $\pm 0,01$ )	40,00 ( $\pm 1,00$ )	5,03 ( $\pm 0,84$ )
168h	6,62 ( $\pm 0,12$ )	21,20 ( $\pm 0,10$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	5,67 ( $\pm 0,55$ )
RNC				
0h	4,87 ( $\pm 0,03$ )	20,03 ( $\pm 0,06$ )	20,00 ( $\pm 0,0$ )	5,97 ( $\pm 0,11$ )
3h	6,24 ( $\pm 0,16$ )	21,70 ( $\pm 0,10$ )	20,00 ( $\pm 0,00$ )	6,70 ( $\pm 0,40$ )
48h	6,46 ( $\pm 0,13$ )	20,00 ( $\pm 0,10$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	4,35 ( $\pm 0,21$ )
96h	6,45 ( $\pm 0,11$ )	20,10 ( $\pm 0,00$ )	40,00 ( $\pm 0,00$ )	3,14 ( $\pm 0,25$ )
120h	6,23 ( $\pm 0,07$ )	20,67 ( $\pm 0,06$ )	40,00 ( $\pm 1,00$ )	2,34 ( $\pm 0,18$ )
168h	6,18 ( $\pm 0,19$ )	21,20 ( $\pm 0,00$ )	40,00 ( $\pm 1,00$ )	1,98 ( $\pm 0,48$ )
RC				
0h	4,93 ( $\pm 0,04$ )	20,05 ( $\pm 0,07$ )	20,00 ( $\pm 0,00$ )	5,73 ( $\pm 0,21$ )
3h	6,07 ( $\pm 0,01$ )	21,55 ( $\pm 0,07$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	6,92 ( $\pm 0,18$ )
48h	6,28 ( $\pm 0,01$ )	19,85 ( $\pm 0,07$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	5,51 ( $\pm 0,12$ )
96h	6,44 ( $\pm 0,03$ )	20,15 ( $\pm 0,07$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	4,80 ( $\pm 0,17$ )
120h	6,20 ( $\pm 0,04$ )	20,70 ( $\pm 0,00$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	4,10 ( $\pm 0,18$ )
168h	6,25 ( $\pm 0,06$ )	21,15 ( $\pm 0,07$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	4,08 ( $\pm 0,74$ )
V				
0h	5,07 ( $\pm 0,02$ )	20,05 ( $\pm 0,07$ )	20,00 ( $\pm 0,00$ )	6,29 ( $\pm 0,30$ )
3h	6,33 ( $\pm 0,04$ )	21,55 ( $\pm 0,07$ )	20,00 ( $\pm 0,00$ )	7,42 ( $\pm 0,25$ )
48h	6,20 ( $\pm 0,02$ )	20,10 ( $\pm 0,14$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	5,1 ( $\pm 0,10$ )
96h	6,31 ( $\pm 0,06$ )	20,65 ( $\pm 0,21$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	4,91 ( $\pm 0,55$ )
120h	6,08 ( $\pm 0,01$ )	20,85 ( $\pm 0,07$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	5,53 ( $\pm 0,35$ )
168h	6,16 ( $\pm 0,00$ )	21,20 ( $\pm 0,00$ )	30,00 ( $\pm 0,00$ )	6,05 ( $\pm 0,25$ )

A concentração de oxigênio dissolvido na água diminuiu em todos os tratamentos. No tratamento RNC, houve um decréscimo acentuado, com valores médios mínimos de 1,98  $\text{mg L}^{-1}$ , ao final. O valor médio máximo para a concentração de oxigênio dissolvido foi de 7,15  $\text{mg L}^{-1}$  registrado no tratamento controle (C), no início da execução do experimento (3 h).

Ambas as variáveis, turbidez e concentração de sólidos suspensos totais tiveram valores elevados após a introdução do lixiviado (Tabela 5), um resultado similar ao registrado

por Novelli et al. (2012a), em um estudo realizado na mesma área e com delineamento experimental semelhante em relação à montagem dos mesocosmos. Os baixos valores para essas variáveis no final do experimento, também foram observadas para os tratamentos RNC e RC. Diferentemente do que foi encontrado pelos autores no estudo mencionado anteriormente, a concentração de oxigênio não aumentou à medida que os valores de turbidez diminuíram, principalmente no tratamento RNC, onde a concentração de oxigênio dissolvido decresceu continuamente durante o desenvolvimento do experimento e a concentração de sólidos particulados tenderam a declinar. A concentração de oxigênio (derivado da fotossíntese) não aumentou como esperado. A diminuição do nível de oxigênio foi, provavelmente, uma consequência da alta turbidez, o que afetou a produção primária, impedindo a penetração da luz, conforme reportado por outros autores em experimentos similares (Quinn et al., 1992; Van Nieuwenhuysse & Laperriere, 1986).

**Tabela 5.** Valores médios ( $\pm$  DP) da concentração de sólidos (materiais) suspensos totais, orgânicos e inorgânicos, e de turbidez determinados nas câmaras do mesocosmo durante o período experimental (C: controle, RNC: lixiviado não contaminado, RC: lixiviado contaminado, V: aplicação direta do Vertimec).

Período (horas)	SST (mg L <sup>-1</sup> )	SSI (mg L <sup>-1</sup> )	SSO (mg L <sup>-1</sup> )	Turbidez (NTU)
<b>C</b>				
0h	6,99 ( $\pm$ 4,13)	1,69 ( $\pm$ 1,26)	5,31 ( $\pm$ 2,88)	-
3h	8,97 ( $\pm$ 1,13)	3,58 ( $\pm$ 0,93)	5,39 ( $\pm$ 0,49)	13,00 ( $\pm$ 1,0)
48h	7,77 ( $\pm$ 2,39)	2,9 ( $\pm$ 1,71)	5,58 ( $\pm$ 0,94)	6,67 ( $\pm$ 2,08)
96h	4,90 ( $\pm$ 0,81)	0,35 ( $\pm$ 0,82)	4,56 ( $\pm$ 0,13)	32,00 ( $\pm$ 3,46)
120h	7,48 ( $\pm$ 2,66)	2,31 ( $\pm$ 0,64)	5,17 ( $\pm$ 0,64)	13,33 ( $\pm$ 1,53)
168h	15,01 ( $\pm$ 15,16)	7,69 ( $\pm$ 5,35)	7,32 ( $\pm$ 2,85)	13,67 ( $\pm$ 6,35)
<b>RNC</b>				
0h	48,07 ( $\pm$ 6,32)	11,7 ( $\pm$ 2,89)	36,40 ( $\pm$ 3,58)	-
3h	189,5 ( $\pm$ 13,79)	147,17 ( $\pm$ 16,25)	42,33 ( $\pm$ 3,90)	263,33 ( $\pm$ 34,27)
48h	37,73 ( $\pm$ 18,4)	22,21 ( $\pm$ 4,47)	15,52 ( $\pm$ 13,99)	139,33 ( $\pm$ 23,46)
96h	27,43 ( $\pm$ 5,62)	16,37 ( $\pm$ 2,88)	11,07 ( $\pm$ 2,74)	161,33 ( $\pm$ 34,78)
120h	20,54 ( $\pm$ 1,08)	12,49 ( $\pm$ 0,44)	8,05 ( $\pm$ 0,80)	87,00 ( $\pm$ 19,16)
168h	14,33 ( $\pm$ 2,85)	7,76 ( $\pm$ 1,74)	6,57 ( $\pm$ 2,11)	52,67 ( $\pm$ 15,31)
<b>RC</b>				
0h	50,66 ( $\pm$ 11,47)	12,17 ( $\pm$ 5,41)	38,50 ( $\pm$ 6,09)	-
3h	98,47 ( $\pm$ 18,20)	66,9 ( $\pm$ 17,03)	31,57 ( $\pm$ 14,87)	223,00 ( $\pm$ 16,64)
48h	30,26 ( $\pm$ 17,54)	21,60 ( $\pm$ 15,20)	8,67 ( $\pm$ 2,77)	118,33 ( $\pm$ 5,51)
96h	17,39 ( $\pm$ 11,65)	9,90 ( $\pm$ 9,12)	7,50 ( $\pm$ 2,53)	145,67 ( $\pm$ 7,09)
120h	56,53 ( $\pm$ 34,25)	35,59 ( $\pm$ 21,85)	20,94 ( $\pm$ 12,80)	92,00 ( $\pm$ 13,08)
168h	20,00 ( $\pm$ 7,96)	12,4 ( $\pm$ 6,63)	7,60 ( $\pm$ 1,95)	57,33 ( $\pm$ 4,62)
<b>V</b>				
0h	5,80 ( $\pm$ 0,65)	1,15 ( $\pm$ 0,7)	4,65 ( $\pm$ 0,49)	-
3h	8,75 ( $\pm$ 2,26)	2,98 ( $\pm$ 1,03)	5,77 ( $\pm$ 1,23)	16,00 ( $\pm$ 2,65)
48h	8,25 ( $\pm$ 1,72)	2,50 ( $\pm$ 0,82)	5,75 ( $\pm$ 0,90)	9,67 ( $\pm$ 1,53)
96h	5,37 ( $\pm$ 0,51)	1,23 ( $\pm$ 0,36)	4,14 ( $\pm$ 0,20)	45,67 ( $\pm$ 1,53)
120h	6,53 ( $\pm$ 0,94)	2,66 ( $\pm$ 1,32)	3,87 ( $\pm$ 0,39)	19,67 ( $\pm$ 1,15)
168h	11,63 ( $\pm$ 6,70)	4,02 ( $\pm$ 1,27)	7,61 ( $\pm$ 5,48)	16,67 ( $\pm$ 4,93)

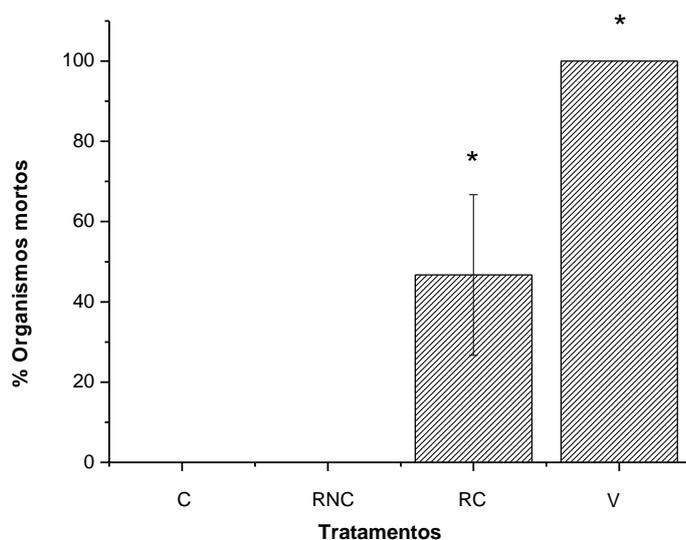
Os resultados obtidos para as concentrações de nutrientes nos mesocosmos (Tabela 6) mostraram que a concentração de fósforo total aumentou cinco vezes no tratamento RNC e 4 vezes no tratamentos RC, após a introdução do lixiviado (3h). No entanto, não houve um aumento da concentração de nitrogênio orgânico total com a introdução lixiviado.

**Tabela 6.** Valores médios ( $\pm$  DP) para as concentrações de nutrientes (1 - Nitrito, 2 - Nitrato, 3 - amônio, 4 - nitrogênio orgânico total, 5 - fosfato inorgânico, 6 - fosfato orgânico dissolvido, 7 - fósforo total e 8 - silicato reativo) obtidas para a água das câmaras do mesocosmo durante o período experimental (C: controle, RNC: lixiviado não contaminado, RC: lixiviado contaminado, V: aplicação direta de Vertimec).

1 - NO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	2,92 ( $\pm 0,24$ )	2,06 ( $\pm 0,14$ )	2,91 ( $\pm 0,27$ )	2,48 ( $\pm 0,22$ )	2,81 ( $\pm 0,59$ )	2,96 ( $\pm 0,90$ )
RNC	2,82 ( $\pm 0,35$ )	8,57 ( $\pm 4,53$ )	8,31 ( $\pm 3,75$ )	7,18 ( $\pm 2,88$ )	6,25 ( $\pm 2,21$ )	6,26 ( $\pm 1,51$ )
RC	2,61 ( $\pm 0,16$ )	7,00 ( $\pm 4,02$ )	5,71 ( $\pm 3,27$ )	5,42 ( $\pm 2,86$ )	5,20 ( $\pm 1,85$ )	6,36 ( $\pm 1,33$ )
V	3,17 ( $\pm 0,35$ )	2,89 ( $\pm 1,45$ )	3,28 ( $\pm 1,55$ )	2,92 ( $\pm 0,44$ )	2,97 ( $\pm 0,41$ )	3,37 ( $\pm 1,34$ )
2 - NO <sub>3</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	52,45 ( $\pm 21,26$ )	203,44 ( $\pm 103,46$ )	43,06 ( $\pm 4,13$ )	33,68 ( $\pm 1,60$ )	61,38 ( $\pm 28,58$ )	62,41 ( $\pm 31,52$ )
RNC	108,25 ( $\pm 11,41$ )	170,44 ( $\pm 106,96$ )	78,92 ( $\pm 14,24$ )	48,95 ( $\pm 14,16$ )	43,66 ( $\pm 3,59$ )	39,0 ( $\pm 15,46$ )
RC	45,65 ( $\pm 60,88$ )	141,61 ( $\pm 93,98$ )	57,70 ( $\pm 13,40$ )	30,70 ( $\pm 13,32$ )	56,83 ( $\pm 6,19$ )	48,62 ( $\pm 6,71$ )
V	66,89 ( $\pm 46,64$ )	86,58 ( $\pm 27,91$ )	90,48 ( $\pm 29,46$ )	31,95 ( $\pm 14,01$ )	85,81 ( $\pm 9,10$ )	29,90 ( $\pm 4,79$ )
3 - NH <sub>4</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	167,17 ( $\pm 3,10$ )	63,93 ( $\pm 53,44$ )	33,93 ( $\pm 25,53$ )	19,68 ( $\pm 2,28$ )	52,40 ( $\pm 37,52$ )	51,79 ( $\pm 34,48$ )
RNC	158,90 ( $\pm 9,62$ )	93,94 ( $\pm 19,44$ )	49,49 ( $\pm 5,58$ )	86,21 ( $\pm 27,58$ )	181,56 ( $\pm 62,21$ )	205,55 ( $\pm 81,92$ )
RC	177,2 ( $\pm 6,63$ )	66,01 ( $\pm 59,23$ )	55,17 ( $\pm 11,37$ )	44,25 ( $\pm 31,61$ )	65,06 ( $\pm 75,54$ )	100,66 ( $\pm 88,41$ )
V	107,44 ( $\pm 7,04$ )	12,20 ( $\pm 60,07$ )	36,63 ( $\pm 27,41$ )	25,91 ( $\pm 24,30$ )	56,95 ( $\pm 41,01$ )	42,04 ( $\pm 31,20$ )
4 - Nitrogênio Orgânico Total ( $\text{mg L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	0,67 ( $\pm 0,38$ )	1,22 ( $\pm 0,11$ )	0,53 ( $\pm 0,21$ )	0,76 ( $\pm 0,41$ )	0,68 ( $\pm 0,18$ )	0,80 ( $\pm 0,30$ )
RNC	0,97 ( $\pm 0,16$ )	1,73 ( $\pm 0,15$ )	0,90 ( $\pm 0,08$ )	1,74 ( $\pm 0,28$ )	0,58 ( $\pm 0,22$ )	1,15 ( $\pm 0,21$ )
RC	0,80 ( $\pm 0,21$ )	1,04 ( $\pm 0,10$ )	1,06 ( $\pm 0,10$ )	0,95 ( $\pm 1,19$ )	0,72 ( $\pm 0,06$ )	0,61 ( $\pm 0,29$ )
V	0,80 ( $\pm 0,33$ )	1,59 ( $\pm 0,40$ )	0,81 ( $\pm 0,40$ )	0,83 ( $\pm 0,88$ )	0,37 ( $\pm 0,28$ )	0,87 ( $\pm 0,27$ )
5 - Fosfato Inorgânico ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	6,71 ( $\pm 1,01$ )	6,03 ( $\pm 1,42$ )	8,19 ( $\pm 2,67$ )	6,98 ( $\pm 0,66$ )	5,54 ( $\pm 1,30$ )	7,30 ( $\pm 3,46$ )
RNC	4,94 ( $\pm 1,18$ )	24,18 ( $\pm 9,81$ )	15,7 ( $\pm 5,46$ )	14,68 ( $\pm 3,04$ )	12,67 ( $\pm 3,73$ )	14,44 ( $\pm 3,58$ )
RC	3,57 ( $\pm 1,06$ )	19,28 ( $\pm 10,93$ )	11,96 ( $\pm 4,76$ )	11,2 ( $\pm 5,17$ )	13,35 ( $\pm 2,58$ )	16,49 ( $\pm 3,46$ )
V	4,83 ( $\pm 1,25$ )	7,85 ( $\pm 0,90$ )	7,95 ( $\pm 4,90$ )	7,98 ( $\pm 2,86$ )	8,34 ( $\pm 2,50$ )	7,25 ( $\pm 4,59$ )
6 - Fosfato Orgânico Dissolvido ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	15,95 ( $\pm 1,47$ )	15,07 ( $\pm 4,50$ )	22,15 ( $\pm 2,84$ )	16,89 ( $\pm 2,49$ )	15,70 ( $\pm 1,00$ )	18,47 ( $\pm 3,59$ )
RNC	15,55 ( $\pm 0,68$ )	50,14 ( $\pm 12,40$ )	41,66 ( $\pm 11,18$ )	36,87 ( $\pm 11,68$ )	32,82 ( $\pm 9,42$ )	29,85 ( $\pm 5,42$ )
RC	14,50 ( $\pm 0,88$ )	52,25 ( $\pm 24,19$ )	41,02 ( $\pm 9,60$ )	36,72 ( $\pm 10,46$ )	36,57 ( $\pm 7,87$ )	35,44 ( $\pm 2,74$ )
V	17,20 ( $\pm 0,92$ )	19,52 ( $\pm 13,70$ )	23,35 ( $\pm 5,72$ )	20,04 ( $\pm 0,65$ )	20,05 ( $\pm 5,95$ )	19,33 ( $\pm 4,38$ )
7 - Fósforo Total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	45,15 ( $\pm 4,48$ )	66,14 ( $\pm 10,87$ )	73,1 ( $\pm 34,82$ )	66,19 ( $\pm 12,70$ )	71,41 ( $\pm 7,19$ )	105,45 ( $\pm 57,88$ )
RNC	54,88 ( $\pm 6,30$ )	346,00 ( $\pm 112,00$ )	166,84 ( $\pm 54,20$ )	116,23 ( $\pm 28,86$ )	196,84 ( $\pm 39,04$ )	144,15 ( $\pm 56,65$ )
RC	50,98 ( $\pm 4,64$ )	237,83 ( $\pm 203,97$ )	138,5 ( $\pm 59,48$ )	123,90 ( $\pm 32,69$ )	169,46 ( $\pm 86,31$ )	109,54 ( $\pm 34,12$ )
V	62,90 ( $\pm 3,28$ )	73,67 ( $\pm 116,38$ )	59,62 ( $\pm 24,10$ )	63,08 ( $\pm 7,89$ )	114,79 ( $\pm 53,31$ )	78,95 ( $\pm 19,07$ )
8 - Silicato Reativo ( $\text{mg L}^{-1}$ )						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C	0,05 ( $\pm 0,04$ )	0,10 ( $\pm 0,07$ )	0,37 ( $\pm 0,0$ )	0,6 ( $\pm 0,01$ )	0,36 ( $\pm 0,0$ )	2,99 ( $\pm 0,37$ )
RNC	0,10 ( $\pm 0,06$ )	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,39 ( $\pm 0,01$ )	0,38 ( $\pm 0,0$ )	0,50 ( $\pm 0,03$ )	3,22 ( $\pm 0,12$ )
RC	0,06 ( $\pm 0,03$ )	0,31 ( $\pm 0,27$ )	0,39 ( $\pm 0,01$ )	0,34 ( $\pm 0,04$ )	0,50 ( $\pm 0,04$ )	2,87 ( $\pm 0,13$ )
V	0,13 ( $\pm 0,03$ )	0,15 ( $\pm 0,01$ )	0,37 ( $\pm 0,01$ )	0,31 ( $\pm 0,07$ )	0,40 ( $\pm 0,07$ )	2,61 ( $\pm 0,01$ )

### 3.5.2 Toxicidade crônica do Vertimec para *Chironomus sancticaroli*

O teste de toxicidade crônica com *C. sancticaroli* diretamente expostas à água do Reservatório Lobo contaminada com o pesticida nos mesocosmos (no teste de toxicidade *in situ*) indicou a existência de efeitos adversos a este organismo-teste. Houve diferenças estatisticamente significativas entre a sobrevivência das larvas nos tratamentos RC e V quando comparado com os organismos do controle (em  $p \leq 0.05$  a partir do Teste de Fisher) (Figura 4). Quanto ao teste de toxicidade crônica realizado em laboratório, a manipulação das amostras durante a sua amostragem nos mesocosmos, transporte e mesmo na montagem do teste crônico, provavelmente contribuiu para a degradação dos resíduos do Vertimec, resultando em amostras com baixos efeitos tóxicos, quando comparadas com o grau de toxicidade verificado nos testes *in situ*.



**Figure 4.** Valores médios de mortalidade e desvios-padrão obtidos em testes de toxicidade crônica realizados *in situ* (mesocosmos), utilizando o organismo-teste *Chironomus sancticaroli*. \* Indica um valor significativamente diferente do controle com  $p \leq 0,05$ , a partir do Teste de Fisher, (n = 90).

Talvez, os procedimentos seguidos de acordo com as recomendações de Fonseca (1997) para o pré-ajuste do teste podem também ter atenuado a toxicidade das soluções e das amostras de sedimento, considerando-se que a aeração da água foi realizada ao longo de 24h antes do início do teste. Segundo Lewis et al. (1994), a aeração pode reduzir a toxicidade das

soluções-teste, retirando delas substâncias tóxicas altamente voláteis, ou em contraste podendo aumentar a sua toxicidade por meio da alteração do pH.

As diferenças encontradas entre a toxicidade nos mesocosmos e nos testes de laboratório sugerem que os resultados obtidos nos testes realizados *in situ* são provavelmente mais realistas do que os de laboratório.

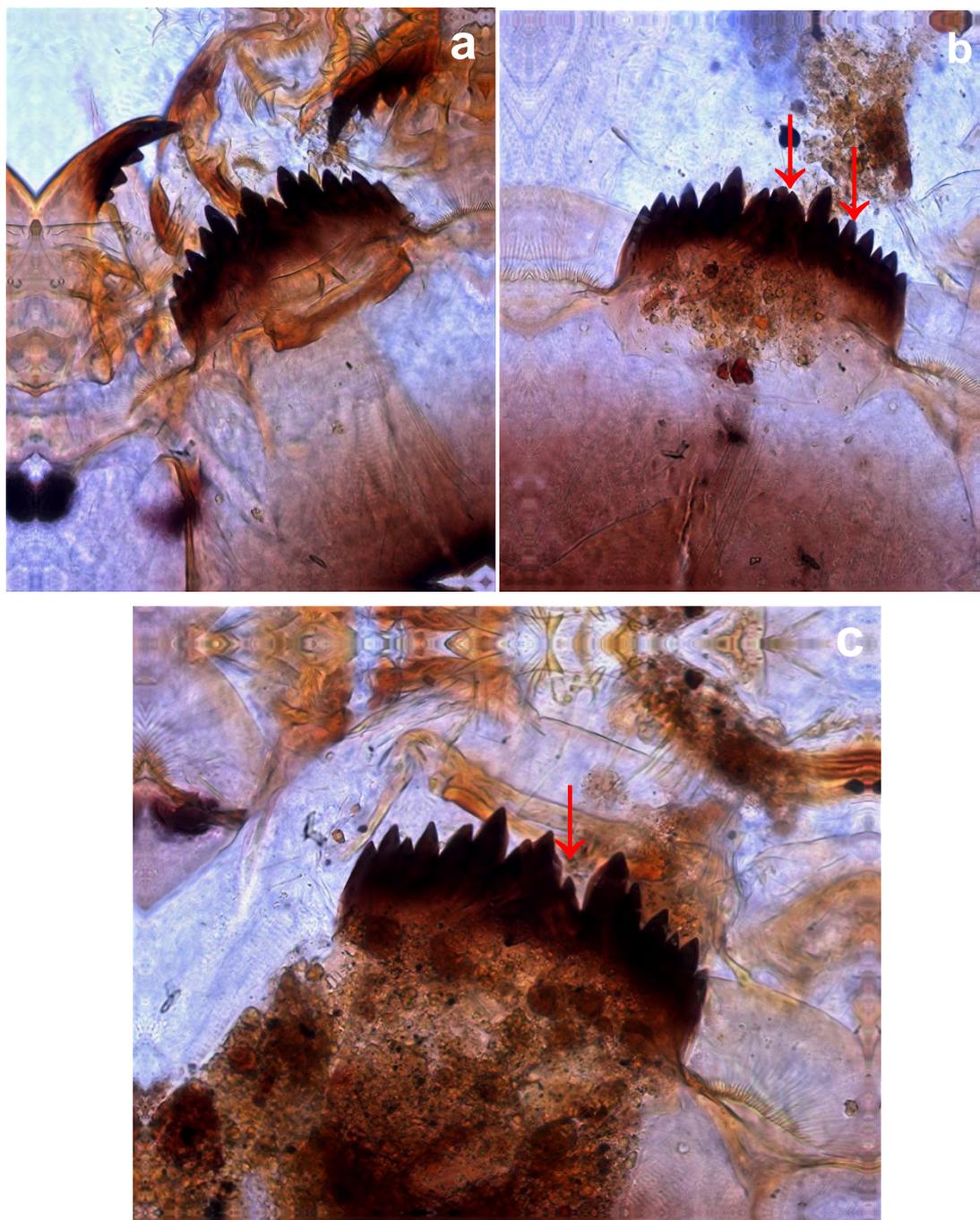
Alguns resultados obtidos no presente estudo permitem afirmar que alguns parâmetros escolhidos, considerando a sobrevivência dos indivíduos nos testes crônicos (in situ e de laboratório), podem ser considerados aplicáveis. Na avaliação do comprimento do corpo e da cápsula cefálica (além da largura) dos testes de toxicidade crônica realizados *in situ* com a espécie *Chironomus sancticaroli*, testes não paramétricos foram utilizados ( $p \leq 0,05$  e W entre 0,08961 e 0,97720). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para verificar se houve diferenças significativas em relação nestes parâmetros. Todos os parâmetros analisados revelaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). As comparações múltiplas (valores de z) mostraram que CR difere de C e de RNC, para todos os parâmetros. Somente para o comprimento do corpo, os resultados mostraram diferenças significativas entre C e RNC ( $p = 0,00001$ ;  $H = 77,88012$ ).

Neste estudo, considerando o decréscimo significativo do crescimento observado pelas dimensões da cápsula cefálica e do corpo em indivíduos expostos a tratamentos não contaminados e contaminados, podemos afirmar que a toxicidade do pesticida Vertimec prejudicou o desenvolvimento normal dos organismos sobreviventes, o que pode ter conseqüências em nível da população, diminuindo o desempenho da reprodução. Em um estudo realizado para avaliar o crescimento de *Chironomus riparius* expostos ao pesticida Imidacloprid (Bayer ®) Azevedo-Pereira et al. (2012), observaram uma diminuição no crescimento das larvas.

Similarmente aos efeitos causados pelo Vertimec no sistema nervoso de artrópodes, o Imidacloprid, mesmo em baixas concentrações interrompe os processos neurais dos organismos, causando paralisia ou tremores musculares incontroláveis, os quais podem limitar a procura de alimentos (forrageamento) e o subsequente crescimento dos insetos aquáticos (Alexander et al. 2007, Pestana et al., 2009), como observado no presente estudo, com prováveis conseqüências em nível de população (emergência dos adultos e / ou reprodução), como relatado no Capítulo 1.

Em relação à incidência de deformidades em quironomídeos, este parâmetro já foi usado como uma ferramenta investigações *in situ* e monitoramento ambiental da poluição em ambos, os ecossistemas lóticos e lênticos (Janssens De Bisthoven et al., 1998a, Gerhardt et al., 2006). Um grande número de estudos de campo, considerando corpos d'água poluídos e testes de indução experimental, têm demonstrado que a contaminação e o estresse causado por substâncias tóxicas, como metais pesados (Diggins & Stewart, 1998, Martinez et al., 2004) e pesticidas (Warwick, 1985, Madden et al., 1992), tem um impacto significativo sobre a frequência de deformidades em partes da cápsula cefálica de larvas de quironomídeos.

A Figura 5 ilustra algumas deformidades encontradas no mento de larvas de *C. sancticaroli* expostas ao lixiviado contaminado por Vertimec no experimento de campo em mesocosmos. Não houve evidência de deformidades nos organismos sobreviventes ao fim do ensaio crônico laboratorial, mesmo considerando o tratamento contaminado (RC). Por outro lado, os resultados obtidos nos testes *in situ* mostraram que a porcentagem de indivíduos com deformidade no tratamento contaminado foi maior do que nos controles (C e RNC). A frequência de deformidades no mento em larvas de quironomídeos expostas ao lixiviado contaminado pelo Vertimec (tratamento RC) foi de 4,2%, enquanto que nenhuma deformidade foi registrada nas larvas dos tratamentos não contaminados (controles). Deste modo, sugerimos que este parâmetro pode ser útil e adequado para fins de biomonitoramento ambiental. Resultados similares também foram relatados por Martinez et al. (2004) que detectaram deformidades entre 0,0 e 12,0% para *Chironomus tentans* exposto a sedimentos contaminados por uma combinação de zinco e de chumbo. A ocorrência de deformidades em larvas de *C. sancticaroli* no experimento *in situ*, e a inexistência de deformidades no ensaio de laboratório corroboram com os valores obtidos para a sobrevivência de *C. sancticaroli*, que foram maiores nos testes de laboratório do que nos experimentos de campo, ambos indicando maior toxicidade nos ensaios de toxicidade crônica realizados *in situ*.



**Figura 5.** Mento normal (a) e algumas das deformidades no mento das larvas de *Chironomus sancticaroli* (b e c) expostas ao lixiviado contaminado pelo pesticida no experimento de campo em mesocosmos. (b): dente trífido deformado e dente adicional, (c): um dente adicional surgiu ao lado do dente trífido que também aparece deformado.

No presente estudo, a incidência máxima de deformidades no mento dos indivíduos foi baixa (4,2%). No entanto, a frequência de deformidades em larvas de quironomídeos pode ser elevada, podendo chegar a 60%, conforme relatado por Vermeulen et al. (1998).

Considerando o efeito altamente tóxico do Vertimec às populações de *C. sancticaroli* e seu uso em baixas concentrações podemos concluir que os níveis de contaminação ou período de exposição adotados neste estudo não foram suficientes para causar altas frequências de deformidades. No entanto, foram suficientemente altas para causar índices significativos de mortalidade e alterações no crescimento das larvas, como revelado pela diminuição significativa no comprimento e largura do corpo de larvas expostas ao lixiviado contaminado por Vertimec. Talvez, baixas concentrações de Vertimec poderiam provocar maior frequência de deformidades em investigações em longo prazo como a reportada por Janssens de Bisthoven et al. (2001), em que a população de *Chironomus riparius* foi exposta ao cádmio ao longo de 10 gerações. Segundo os mesmos autores, na concentração de 9 µg Cd L<sup>-1</sup> a frequência de larvas com dentes medianos do mento duplos aumentou nas últimas quatro gerações, chegando até 40%.

### 3.5.3 Análise da comunidade de macroinvertebrados bentônicos

Os resultados indicaram uma diminuição de aproximadamente 40% na riqueza e densidade da comunidade de macroinvertebrados bentônicos quando comparadas a comunidade amostrada no sedimento do controle (C) com aquelas nos sedimentos dos tratamentos RNC e RC (Figura 6).

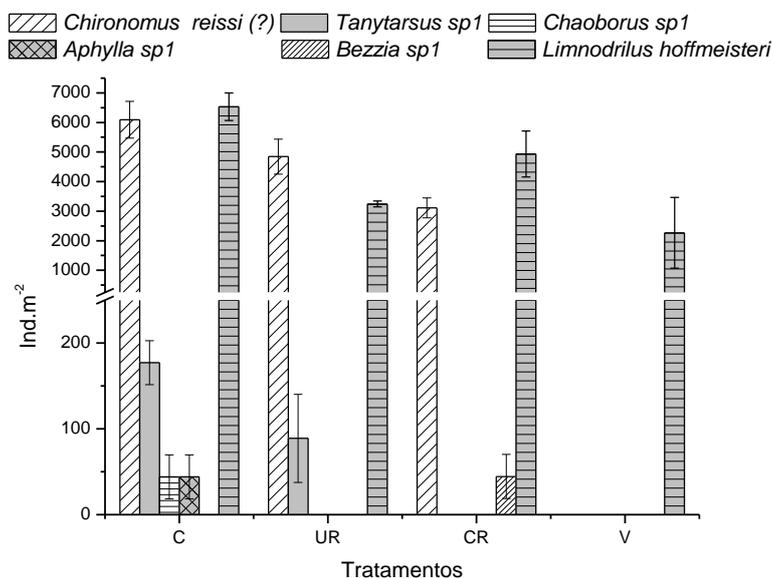
Em condições naturais, córregos, rios e também os ecossistemas aquáticos lênticos podem receber o lixiviado oriundo do escoamento superficial, especialmente de áreas desprotegidas (sem cobertura vegetal efetiva, por exemplo, campos agrícolas). Além da elevada descarga d'água (mais o elevado nível de turbulência) (Gomme et al., 1991), entrada de nutrientes (Coper, 1993), metais pesados (He et al., 2004), e também pesticidas (Schulz & Liess, 1999), é esperado o aumento das concentrações de sólidos suspensos totais na água.

Os efeitos adversos causados pela alta turbidez (Bilotta & Brazier, 2008) são umas das preocupações mais importantes em relação à questão da poluição dos sedimentos, especialmente considerando a dependência da pesca de água doce na produtividade bentônica (Waters, 1995). Embora efeitos tóxicos em nível de população não tenham sido observados nos experimentos com o lixiviado não contaminado para os testes realizados em laboratório (Capítulo 1), ou realizados *in situ* (este capítulo), em nível de comunidade a análise de macroinvertebrados bentônicos no sedimento das câmaras revelou significativas diferenças

em relação à riqueza de espécies e densidade das populações de *Tanytarsus* sp1, entre os tratamentos C e RNC.

Em relação à aplicação direta de inseticida nos mesocosmos (tratamento V), houve um decréscimo de aproximadamente 80% na riqueza de táxons e também na densidade de macroinvertebrados bentônicos em relação aos registrados no controle. Além disso, não houve ocorrência de táxons pertencentes à Classe Insecta neste tratamento. Este fato também corrobora o efeito inseticida da abamectina, o ingrediente ativo do pesticida testado, sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos.

A grande importância da entomofauna nos ecossistemas aquáticos não é atribuída apenas à predominância de espécies de Chironomidae em comunidades de invertebrados bentônicos em quase todos os ecossistemas de água doce, (Vos, 2001, Pery et al., 2002), mas também por eles serem uma importante fonte de alimento para peixes e aves (Rieradevall et ai. 1995). A Classe Insecta contribui com a maior riqueza de espécies neste grupo, que também inclui efemerópteros, plecópteros, tricópteros, odonatos, coleópteros, dípteros, entre outros. Assim, o uso indiscriminado de pesticida Vertimec pode representar um sério risco para esses grupos e também para outros componentes da fauna que dependem direta ou indiretamente desta fonte de alimento.

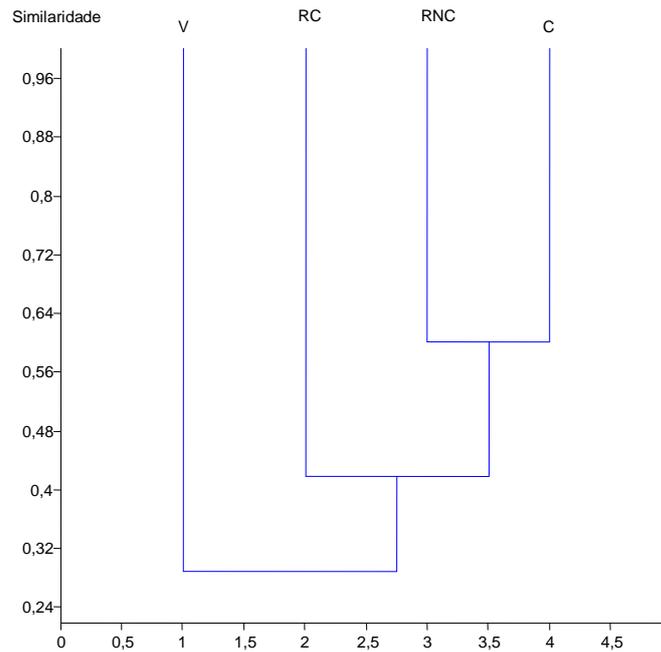


**Figura 6.** Composição dos macroinvertebrados bentônicos e densidade total de organismos (mais desvio padrão) a partir de amostras de sedimento coletadas nos diferentes tratamentos do experimento *in situ*.

Apesar da presença de populações da espécie *Limnodrilus hoffmeisteri* como um dos táxons mais abundantes em todos os tratamentos e como única espécie ocorrendo no tratamento contaminado com o Vertimec (V) e também pelo fato de que houve uma diminuição de 65% na densidade desta espécie quando comparado com o tratamento controle, a análise estatística não indicou diferenças significativas para densidade entre os tratamentos. Apenas três táxons ocorreram em mais do que um tratamento (*Tanytarsus* sp1, *Chironomus reissi* (?) e *L. hoffmeisteri*) e, portanto, foram utilizados para comparar as alterações da densidade de macroinvertebrados bentônicos entre os tratamentos.

Nós usamos testes paramétricos para analisar possíveis diferenças entre as densidades de *Tanytarsus* sp1 entre os tratamentos C e RNC ( $p \leq 0,05$  e  $W = 0,66246$ ), e testes não-paramétricos para *C. reissi* e *L. hoffmeisteri* na comparação entre os diferentes tratamentos do teste *in situ*. O resultado do Teste de Tukey HSD indicou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as densidades *Tanytarsus* sp1 entre os tratamentos C e RNC. Quanto aos resultados obtidos a partir de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, somente as densidades de *C. reissi* foram significativamente diferentes quando comparado os tratamentos C e V ( $p = 0,0320$  e  $Z = 2,717465$ ).

O resultado da análise de cluster, utilizando o índice de similaridade de Jaccard para a comparação da composição da comunidade em todos os tratamentos mostrou a formação de três grupos distintos (Figura 7). Um grupo formado pelos tratamentos C e RNC, outro formado pelo CR e um terceiro grupo formado pelo tratamento V, que foi contaminado diretamente com o pesticida Vertimec. Em ambos os sedimentos dos tratamentos, RC e V, as comunidades de macroinvertebrados bentônicos foram diferentes das registradas no sedimento do controle e do lixiviado sem contaminação. O mais dissimilar foi aquele tratado com Vertimec, evidenciando o efeito adverso desse inseticida sobre os organismos bentônicos.



**Figura 6.** Resultados da análise de Jaccard para a comunidade de macroinvertebrados bentônicos amostrados nos quatro tratamentos do teste *in situ*. Legenda dos tratamentos: controle (C); lixiviado não contaminado (RNC); lixiviado contaminado (RC) e adição direta de Vertimec (V).

#### 4. Conclusões

No nível de população, o inseticida Vertimec foi altamente tóxico, mesmo em baixas concentrações e por contaminação via lixiviado, causando deformidades e uma diminuição no crescimento dos quironomídeos. No nível de comunidade este pesticida exterminou o componente representado pelos insetos. Como o pesticida Vertimec tem sido amplamente utilizado na produção de batata e morangueiro no Brasil e por seu efeito altamente prejudicial sobre a diversidade e abundância de organismos bentônicos (principalmente sobre a fauna de insetos aquáticos), o uso deste produto representa um risco grave para a conservação da biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

## 5. Referências bibliográficas

Alexander, A. C., Culp, J. M., Liber, K. & A. Cessna, 2007. Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 1726–1732.

Apha, American Public Health Association (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 Ed. Washington D. C.

Azevedo-Pereira, H. M. V. S., M. F. L. Lemos & A. M. V. M. Soares, 2011. Behaviour and Growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under Imidacloprid Pulse and Constant Exposure Scenarios. *Water, Air, Soil and Pollution*, 219: 215-224.

Braun, A. S., A. Novelli, B. H. Vieira & E. L. G. Espindola, 2012. Ecotoxicological effects of Vertimec<sup>®</sup> on plankton. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7: 23-29.

Bilotta, G. S. & R. E. Brazier, 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research*, 42: 2849-2861.

Brinkhurst, R. O. & M. M. Marchese, 1991. Guia para la identificacion de oligoquetos acuaticos continentales de Sud y Centroamerica. Santo Tomé: Asociación de Ciencias Naturales del Litoral.

Burg, R. W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. A. Currie, R. Hartman, Y. KONG, R. L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J. B. Tunac, H. Wallick, E. O. Stapley, R. Oiwa & S. Omura, 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 15: 361-367.

Burton, G.A., T. J. Norberg-king, C. G. Ingersoll, D. A. Benoitt, G. T. Ankley, P. V. Winger, J. Kubitz, J. M. Lazorchac, M. E. Smith, E. Greer, F. J. Dwyer, D. J. Call, K. E. Day, 1996. Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 1335-1343.

Cooper, C.M., 1993. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems - a review. *Journal of Environmental Quality*, 22: 402-408.

Diggins, T. P. & M. T. Kenton, 1998. Chironomid deformities, benthic community composition, and trace elements in the Buffalo River (New York) area of concern. *Journal of the North American Benthological Society*, 17: 311-323.

Dornfeld, C.B., 2006. Utilização de *Chironomus sp* (Diptera, Chironomidae) para avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. 211 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

USEPA, 1994. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Lewis, P. A. J. K. Klemm, J. M. Lazorchak , T. J. Norberg-King, W. H. Peltier & M. A. Heber (eds) 3<sup>rd</sup> edition. EPA/600/4-91/002.

Faria, M. S., A. J. A. Nogueira & A. M. V. M. Soares, 2007. The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 218-226.

Fisher, M. H. & H. Mrozik, 1992. The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32: 537-53.

Fonseca, A. L., 1997. Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados. 211p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Fonseca, A. L. & O. Rocha, 2004. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). *Acta Limnologica Brasiliensia* 16: 153-161.

Gerhardt, A., C. Orendt, A. Dettinger-Klemm, L. Janssens de Bisthoven, S. Michiels, C. J. Otto & C. Vogt, 2006. Chironomiden: Potential und Einsatzmöglichkeiten im Biomonitoring von Gewässern – ein Überblick. *DGL-Mitteilungen I*: 49-57.

Gomme, J. W., S. Shurvell, S. M. Hennings & L. Clark, 1991. Hydrology of pesticides in a chalk catchment - surface waters. *International Journal of Environment and Waste Management*, 5: 546-553.

Grimm, N. B., 1988. Role of macroinvertebrates in nitrogen dynamics of a desert stream ecology, 69 Page 1884 of 1884-1893

Golterman, H. L. R. S. Clymo & M. A. M. Ohnstad, 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell scientific publications.

Hamilton, M., R. C. Russo & R. V. Thurston, 1977. Trimmed Spearman - Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology* 11: 714-719.

He, Z. L., M. K. Zhang, D. V. Calvert, P. J. Stoffella, X. E. Yang & S. Yu, 2004. Transport of Heavy Metals in Surface Runoff from Vegetable and Citrus Fields Soil. *Science Society of America Journal*, 68: 1662-1669.

Huryn, A. D. & J. B. Wallace, 1986. A method for obtaining in situ growth rates of larval Chironomidae (Diptera) and its application to studies of secondary production. *Limnology and Oceanography* 31: 216-222.

- Janssens De Bisthoven, L., J. Postma, A. Vermeeulen, G. Goemans & F. Ollevier, 2001. Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water, Air, and Soil Pollution*, 129: 167-169.
- Jones, R. I., E. Clare, A. K. Carter, S. Ward, D. J. Kelly & J. Grey, 2008. Widespread contribution of methane-cycle bacteria to the diets of lake profundal chironomid larvae. *Ecology*, 89: 857–864
- Kolar, L., N. K. Erzen, L. Hogerwerf, A. M. Cornelis & V. Gestel, 2008. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution* 151: 182-189.
- Koroleff, F., 1976. Determination of Nutrients. In: Grasshof, K. (ed). *Methods of seawater analysis*. Verlag chemie weinheim: New York.
- Lankas, G. R. & L. R. Gordon, 1989. Toxicology. In: Campbell, W.C. (ed.), *Ivermectin and Abamectin*. Springer Verlag, New York.
- Lugthart, G. J. & J. B. Wallace, 1992. Effects of disturbance on benthic functional structure and production in mountain streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 11: 138-164.

Mackereth, F. J. H., J. Heron & J. F. Talling, 1978. Water analysis: some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association Scientific Publications. Kendall: Titus Wilson and Sons Ltd.

Martinez, E. A., C. M. Barry, J. Schaumloffel & N. Dasgupta, 2004. Effects of exposure to a combination of zinc- and lead-spiked sediments on mouthpart development and growth in *Chironomus tentans*. Environmental Toxicology and Chemistry, 23: 662-667.

Novelli, A., 2010. Efeito do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e *in situ*. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

Novelli, A., B. V. Vieira, A. M. Vasconcelos, A. C. Peret & E. L. G. Espíndola, 2012a . Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec<sup>®</sup> 18EC on *Daphnia similis*. Ecotoxicology and Environmental Safety 87: 93-75.

Novelli, A., B. V. Vieira, D. Cordeiro, L. T. D. Cappelini, E. M. Vieira & E. L. G. Espíndola, 2012b. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. Chemosphere 86: 36-40.

Nunes, M. E. T. & E. L. G. Espíndola, 2012. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. Ecotoxicology doi 10.1007/s10646-012-0859-6.

Madden, C. P., P. J. Suter, B. C. Nicholson & A. D. Austin, 1992. Deformities in chironomid larvae as indicators of pollution (pesticide) stress. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 26: 551-557.

Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Agrofit, sistemas de agrotóxicos fitossanitários.

[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulado\\_tecnico=5314&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5314&p_tipo_janela=NEW). Accessed 14 February 2013.

Neumann, N. & D. Dudgeon, 2002. The impact of agricultural runoff on stream benthos in Hong Kong, China. *Water Research* 36: 3103-3109.

Omura, S., 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 91-98.

Pestana, J. L. T., S. Loureiro, D. J. Baird & A. M. V. M. Soares, 2009a. Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology* 93:138-149.

Péry, A. R. R., R. Mons, P. Flammarion, L. Lagadic & J. Garric, 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 2507-2513.

- Pestana, J. L. T., A. C. Alexander, D. J. Baird, A. Cessna & A. M. V. M. Soares, 2009. Structural and functional responses of benthic invertebrates to Imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution*, 157: 2328-2334.
- Pimentel, J. R., 1991. Pesticide use. *Science* 252-358.
- Pinho, L. C., 2008. Diptera. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline> Acessado em outubro de 2010.
- Printes, L. B., M. N. Fernandes & E. L. G. Espíndola, 2011. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 424-430.
- Quinn, J. M., R. J. Davies-Colley, C. W. Hickey, M. L. Vickers & P. A. Ryan, 1992. Effects of clay discharges on streams. *Hydrobiologia*, 248: 235-247.
- Rakotondravelo, M. L., T. D. Anderson, R. E. Charlton & K. Y. Zhu, 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 360-366.

Righi, G., 1984. Oligochaeta. Brasília: CNPq. (Série Manual de Identificação de Invertebrados Límnicos do Brasil).

Schulz, R. & M. Liess, 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology* 46: 155-176.

Servia, M. J., F. Cobo, M. A. Gonzalez, 1998. Deformities in larval *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) and their use as bioindicators of toxic sediment stress. *Hydrobiologia*, 385: 153-162.

Scorgie, H. R. A., 1980. Ecological effects of the aquatic herbicide Cyanatryn on a drainage channel. *Journal of Applied Ecology*, 17: 207-225.

Souza, L. O. I., J. M. Costa & B. B. Oldrini, 2007. Odonata. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C. G. (org.). Disponível em: [http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia\\_online](http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online). Acessado em janeiro de 2011.

Syngenta, 2013. Safety Data Sheet: Vertimec<sup>®</sup> 18 EC. Available at: [http://www.syngenta.com/country/in/en/Production\\_Innovation/Crop\\_Protection/Pages/Insecticides.aspx](http://www.syngenta.com/country/in/en/Production_Innovation/Crop_Protection/Pages/Insecticides.aspx) .

Solomon, K. R., J. P. Giesy, T. W. LaPoint, J. M. Giddings & R. P. Richards, 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32:1.

Suguio, K., 1973. Introducao à sedimentologia. Edgard Blucher, São Paulo.

Swansburg, E.O., W.L. Fairchild, B.J. Fryer & J.J.H. Ciborowski, 2002. Mouthpart deformities and community composition of Chironomidae (Diptera) larvae downstream of metal mines in New Brunswick, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2675-2684.

Teixeira, C., J. G. Tundisi & M. B. Kutner, 1965. Plankton studies in mangrove environmental. II. The standing stock and some ecological factors. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, 24: 23-41.

Trivinho-Strixino, S., 2011. *Larvas de Chironomidae: Guia de identificação*. São Carlos.

Tišler, T. & N. K. Eržen, 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology* 15: 495-502.

Van Nieuwenhuysse, E. E. & J. D. LaPerriere, 1986. Effects of placer gold mining on primary production in subarctic streams of Alaska. *Water Resources Bulletin*, 22: 91-99.

Vermeulen, A. C., P. C. Dall, C. Lindegaard, F. Ollevier B. R. Goddeeris, 1998. Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: A case study in three Danish low land streams. *Archiv für Hydrobiologie*, 144: 103-125.

Vos, J. H., 2001. Feeding of detritivores in freshwater sediments. Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

Warwick, W. F., 1985. Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: Indexing antennal deformities in *Chironomus* Meigen. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42: 1881-1914.

WELCH, P. S., 1948. Limnological methods. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Blakiston Co.

Whiles, M. R. & J. B. Wallace, 1982. First-year benthic recovery of a headwater stream following a 3-year insecticide-induced disturbance. Freshwater Biology, 28: 81-91.

Wiederholm, T., 1984. Incidence of deformed chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in Swedish lakes. Hydrobiologia, 109: 243-249.

Wislocki, P.G, L. S. Grosso & R. A. Dybas, 1989. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: Campbell, W.C. (Ed.), Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.

### **Testes de toxicidade aguda em laboratório para avaliar os efeitos do pesticida Vertimec® 18 CE sobre a biota aquática utilizando a espécie de água doce *Hydra viridissima* (Cnidaria, Hydrozoa) como um organismo-teste**

#### **Resumo**

Os cnidários de água doce pertencentes ao gênero *Hydra* têm sido cada vez mais utilizados como um modelo para muitos estudos biológicos, devido a alguns aspectos básicos relativos ao desenvolvimento, diferenciação, regeneração e capacidade de alteração de sua morfologia externa como uma resposta aos efeitos de algumas substâncias tóxicas. No presente estudo usamos estes invertebrados, como organismos-teste para investigar o efeito do Vertimec, um pesticida utilizado para controlar pragas de insetos que causam danos a muitas colheitas, incluindo frutas, legumes e plantas ornamentais, ou outras pragas como ácaros e nematódeos. A espécie *Hydra viridissima*, nativa do Brasil, foi utilizada como organismo-teste. Cultivos desta espécie foram mantidos em laboratório durante longos períodos e testados quanto à sensibilidade ao dicromato de potássio (Synth Brasil), utilizado como substância de referência, em testes de toxicidade aguda. Culturas saudáveis foram utilizadas para testar a toxicidade aguda de Vertimec® 18 CE nas concentrações nominais: 0,012; 0,024; 0,048; 0,096; 0,190; 0,380 mL L<sup>-1</sup>. Os testes duraram 96h depois do qual os organismos vivos remanescentes foram contados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96h, e avaliados em relação às alterações morfológicas no corpo e tentáculos. A CL50 - 96h para *H. Viridissima* no teste de sensibilidade ao dicromato de potássio foi de 5,03 mg L<sup>-1</sup>. Os valores médios de CL50 e CE50 - 96h para Vertimec foram 0,08 e 0,14 mL de L<sup>-1</sup>, respectivamente. Uma curva dose-resposta típica foi obtida considerando toda a gama de concentrações. Em relação aos valores de CE50 houve mudanças na toxicidade de acordo com o tempo de exposição. A toxicidade inicialmente aumentou até 72h e depois estabilizou até 96 h. A concentração tóxica do pesticida utilizado para *H. viridissima* é relativamente elevada quando comparada com os valores de CE50 e CL50 obtidos para outros organismos-teste e disponíveis na literatura, tais como larvas de insetos, peixes e cladóceros, provavelmente devido à simplicidade do seu sistema nervoso. No entanto, considerando a ampla utilização do Vertimec no Brasil e o fato de que podem ocorrer efeitos sinérgicos com outros poluentes (outros pesticidas, metais,

detergentes), o risco de toxicidade por contaminação do Vertimec nas águas de superfície não pode ser totalmente descartada, mesmo para um organismo relativamente resistente como *H. viridissima*.

Palavras-chave: avermectinas, abamectina, ecotoxicologia aquática, dicromato de potássio, *Hydra viridissima*, metais pesados, pesticidas.

## Abstract

Freshwater cnidarians of the genus *Hydra* have been increasingly used as a model for many biological studies due to some basic aspects concerning development, differentiation, regeneration and the capacity of changing their external morphology as a response to some toxicants. In the present study we use this invertebrate as test organism to investigate the effect of Vertimec<sup>®</sup> 18 EC, a pesticide used to control insect pests causing damage to many crops including fruits, vegetables and ornamental plants or other pests as mites and nematodes. The species *Hydra viridissima*, native in Brazil, was used as test-organism. *H. viridissima* cultures were maintained in the laboratory for long periods and tested for sensitivity to potassium dichromate (Synth, Brazil) as a reference toxicant, in acute toxicity tests. Healthy cultures were used to test the acute toxicity of Vertimec<sup>®</sup> 18EC at the nominal concentrations: 0.012; 0.024; 0.048; 0.096; 0.19; 0.38 mL L<sup>-1</sup>. The tests lasted 96h after which the remaining living organisms were counted at the time intervals of 24, 48, 72 and 96 hours, and inspected for changes in its body and tentacles morphology. The LC<sub>50</sub> (96h) for *H. viridissima* in the sensitivity test was 5.03 mg L<sup>-1</sup>. The mean values of EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>-96h for Vertimec were 0.08 mL L<sup>-1</sup> and 0.14 mL L<sup>-1</sup> respectively. A typical dose-response curve was obtained considering the full range of concentrations. Regarding the EC<sub>50</sub> values there were changes in the toxicity according to the exposure time. Toxicity initially increased up to 72h and then leveled off until 96 hours. The concentration in which this pesticide is toxic to *H. viridissima* is relatively high when compared to EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values for other test-organisms available in literature such as insect larvae, cladocerans and fish, probably due to the simplicity of its nervous system. Nevertheless considering the wide use of Vertimec<sup>®</sup> 18 EC in Brazil and the fact that synergistic effects with other pollutants (other pesticides, metals, detergents), may occur, the risk of toxicity by Vertimec contamination of surface waters cannot be totally discarded even to a relatively resistant organism as *H. viridissima*.

Keywords: abamectin, aquatic ecotoxicology, avermectins, heavy metals, *Hydra viridissima*, pesticides, potassium dichromate.

## 1. Introdução

O gênero *Hydra* (Cnidaria, Hydrozoa) é composto por organismos invertebrados cosmopolitas (Holstein & Emschermann, 1995), usualmente encontrados em vários tipos de ecossistemas de água doce não poluídos, tanto lóticos como lênticos. Estes invertebrados geralmente ocorrem associados a uma variedade de substratos, por exemplo, macrófitas aquáticas flutuantes e submersas, folhas, ramos e troncos de árvores submersas, e até pedras. Possuem um “design” morfológico simples, constituído por um corpo cilíndrico com uma região de brotamento, um disco pedal adesivo em uma extremidade e uma boca rodeada por seis a oito tentáculos na outra extremidade (Burnett, 1973).

Alguns aspectos básicos que foram revelados para muitas espécies, relativos ao desenvolvimento (Slobodkin & Bossert, 2001), à diferenciação (Burnett, 1966), à regeneração (Bode, 2003, Quin et al., 2009) e à simbiose (Karntanut & Pascoe, 2005, Kovacevic, 2012) fazem deste, um grupo de interesse geral (Hemmrich et al., 2007) como um modelo para diferentes tipos de estudos, incluindo os ecotoxicológicos.

Apenas quatro espécies de *Hydra* até agora são conhecidas ocorrerem no Brasil: *H. viridissima* Pallas, 1766, *Hydra iheringi* Cordero, 1939, *Hydra intermedia* Wolle, 1978 e *Hydra salmacidis* Silveira, Gomes e Silva, 1997. Estes organismos podem ser considerados como excelentes organismos-teste em bioensaios toxicológicos, devido a algumas de suas características que incluem: fácil cultivo e manutenção em laboratório; rápida reprodução assexuada por brotamento (Müller, 1996), o custo-benefício e as suas facilmente reconhecíveis mudanças físicas ao longo do tempo, em resposta a diferentes faixas de concentração de substâncias tóxicas (Kalafatic, 1997, Trottier et al., 1997, Arkhipchuk et al., 2006).

Estudos anteriores, usando hidras em testes de toxicidade indicaram sua sensibilidade a diversos poluentes ambientais, incluindo metais pesados (Holdway, 2001, Karntanut & Pascoe, 2007, Massaro, 2011), fármacos (Pascoe et al., 2003, Quinn et al., 2009 e Massaro, 2011), efluentes industriais e urbanos (Fu et al., 1991), nanomateriais (Blaise et al., 2008, Yeo & Kang, 2010, Tino et al., 2011) e também detergentes (Bode et al., 1978, Massaro, 2011).

A espécie de hidra verde *H. viridissima* é um típico representante de uma associação endossimbionte. Esta espécie contém algas endossimbióticas (*Chlorella vulgaris*) dentro dos vacúolos nas células gastrodermais onde estão protegidas de enzimas digestivas do hospedeiro

(Muscatine, 1974). Até 20 células de algas podem ser encontradas em uma célula (Gir & Emschermann, 1995). A alga fotossintética fornece nutrientes, tais como a glucose-6-fosfato (kelty & Cook, 1976) e maltose (Muscatine, 1965). Embora a avaliação dos efeitos tóxicos causados por pesticidas em *Hydra* tenham sido pouco investigados (EPA, 2007), a espécie *H. viridissima* já foi utilizada como um organismo-teste para avaliar os efeitos toxicológicos de pesticidas (Benson & Boush, 1983, Pollino & Holdway, 1999, Massaro, 2011).

O pesticida Vertimec é usado em todo o mundo em mais de 50 culturas (Syngenta, 2013), incluindo frutas, legumes e plantas ornamentais (MAPA, 2013). Apesar do seu uso como inseticida, este produto também é indicado para controlar outras pragas, tais como ácaros e nematódeos. O Vertimec tem a abamectina como ingrediente ativo, que é uma mistura contendo cerca de 80% de avermectina B1a (C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>) e 20% de avermectina B1b (C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>) (Wislocki et al., 1989).

A abamectina, a doramectina e a ivermectina (avermectinas) foram descobertas em 1975 por Merck & Co., Inc (Burg et al., 1979) e são produzidas a partir dos produtos da fermentação natural do actinomiceto de solo *Streptomyces avermitilis*. Apesar da sua baixa solubilidade em água, as avermectinas são produtos altamente lipofílicos e facilmente solúveis em muitos solventes orgânicos (Roth et al., 1993). A única diferença entre a abamectina e a ivermectina é um radical 22, 23-olefin que não está presente na formulação da ivermectina (há saturação nestas posições). Embora as toxicologias destes compostos sejam também consideradas semelhantes (Fisher & Mrozik, 1992), a ivermectina é conhecida por ser um pouco menos tóxica (Lankas & Gordon, 1989) e, por isso é amplamente utilizada na medicina veterinária contra endo e ectoparasitas de animais não-domésticos (por exemplo, bovinos, eqüinos, ovinos, suínos), e como um tratamento profilático para verminoses em animais domésticos (por exemplo, anti-helmíntico) (Omura, 2008). Apesar da grande eficácia da ivermectina como um anti-parasiticida animal, o seu uso em medicina humana, tem sido menos freqüente, com uma reconhecida exceção, sendo a droga predominantemente utilizada na prevenção da oncocercose, uma infecção grave em humanos, causada pela filária do nematóide *Onchocerca volvulus* (Fisher & Mrozik, 1992).

O Vertimec é normalmente enquadrado na classe III (“moderadamente tóxico”) (MAPA, 2013). Entretanto, a sua classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental corresponde à classe II, ou seja, uma substância muito perigosa, altamente

persistente e extremamente tóxica para microcrustáceos e peixes, afetando organismos não-alvo (Campbell et al., 1989).

O principal modo de ação das avermectinas é sobre o sistema nervoso dos organismos. Por exemplo, em artrópodes e nematódeos, a interação com os receptores GABAérgicos presentes na membrana pós-sináptica estimula o fluxo de íons cloreto para o interior das células nervosas causando a interrupção dos sinais neurais (Tišler & Eržen, 2006).

A alta eficácia do Vertimec como pesticida agrícola é confirmada pelo seu uso em baixas concentrações (Syngenta, 2013) e alto nível de toxicidade para invertebrados do solo (Nunes & Espíndola, 2012) e também para alguns organismos aquáticos já testados (Braun et al., 2012, Novelli et al., 2012a). Quanto à sua utilização intensiva, e provável entrada em ecossistemas aquáticos, o Vertimec pode representar um sério risco para a biota aquática e, possivelmente, também para a saúde humana.

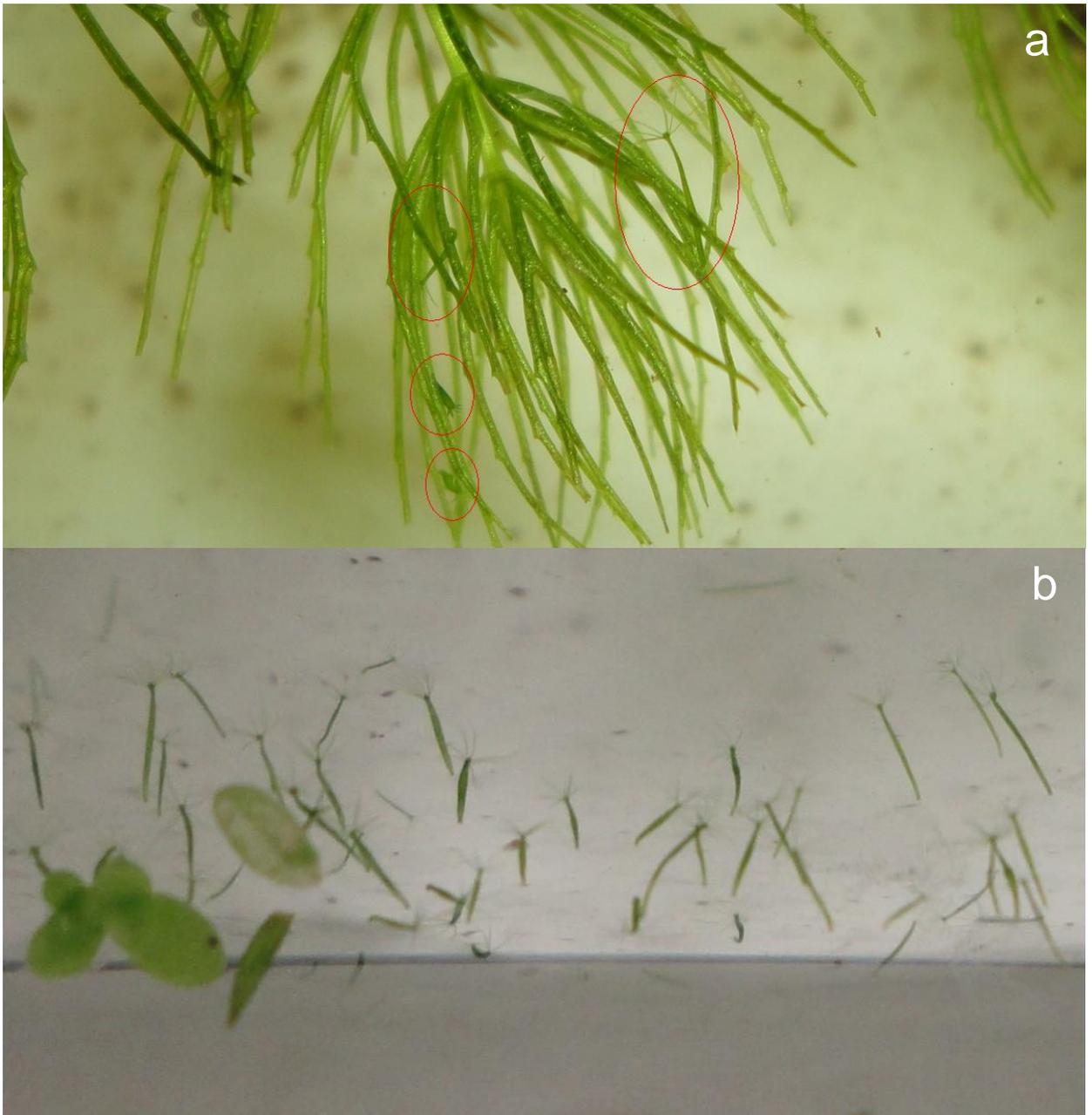
Neste estudo nós objetivamos testar a hipótese de que o Vertimec é altamente tóxico para os componentes da biota de água doce usando a espécie de invertebrado *H. viridissima* como um organismo-teste em ensaios experimentais de laboratório.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Organismo-teste*

Espécimes de *H. viridissima* foram coletados em tanques de concreto externos, localizados na Reserva Experimental do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (SP, Brasil). Os organismos estavam associados às folhas da espécie de macrófita aquática submersa *Cabomba aquatica* e também com as raízes de duas espécies flutuantes (*Salvinia* sp e *Lemna* sp). Os espécimes pertencentes às espécies de macrófitas mencionadas anteriormente foram amostrados, armazenados em baldes de plástico atóxico com a água do tanque e transportadas para o laboratório.

No laboratório, as macrófitas foram colocadas em bandejas de plástico atóxico contendo água reconstituída (ABNT, 2004). Uma pisseta (também contendo água reconstituída) foi usada para lavar as macrófitas, dissociando assim os organismos. As hidras foram, em seguida, individualmente coletadas com o auxílio de pipetas Pasteur (de polietileno, com a boca larga) e transferidas para béqueres de vidro (Figura 1).



**Figura 1.** Exemplos de *Hydra viridissima* associados às folhas da espécie de macrófita aquática submersa *C. aquatica* (a) e aderidos na parte inferior de uma bandeja de plástico atóxico (b) após a sua dissociação das macrófitas que foram lavadas com auxílio de uma pisseta (também contendo água reconstituída).

As populações de *H. viridissima* cresceram e foram mantidas em béqueres de vidro de 200 mL contendo água doce reconstituída (ABNT, 2004). O meio foi preparado dissolvendo-se 0,03 g L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 0,061 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,048 g L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e 0,002 g L<sup>-1</sup> de KCl em um litro de água destilada. O meio tinha uma dureza total equivalente a 40 - 48

mg de  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , uma faixa de pH entre 7,2 - 7,6 e condutividade elétrica de  $160 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Os cultivos foram mantidos sob condições controladas a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob uma intensidade luminosa de 800 lux, fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro, com densidades abaixo de 100 indivíduos por unidade de cultivo (200 mL).

Três vezes por semana, aproximadamente, quatro neonatos da espécie de cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* foram fornecidos como alimento para cada hidra (Massaro, 2011). A troca da água e a limpeza dos cultivos foram realizadas duas vezes por semana. As culturas de *C. silvestrii* foram mantidas e cultivadas de acordo com protocolos da ABNT (2005), em béqueres de vidro com 2L de água reconstituída. As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob uma fonte de luz de 800 lux, com um fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro. Antes de serem utilizados nos testes de toxicidade, os indivíduos permaneceram em aclimação durante um intervalo de tempo de no mínimo sete dias.

## 2.2 Testes de toxicidade aguda

Para avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste, eles foram testados quanto à sensibilidade à substância tóxica de referência dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) nas concentrações nominais de: 1,0; 2,5; 4,0; 5,5 e 7,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Os resultados foram calculados utilizando-se o método Trimmed Spearman-Kärber, expresso como CL50 - 96h (Hamilton et al., 1977). O dicromato de potássio foi escolhido como substância de referência, em função da sua utilização em ensaios toxicológicos anteriores realizados por Aguilar et al. (2002) e Massaro (2011) e também pelo seu amplo uso ao redor do mundo como substância de referência.

Os testes de toxicidade aguda definitivos com o pesticida Vertimec foram realizados nas seguintes concentrações nominais: 0,012; 0,024; 0,048; 0,096; 0,19 e 0,38  $\text{mL L}^{-1}$ . Estas concentrações foram estabelecidas por meio da realização de testes preliminares, a fim de determinar as mais baixas concentrações em que 100% dos organismos-teste morreram e a concentração mais elevada em que 100% dos organismos-teste sobreviveram e não mostraram qualquer efeito observável. Os testes tiveram 96h de observação para toxicidade aguda, durante o qual os organismos vivos remanescentes foram contados nos intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas.

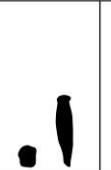
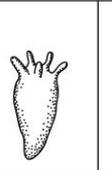
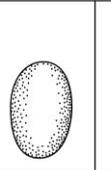
Em ambos os testes de toxicidade foram utilizados quatro indivíduos adultos (com aproximadamente 2,5 milímetros de comprimento, mantidos sem alimentação durante 24h, e

sem a presença de brotos) para cada uma das quatro repetições de cada tratamento. A água utilizada para preparar as diluições e o tratamento controle foi a mesma utilizada como meio nos cultivos, como anteriormente descrito.

Os testes de toxicidade foram realizados em placas de cultura celular (12 x 8 cm) com 12 poços. O volume de 4 mL das soluções-teste foi colocado em cada poço. Os testes foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura, como descrito anteriormente para o cultivo da hidra verde. Os organismos foram mantidos no escuro e sem alimentação durante as 96h de exposição ao pesticida. A dureza total, a condutividade elétrica, a temperatura e o pH da água foram medidos no início e no final de cada ensaio de toxicidade.

Observações foram realizadas após 24, 48, 72 e 96h, e cada organismo foi classificado de acordo com as alterações morfológicas no seu corpo e tentáculos (por exemplo, tentáculos com bulbo, corpo encurtado, fase de tulipa, desintegrado), utilizando um microscópio estereoscópico (60x). As modificações graduais na morfologia das hidras foram observadas e pontuadas em uma escala de 10 (tentáculos alongados e corpo normal) a 0 (desintegrado), conforme elaborada por Wilby (1988) e adaptada neste estudo para a espécie *H. viridissima* (Tabela 1 e Figura 2). Pontuações variando entre 10 e 6 foram consideradas sub-letais e reversíveis, enquanto na fase de tulipa (ou qualquer pontuação inferior a 5) as alterações foram consideradas irreversíveis e utilizadas como parâmetro para a letalidade (Blaise & Kusui, 1997). De acordo com o número total de indivíduos afetados nos níveis sub-letais e letais, foi possível calcular os valores de CL50 e CE50 a cada 24 horas de exposição, respectivamente, utilizando o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977).

**Morfologia de Hydra- Toxicidade para a fase de pólipio**

										
<b>Normal</b>	<b>Perda gradativa da toxicidade</b>						<b>Perda da osmoregulação</b>		<b>Estágio terminal</b>	
Tentáculos estendidos, corpo reativo	Parcialmente contraído, reações lentas	Tentáculos com bulbo Corpo sutilmente contraído	Tentáculos encurtados	Tentáculos e corpo encurtado	Sutilmente ou totalmente contraído, tentáculos visíveis	Sutilmente ou totalmente contraído, tentáculos não visíveis	Expandido, tentáculos visíveis	Expandido, tentáculos não visíveis	Expandido, tentáculos não visíveis	Desintegrada
<b>Score 10</b>	<b>Score 9</b>	<b>Score 8</b>	<b>Score 7</b>	<b>Score 6</b>	<b>Score 5</b>	<b>Score 4</b>	<b>Score 3</b>	<b>Score 2</b>	<b>Score 1</b>	<b>Score 0</b>

**Figura 2.** Resposta das hidras à toxicidade baseada nas alterações morfológicas de acordo com a descrição e pontuação (score) (0 - 10) elaborada por Wilby (1988) e adaptada neste estudo para o organismo-teste *Hydra viridissima*.

**Table 1.** Esquema classificatório das respostas das hidras à toxicidade baseado nas alterações morfológicas e respectivas pontuações (scores) (10-1), como idealizado por Wilby (1988) e adaptado no presente estudo para o organismo-teste *Hydra viridissima*.

Morfologia	Score	Morfologia (Wilby, 1988)	Morfologia (Wilby, 1988) adaptada para o organismo-teste <i>Hydra viridissima</i>
Normal	10	Tentáculos estendidos, corpo reativo	Tentáculos estendidos, corpo reativo
	9	Parcialmente contraído, reações lentas	Parcialmente contraído, reações lentas
Tentáculos com bulbo	8	Tentáculos com bulbo, corpo sutilmente contraído	Tentáculos com bulbo, corpo sutilmente contraído
	7	Tentáculos encurtados, corpo sutilmente contraído	Tentáculos encurtados, corpo sutilmente contraído
Tentáculos curtos	6	Tentáculos e corpo encurtado	Tentáculos e corpo encurtado
Tulipa	5	Totalmente contraído, tentáculos visíveis	Sutilmente ou totalmente contraído, tentáculos visíveis
	4	Totalmente contraído, tentáculos não visíveis	Sutilmente ou totalmente contraído, tentáculos não visíveis
Perda da regulação	3	Expandido, tentáculos visíveis	Expandido, tentáculos visíveis
	2	Expandido, tentáculos não visíveis	Expandido, tentáculos não visíveis
	1	Morto mas intacto	Morto mas intacto
Desintegração	0	Desintegrada	Desintegrada

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Toxicidade aguda do dicromato de potássio para *H. viridissima*

Durante o período experimental, as premissas para a utilização dos organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos foram satisfeitas, como evidenciado pela sensibilidade dos indivíduos da espécie *H. viridissima* cultivados em laboratório para a substância de referência dicromato de potássio. A CL50 - 96h obtida para *H. viridissima* no teste de sensibilidade realizado foi de 5,03 mg L<sup>-1</sup>, dentro da faixa de sensibilidade previamente estabelecida a partir de testes laboratoriais rotineiros (4,25 - 6,27 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 2). Nos ensaios de toxicidade aguda com dicromato de potássio, o pH medido das soluções-teste permaneceu dentro do

intervalo 7,04 - 7,55 e não variou mais de uma unidade para cada teste. A condutividade elétrica variou entre 133,3 e 153,8  $\mu\text{S cm}^{-1}$  e a concentração de oxigênio, variou entre 6,0 e 7,7  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores da dureza da água nas soluções-teste variaram entre 40 e 48  $\text{mg de CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ . Estes resultados confirmam a estabilidade e também a viabilidade dos testes de toxicidade realizados.

Em todos os testes de toxicidade realizados com a espécie *H. viridissima*, todos os indivíduos presentes no controle apresentavam condições morfológicas normais após as 96 horas de exposição ao metal testado (cromo). Ao final dos testes de toxicidade, os organismos expostos à concentração de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  estavam, na sua maioria, normais (score 9 e 10), e poucos apresentavam seus tentáculos com bulbos (score 8). Já na concentração de 2,5  $\text{mg L}^{-1}$ , foi observado que a maioria dos organismos apresentava os tentáculos com bulbos ou encurtados (scores 7 e 6 respectivamente), sendo que alguns já estavam na fase de tulipa (score 5) e poucos encontravam-se desintegrados (score 0). Na concentração de 4,0  $\text{mg L}^{-1}$ , foi observado que os organismos encontravam-se com o corpo e os tentáculos curtos (score 6) e na fase de tulipa (scores 4 e 5), e apenas alguns estavam desintegrados. Dos indivíduos expostos à concentração de 5,5  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , a maior parte se encontrava com o corpo e tentáculos encurtados (score 6) ou em estado de tulipa (com predominância de indivíduos classificados como scores 4 e poucos indivíduos de acordo com o score 5), poucos desintegrados, enquanto que na concentração mais elevada (7,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) grande parte dos organismos estavam desintegrados, sendo que poucos ainda permaneciam em estado de tulipa (no score 4).

Os valores de CE50 e CL50, assim como seus intervalos de confiança, foram calculados para cada teste com *H. viridissima*, a cada 24 horas, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3. No cálculo da CE50 foram considerados todos os organismos que apresentavam algum tipo de alteração morfológica reversível ou irreversível, ou seja, os efeitos sub-letais e letais. No cálculo da CL50 foram considerados apenas os organismos representativos dos scores 5, 4 e 0 (estado de tulipa e os desintegrados) já que não foi observada a presença de alterações morfológicas ocasionadas pela perda da regulação osmótica (scores 3 e 2) assim como a presença de organismos em estagio terminal porem não desintegrados (score 1).

**Tabela 2.** Valores da concentração efetiva mediana (CE50 mg L<sup>-1</sup>) para o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), a cada 24 horas, e os respectivos intervalos de confiança (IC - 95%) para cada teste de toxicidade aguda com *Hydra viridissima*. NC = não calculável; INC = intervalo não confiável; CV = coeficiente de variação.

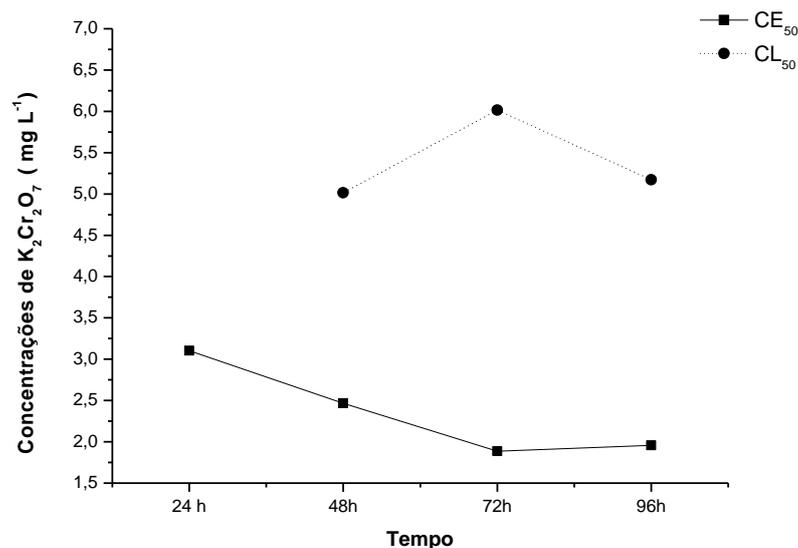
Teste	CE <sub>50</sub> -24h(IC-95%)	CE <sub>50</sub> -48h (IC-95%)	CE <sub>50</sub> -72h (IC-95%)	CE <sub>50</sub> -96h (IC-95%)
1	NC	3,14(2,62-3,76)	1,65 (1,44-1,89)	1,88(1,62-2,18)
2	6,36 (5,56-7,26)	2,90(2,59-3,25)	2,44(2,06-2,88)	1,96(1,67-2,31)
3	2,25 (1,72-2,94)	2,24(1,88-2,66)	2,05 (1,73-2,43)	2,55 (2,17-2,99)
4	2,44 (1,62-3,67)	2,31(1,88-2,84)	2,05(1,73-2,43)	1,68(1,22-2,32)
5	1,36( 1,04-1,77)	1,36( 1,04-1,77)	1,72(1,54-1,93)	2,17(1,69-2,78)
6	NC	1,65(1,33-2,03)	1,72(1,54-1,93)	1,88(1,62-2,18)
7	NC	3,67(3,26-4,12)	2,10(1,77-2,50)	1,58(INC)
Média	3,1	2,47	1,88	1,95
Desvio Padrão	2,22	0,82	0,3	0,32
CV (%)	71,62	33,32	16,26	16,52

Os valores médios da CE50-24h, CE50-48h, CE50-72h e CE50-96h foram, respectivamente, 3,10; 2,47; 1,88 e 1,95 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, enquanto que os valores médios da CL50, exceto para 24h quando não foi possível o cálculo, foram de 5,01; 6,01 e 5,17 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (CL50-48h, CL50-72h e CL50-96h, respectivamente).

**Tabela 3.** Valores da concentração letal mediana (CL50 mg L<sup>-1</sup>) para o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), a cada 24 horas, junto com os intervalos de confiança (IC - 95%) de cada teste de toxicidade aguda com *Hydra viridissima*. NC = não calculável; INC = intervalo não confiável; CV = coeficiente de variação.

Teste	CL <sub>50</sub> -24h(IC-95%)	CL <sub>50</sub> -48h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -72h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -96h (IC-95%)
1	NC	NC	5,29(4,86-5,75)	4,25(3,90-4,63)
2	NC	NC	7,0(INC)	5,27(4,76-5,84)
3	NC	NC	NC	6,27(5,99-6,57)
4	NC	6,72(5,88-7,69)	6,06(5,35-6,86)	4,50(3,82-5,31)
5	NC	NC	6,46(6,02-6,93)	4,62(4,27-5,01)
6	NC	1,65(1,33-2,03)	NC	6,27(5,99-6,57)
7	NC	6,67(5,70-7,80)	5,26(4,78-5,79)	5,03(4,69-5,41)
Média	NC	5,01	6,01	5,17
Desvio Padrão	NC	2,91	0,75	0,82
CV (%)	NC	58,1	12,51	15,87

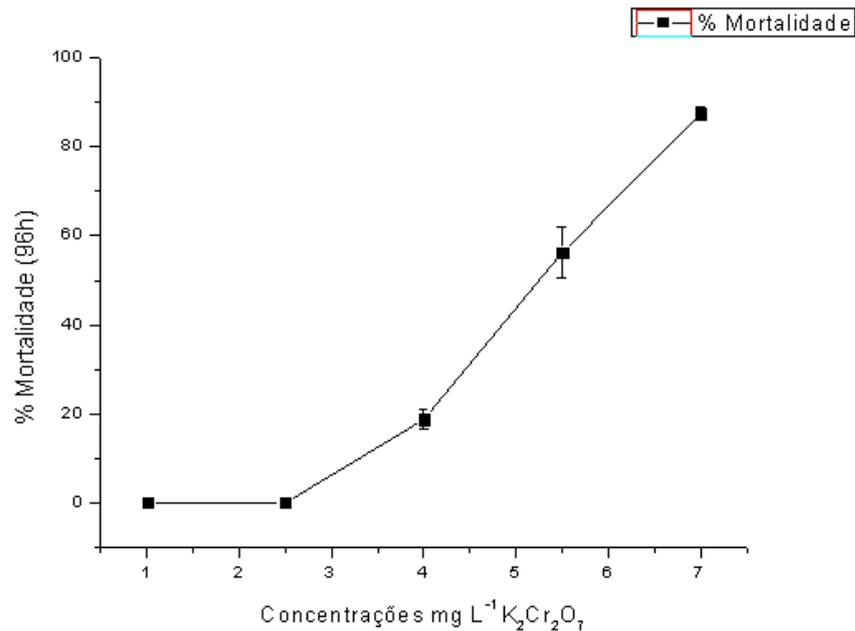
Observou-se que os valores de EC50 diminuíram ao longo das 72 horas, tendo um pequeno aumento em 96 horas, revelando um aumento da toxicidade do dicromato de potássio para *H. viridissima* em função do tempo de exposição dos organismos (Figura 3).



**Figura 3.** Mudanças nos valores da concentração efetiva e da concentração letal média (CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>, mg L<sup>-1</sup>) para o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), durante 96h, nos testes de toxicidade aguda realizados com *Hydra viridissima*.

Em relação aos valores da CL<sub>50</sub> foi possível observar uma variação ao longo das 96 horas, sendo que houve uma diminuição no valor da CL<sub>50</sub> 48 a 72h, indicando um aumento da toxicidade seguido de um pequeno aumento no valor da CE<sub>50</sub> no intervalo entre 72h - 96h com uma possível diminuição na toxicidade (Figura 3).

A Figura 4 mostra o aumento da mortalidade de *H. viridissima* como resposta ao aumento da concentração de dicromato de potássio. Altos valores de mortalidade (56,25 e 87,5%) foram observados a partir das concentrações 5,5 e 7,0 mg L<sup>-1</sup> de dicromato de potássio, respectivamente.



**Figura 4.** Curva Dose-resposta (porcentagens médias de mortalidade e desvios-padrão) para a espécie *Hydra viridissima* obtida dos testes de toxicidade aguda com dicromato de potássio com 96h de tempo de exposição.

No presente estudo, o dicromato de potássio foi escolhido como a substância de referência devido à sua utilização prévia em testes de toxicidade realizados por Zagatto (1988), Aguilar et al. (2002), Freitas (2009), Coelho e Rocha (2010) e Massaro (2011), e também por ser amplamente utilizado no mundo todo como substância de referência (Environment Canada, 1990). Em relação à resolução CONAMA 357 (Brasil, 2005), que estabelece um limite máximo de 0,05 mg L<sup>-1</sup> de cromo em corpos d'água pertencentes às classes 1 e 2, os resultados permitem afirmar que a concentração limite máxima aceitável para o cromo é adequada para a proteção da espécie *H. viridissima*.

Nós observamos um aumento da toxicidade para o dicromato de potássio nos espécimes de *H. viridissima*, considerando o tempo de exposição. A faixa de sensibilidade de *H. viridissima* para o dicromato de potássio, em relação à CE50 - 96h, variou entre 1,68 e 2,55 mg L<sup>-1</sup> (com um valor médio de 1,95 mg L<sup>-1</sup>), enquanto que a faixa de sensibilidade estabelecida para esta espécie, considerando o valores da CL50 - 96h, variaram entre 4,25 - 27,6 mg L<sup>-1</sup> com uma média CL50 - 96h de 5,17 mg L<sup>-1</sup>. Estes valores são similares aos resultados obtidos por Massaro (2011) (média CL50 - 96h = 3,55 mg L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) também utilizando *H. viridissima* como organismo-teste.

Nossos resultados também são semelhantes aos valores registrados para a espécie *H. attenuata* em investigações conduzidas por Aguilar et al. (2002), que encontrou uma faixa de sensibilidade desta espécie ao dicromato de potássio correspondente a 5,22 e 7,26 mg L<sup>-1</sup>, com um valor médio para CL50 - 96h de 6,25 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, e Jardim et al. (2005), que obteve uma CL50 - 96h média de 6,5 mg L<sup>-1</sup> também para o dicromato de potássio. Além disso, o organismo-teste utilizado no presente estudo (*H. Viridissima*) é mais sensível ao dicromato de potássio do que algumas espécies de Diptera, tais como *Chironomus tentans*, para qual o valor da CE50 - 48h de dicromato de potássio foi igual a 11,8 mg L<sup>-1</sup> (Khangarot & Ray, 1989) e da espécie *C. sancticaroli* também utilizada como organismo-teste nos testes de toxicidade realizados por Almeida (2002) para o qual o valor médio da CL50 - 96h foi de 7,12 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.2 Toxicidade Aguda do Vertimec para *Hydra viridissima*

As principais condições físicas e químicas das soluções-teste durante os testes de toxicidade realizados com o Vertimec foram monitoradas no início e no final de cada teste. O pH das soluções-teste manteve-se dentro do intervalo de 7,1 - 8,1 e também não variou mais do que 1,0 unidade em qualquer ensaio. A condutividade elétrica variou entre 114,6 e 290,0 µS cm<sup>-1</sup>, a concentração de oxigênio entre 6,3 e 6,8 mg L<sup>-1</sup> e a dureza da água entre 44 e 46 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>.

Nos testes de toxicidade realizados com o organismo-teste *H. viridissima*, todos os organismos do controle e também aqueles expostos às concentrações de 0,012 e 0,024 mL L<sup>-1</sup> de Vertimec foram classificados como normais (scores 9 e 10) após as 96 horas de exposição (embora alguns efeitos sub-letais, scores 7 e 8, tenham sido observados em poucos indivíduos no início destes ensaios, com 24 e 48h de exposição). Em relação aos organismos expostos à concentração de 0,048 e 0,096 mL L<sup>-1</sup> do pesticida, apesar de após 96 horas de exposição muitos destes ainda apresentassem características morfológicas dentro dos padrões considerados para normalidade, muitos já apresentavam seus tentáculos com bulbos ou curtos (scores 8 e 7, respectivamente), principalmente no início dos testes. Já nas concentrações de 0,192 e 0,38 mL L<sup>-1</sup> de Vertimec, após 96 horas de exposição, observou-se que praticamente todos os organismos já estavam na fase de tulipa (scores 4 e 5) ou desintegrados (score 0), com exceção de poucos indivíduos que ainda apresentavam efeitos sub-letais (corpo e tentáculos encurtados, score 6). Considerando os organismos expostos às três concentrações

intermediárias do pesticida testado, 0,024, 0,048 e 0096 mL L<sup>-1</sup>, processos regenerativos dos tentáculos dos mesmos (por exemplo, a transformação de tentáculos curtos, score 7, em tentáculos com bulbo, score 8) foram observados e indicam uma possível degradação do pesticida e reabilitação de alguns organismos no decorrer do teste de toxicidade. No presente estudo não foram observadas as alterações morfológicas relacionadas à perda de regulação osmótica (scores 2 e 3) e estágio terminal com o corpo intacto (score 1). Os efeitos letais começaram a ser registrados a partir da última concentração mencionada após 96 horas de exposição. Os valores de CE50 e CL50 para o pesticida Vertimec, assim como os respectivos intervalos de confiança, foram calculados para cada teste com a espécie *H. viridissima*, a cada 24h, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4.** Valores da concentração efetiva mediana (CE50 mL L<sup>-1</sup>) para o pesticida Vertimec, a cada 24h, com os respectivos intervalos de confiança (IC - 95%) de cada teste de toxicidade aguda com *Hydra viridissima*. NC = não calculável; INC = intervalo não confiável; CV = coeficiente de variação.

Teste	CE50-24h(IC-95%)	CE50-48h (IC-95%)	CE50-72h (IC-95%)	CE50-96h (IC-95%)
1	0,06 (0,05 - 0,08)	0,06 (0,05 - 0,07)	0,08 (0,07 - 0,10)	0,09 (0,07 - 0,11)
2	0,08 (0,07 - 0,11)	0,07 (0,05 - 0,09)	0,08 (0,06 - 0,10)	0,07 (0,06 - 0,09)
Média	0,07	0,06	0,08	0,08
Desvio Padrão	0,01	0,01	0	0,01
CV (%)	7	12	0	18

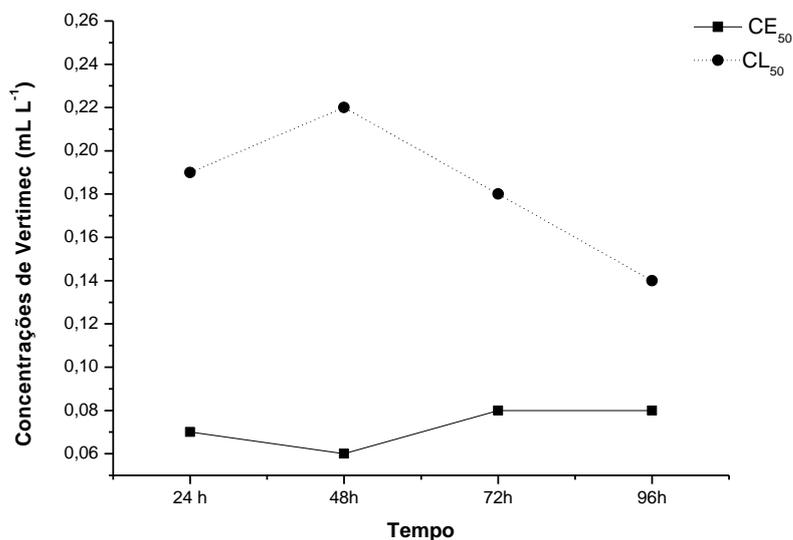
Para o cálculo dos valores de CE50, foram considerados todos os organismos que apresentaram algum tipo de modificação morfológica, ou seja, os efeitos subletais e letais, e no cálculo da CL50 foram considerados apenas os organismos em estado de tulipa (score 4 e 5) e os desintegrados (score 0), ou seja, os que apresentavam efeitos letais.

**Tabela 5.** Valores da concentração letal mediana (CL50 mL L<sup>-1</sup>) para o pesticida Vertimec, a cada 24h, com os respectivos intervalos de confiança (IC - 95%) de cada teste de toxicidade aguda com *Hydra viridissima*. NC = não calculável; INC = intervalo não confiável; CV = coeficiente de variação.

Teste	CL <sub>50</sub> -24h(IC-95%)	CL <sub>50</sub> -48h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -72h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -96h (IC-95%)
1	0,25 (0,22 - 0,28)	0,22 (0,18 - 0,25)	0,18 (0,15 - 0,22)	0,14 (0,12 - 0,16)
2	0,14 (0,12 - 0,15)	0,22 (0,18 - 0,25)	0,19 (0,16 - 0,23)	0,14 (0,12 - 0,15)
Média	0,19	0,22	0,18	0,14
Desvio Padrão	0,08	0	0,01	0
CV (%)	40	0	5	0

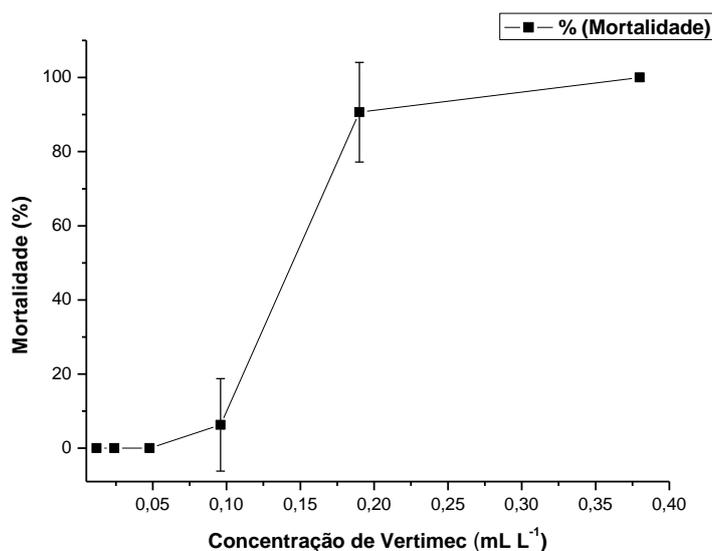
Os valores médios da CE50-24h, CE50-48h, CE50-72h e CE50-96h foram, respectivamente, de 0,07; 0,06; 0,08 e 0,08 mL L<sup>-1</sup> de mL L<sup>-1</sup> para o Vertimec, enquanto que os valores médios da CL50 foram de 0,19; 0,22; 0,18 e 0,14 mL L<sup>-1</sup> (CL50-24h, CL50-48h, CL50-72h e CL50-96h respectivamente). A partir dos valores de EC50 foi possível observar

uma variação ao longo das 96 horas, sendo que houve uma diminuição do valor quando completadas às 48h de exposição dos organismos ao pesticida, indicando um aumento na toxicidade. Depois de 72h a toxicidade ficou estável até ao final do experimento, em 96 horas (Figura 5).



**Figure 5.** Mudanças nos valores da concentração efetiva e letal média (CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>, mL L<sup>-1</sup>) para o pesticida Vertimec durante 96h, nos testes de toxicidade aguda realizados com *Hydra viridissima*.

Em relação aos valores da LC<sub>50</sub>, os resultados evidenciaram um decréscimo dos valores para 72 e 96 h de exposição, indicando um aumento da toxicidade do Vertimec para *H. viridissima* em função do tempo de exposição (Figura 5). Altos valores de mortalidade (91 e 100%) foram registrados para as concentrações de 0,19 e 0,38 mL L<sup>-1</sup> de Vertimec, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6.** Curva Dose-resposta (porcentagens médias de mortalidade e desvios-padrão) para os efeitos letais do pesticida Vertimec® 18EC ao longo de 96h de exposição em testes de toxicidade aguda com a espécie *Hydra viridissima* como organism-teste.

Os pesticidas têm um papel importante no aumento da produtividade agrícola atuando como controle químico de pragas, tais como muitas espécies de artrópodes. No entanto, seu uso indiscriminado pode causar vários problemas que são motivos de grande preocupação hoje em dia, principalmente em relação à saúde humana e conservação da biodiversidade. Neste trabalho, decidimos usar Vertimec como um tóxico, principalmente, pelo uso intensivo (Nunes & Espíndola, 2012), e provável entrada em ecossistemas aquáticos, o que poderia representar um grave risco para a biota aquática. Além disso, o pequeno número de investigações sobre a toxicidade e os efeitos causados por pesticidas para a *Hydra* (USEPA, 2007), reforçaram a nossa escolha.

À semelhança dos resultados obtidos para o dicromato de potássio, também observamos um aumento da toxicidade do Vertimec em espécimes de *H. viridissima* em relação ao tempo de exposição. A faixa de sensibilidade de *H. viridissima* para este pesticida, em relação à CE50 - 96h variou entre 0,07 e 0,09 mL L<sup>-1</sup> (com um valor médio de 0,08 mL de L<sup>-1</sup>), enquanto que a faixa de sensibilidade estabelecida para esta espécie, considerando os valores da CL50 - 96h, foi de 0,14 mL de L<sup>-1</sup> (com um valor médio de 0,14 mL de L<sup>-1</sup>) de Vertimec. Estes valores médios obtidos para a CL50 e CE50 representam uma concentração

nominal de abamectina de 1,44 e 2,52 mg L<sup>-1</sup>. Comparando-se estes resultados com os registros obtidos para *C. sancticaroli* e *Girardia tigrina* (ver capítulos 1 e 4): a CL50 - 96 h média foi de 0,54 10<sup>-5</sup> e 0,03 mL L<sup>-1</sup> para Vertimec respectivamente, o que corresponde a uma concentração nominal de abamectina de 97 ng L<sup>-1</sup> e 494 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Observa-se que *H. viridissima* foi menos sensível e menos adequada para a avaliação dos efeitos tóxicos do Vertimec e, assim, para garantir um nível adequado de proteção à biota aquática. Embora as mudanças progressivas que observamos usando a escala Wilby tenham vantagens sobre outros parâmetros convencionais (como letalidade), sendo mais sensíveis, os resultados do presente estudo indicaram que baixas concentrações de abamectina não podem representar riscos para *H. viridissima* de acordo com os parâmetros utilizados.

Investigações anteriores realizadas para avaliar os efeitos do Vertimec em organismos aquáticos utilizando organismos-teste como a espécie de peixe *Danio rerio* (Mendes, 2011), os cladóceros *Ceriodaphnia dubia* (Braun et al., 2012) e *Daphnia similis* (Braun et al. e Novelli et al., 2012) também obtiveram resultados que mostraram efeitos de elevada toxicidade para estas espécies, mesmo em baixas concentrações: a CL50 - 48h média de abamectina para *D. rerio* foi de 85,32 mg L<sup>-1</sup>; para *C. dubia* os autores não calcularam a concentração de inibição, porque as concentrações testadas para este pesticida foram letais, evitando a reprodução; a CE50 - 48h média para *D. similis* foi de 5,54 e 3,91 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Portanto, estes dados da literatura sugerem que *H. viridissima* é bastante resistente ao Vertimec considerando o seu ingrediente ativo, a abamectina.

Embora a atividade antiparasitária das avermectinas tenha sido descrita em 1979 (Burg et al., 1979), o seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. A principal dificuldade em identificar o seu modo de ação está relacionada com a ação deste pesticida em vários sítios de ligação, e também à variedade de organismos testados e, portanto, diferentes sensibilidades (Turner & Schaeffer, 1989). O sistema nervoso das hidras é uma rede de nervos, o que é estruturalmente simples quando comparado aos de sanguessugas (anelídeos) e insetos (artrópodes) que têm um cérebro mais complexo, incluindo cordões nervosos ventrais que consistem de gânglios (o arranjo dos neurônios é compartimentado) (Ruppert & Barnes, 1994) e são mais suscetíveis à ação abamectina. Por exemplo, em insetos e crustáceos, o mecanismo de ação das avermectinas consiste na indução de paralisia dos músculos tônicos e imobilização como uma consequência da ligação do sítio deste pesticida com os receptores GABAérgicos, ativando os canais de cloreto na membrana pós-sináptica.

Portanto, a menor sensibilidade da *H. viridissima* à abamectina é apenas um reflexo de um sistema nervoso relativamente mais simples nestes cnidários.

#### **4. Conclusões**

Considerando a importância de se conhecer a sensibilidade de cada componente da biota aquática, podemos concluir que o pesticida Vertimec não é altamente tóxico para *H.viridissima* (CE50 e CL50 - 96h correspondentes a 0,08 e 0,14 mL de L<sup>-1</sup> respectivamente) como é para outros organismos-teste, tais como larvas de insetos, cladóceros e peixes e que outros organismos-teste com o sistema nervoso mais desenvolvido devem ser usados em testes visando avaliar a toxicidade deste pesticida em específico.

No entanto, considerando a ampla utilização do Vertimec no Brasil e o fato de que outros pesticidas estão sendo usados simultaneamente e que existem efeitos sinérgicos com outros poluentes (outros pesticidas, metais, detergentes), o risco de toxicidade pela contaminação causada por Vertimec em de águas superficiais não pode ser totalmente descartado, mesmo para um organismo relativamente resistente como *H. viridissima*.

## 5. Referências bibliográficas

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2004a. NBR 12713.

Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp  
(Cladocera, Crustacea).

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2005b. NBR 13373.

Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp  
(Cladocera, Crustacea).

AGUILAR, J. F. et al. 2002. Estratégias para avaliação da toxicidade da água de abastecimento público do município de Piracicaba através de bioensaios. Anais 32 ASSEMAE, Rio de Janeiro, Hotel Glória, p. 38-42.

ALMEIDA, CA. 2002. Estudo ecotoxicológico do sedimento de represas do Rio Tietê com o organismo-teste bentônico *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera). Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 119p.

ARKHIPCHUK, VV., BLAISE, C. and MALINOVSKAYA, MV. 2006. Use of *Hydra* for chronic toxicity assessment of waters intended for human consumption. Environmental Pollution, vol. 142, n.2, p.200-11.

BLAISE, C., GAGNÉ, F., FÉRARD, JF. And EULLAFFROY, P. Ecotoxicity of Selected Nano-Materials to Aquatic Organisms. Environmental Toxicology. vol.23, n.5, p.591-598.

BRAUN, AS., NOVELLI, A., VIEIRA, BH and ESPINDOLA, ELG. 2012. Ecotoxicological effects of Vertimec<sup>®</sup> on plankton. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. vol. 7, n. 2, p.23-29.

BENSON, B. and BOUSH, G M. 1983. Effect of pesticides and PCBs on budding rates of green *Hydra*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. vol. 30, n.1, p.344-350.

BODE, H., ERNST, R. and ARDITTI, J. 1978. Biological effects of surfactants, III *Hydra* as a highly sensitive assay animal. Environmental Pollution. vol. 17, n. 3, p. 175-185.

BODE, HR. 2003. Head regeneration in *Hydra*. Developmental Dynamics. vol. 226, p.225-236.

BLAISE, C and KUSUI, T .1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. Environmental Toxicology Water Quality. vol. 12, n.1, p.53-60.

BRASIL. 2005. Resolução no. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de março de 2005.

BURG, RW., MILLER, BM; BAKER, EE., BIRNBAUM, J., CURRIE, SA., HARTMAN, R., KONG, Y., MONAGHAN, RL., OLSON, G., PUTTER, I., TUNAC, JB., WALLICK, H., STAPLEY, OE., OIWA and OMURA, S. 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. Antimicrobial agents and Chemotherapy. vol. 15, p.361-367.

BURNETT, AL. 1973. Biology of Hydra. Academic Press, New York & London.

BURNETT, AL. 1966. A model of growth and cell differentiation in Hydra. vol.100. n.912, p.165- 172.

CAMPBELL, WC. 1989. Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.

FISHER, M H. and MROZIK, H. 1992. The chemistry and pharmacology of avermectins. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. vol.32, p.537-53.

COELHO, KS. and ROCHA, O. 2010. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. Ecotoxicology. vol. 10, n. 4, p. 812-818.

ENVIRONMENT CANADA. Report EPS 1/RM/12. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Ottawa. 1990.

FREITAS, E. C. 2009. Utilização da espécie nativa *Pseudosida ramosa* (Crustacea, Cladocera) como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 253p.

FU, L J., STAPLES, RE and STAHL, RG., JR. (1991). Application of the *Hydra attenuata* assay for identifying developmental hazards among natural waters and wastewaters. Ecotoxicology Environmental Safety. vol. 22, n.3, p.309-19.

JARDIM, G. M. 2005. Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 127 p. Dissertação ( Mestrado).

HAMILTON, M.A.; RUSSO, RC. and THURFTON, RB. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*. vol. 11, n. 7, p. 714-719.

HEMMRICH, G., ANOKHIN, B., ZACHARIAS, H. and BOSCH, TCG. 2007. Molecular phylogenetics in *Hydra*, a classical model in evolutionary developmental biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol.44, n.1, p.281-290.

HOLDWAY, DA., LOK, K. and SEMAAN, M. 2001. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two *Hydra* species. *Environmental Toxicology*. vol.16, n.6, p.557-565.

HOLSTEIN, T. and EMSCHERMANN, P. 1995. Cnidaria: Hydrozoa, Kamptozoa. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

KALAFATIC, M. 1997. Regeneration and asexual reproduction of *Hydra oligactis* treated with different pesticides. *Biologia*. vol. 52, n.3, p.475–480.

KARNTANUT, W. and PASCOE, D., 2007. A comparison of metal accumulation by the cnidarian *Hydra vulgaris* directly from water or through contaminated prey and effects upon reproduction and regeneration. *Songklanakarin Journal Science Technology*. vol.29, n.3, p. 869-880.

KHANGAROT, BS. and RAY, PK. 1989. Sensitivity of midge larvae of *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera Chironomidae) to heavy metals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. v. 42, n.3, p. 325–330.

KELTY, MO. and COOK, CB. 1976. Survival during starvation of symbiotic, aposymbiotic, and nonsymbiotic *Hydra*. In: MACKIE, G. O. (ed.). Coelenterate ecology and behavior. Plenum Press, New York. p. 409–414.

KOVACEVIC, G. 2012. Value of the *Hydra* model system for studying symbiosis. The International Journal of Developmental Biology. vol.56, n.6-8, p.627-35.

LANKAS, GR. and GORDON, LR. 1989. Toxicology. In: Campbell, W.C. (Ed.), Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York, p. 89–112.

MASSARO, FC. 2011. Estudos ecológicos e ecotoxicológicos de espécies nativas de *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 502 p.

MENDES, LB. 2011. Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec<sup>®</sup> 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes) por meio de estudos experimentais. Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 109 p.

MÜLLER, WA. 1996. Pattern formation in the immortal *Hydra*. Trends Genetic. vol. 12, p. 91-96.

MUSCATINE, L. Symbiosis of *Hydra* and algae. III Extracellular products of the algae. Comparative Biochemistry and Physiology. vol. 16, n. 1, p. 77–84, 1965.

MUSCATINE, L. 1974. Endosymbiosis of cnidarians and algae, In: LENHOFF, HM. and MUSCATINE, L. (eds.), Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives. New York: Academic Press. p. 359-395.

NOVELLI, A., Vieira B. V., Vasconcelos A. M., Peret A. C. and Espíndola E. L. G., 2012. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 87, p. 93-75.

NUNES, MET and ESPÍNDOLA, ELG. 2012. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. Ecotoxicology. vol. 21, n.4, p.1063- 1071.

OMURA, S. 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. International Journal of Antimicrobial Agents. vol.31, n.2, p. 91–98.

POLLINO, CA and HOLDWAY, DA. 1999. Potential of Two *Hydra* Species as Standard Toxicity Test Animals. Ecotoxicology Environmental Safety. vol.43, n.3, p.309-316.

QUINN, B., GAGNÉ, F. and BLAISE, C. 2009. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. Science of the Total Environment. vol. 407, n.3, p. 1072-1079.

ROTH, M., RICHARDS, RH and SOMMERVILLE, C. 1993. Current pesticides in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture, a review. *Journal of Fish Diseases*. vol.16, n.1, p.1-26.

RUPPERT, E E. and BARNES, RD. *Zoologia dos invertebrados*. 6a ed. São Paulo, Editora Roca Ltda. 1996. 1029 p.

SLOBODKIN, LB and BOSSERT, PE. 2001. Cnidaria. *In*: JAMES, H. T. & ALAN, P. C. (eds.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Second Edition)*. San Diego: Academic Press.

SYNGENTA, 2013. Safety Data Sheet: Vertimec® 18 EC. Available at:

[http://www.syngenta.com/country/in/en/Production\\_Innovation/Crop\\_Protection/Pages/Insecticides.aspx](http://www.syngenta.com/country/in/en/Production_Innovation/Crop_Protection/Pages/Insecticides.aspx) .

TINO, A., AMBROSONE, A., MATTERA, L., MARCHESANO, V., SUSHA, A., ROGACH, A. and TORTIGLIONE, CA. 2011. New In Vivo Model System to Assess the Toxicity of Semiconductor Nanocrystals. *International Journal of Biomaterials*. p.1-8.

TIŠLER, T. and ERZEN, NK. 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*.vol. 15, n.6, p.495–502.

TROTTIER, S., BLAISE, C., KUSUI, T. and JOHNSON, E M. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay.

Environmental Toxicology Water Quality.vol. 12, n. 3, p. 265-271.

TURNER, MJ. and SCHAEFFER, JM. 1989. Mode of action of ivermectin. In: CAMPBELL, W.C. (Ed). Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag. New York, p. 73-88.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2007. Ecotox User Guide: Ecotoxicology Database System. Environmental Protection Agency. Version 4.0. Available: <http://www.epa.gov/ecotox/>.

VIEIRA, BH. 2010. Efeitos do agrotóxico Vertimec<sup>®</sup> no fitoplâncton: um estudo laboratorial e “in situ”. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 181 p.  
Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental.

WILBY, OK. 1988. The *Hydra* regeneration assay. Proceedings of the Workshop organized by Association Française de Teratologie p.108-124.

YEO, MK. and KANG, M. 2010. The effect of nano-scale Zn-doped TiO and pure TiO particles on *Hydra magnipapillata*. Molecular & Cellular Toxicology. vol. 6, n. 1, p. 9-17.

WISLOCKI, PG., GROSSO, LS. and DYBAS, RA., 1989. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: Campbell, W.C. (Ed.), Ivermectin and Abamectina. Springer Verlag, New York, p. 182–200.

ZAGATTO, PA. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. Ambiente. 1988. vol. 2, n. 2, p. 79- 83.

### **Toxicidade aguda do pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE à espécie de água doce *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria)**

#### **Resumo**

Os pesticidas são produtos químicos sintéticos amplamente utilizados na agricultura e que têm ação seletiva sobre os organismos-alvo com o objetivo de reduzir os seus efeitos indesejáveis para algumas culturas. Uma possível consequência das suas propriedades tóxicas é o risco para os organismos não-alvo que também podem ser afetados na área de aplicação do produto devido a disseminação não intencionais ou mesmo em áreas distantes devido ao uso excessivo ou pelo tipo de aplicação utilizado. No presente estudo a espécie de água doce *Girardia tigrina* foi escolhida como organismo-teste para avaliar a toxicidade aguda do pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE, amplamente utilizado em todo o mundo em terras agrícolas, a fim de proteger muitas culturas da herbivoria dos insetos. Estes organismos são conhecidos por serem sensíveis a muitos poluentes ambientais. Planárias recém nascidas (organismos com no máximo de sete dias de idade e 48h sem alimentação) foram expostas ao Vertimec nas seguintes concentrações: 0,015; 0,020, 0,025, 0,030, 0,035 e 0,040 mL L<sup>-1</sup>, durante 96h. Os valores estimados para a CL50 variaram ao longo das 24 a 96 h de duração dos testes, variando de 0,0275 - 0,040 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados demonstraram que o pesticida Vertimec causa mortalidade dependente da dose, e também mortalidade dependente do tempo de exposição, em comparação com o controle. Este pesticida é tóxico para a espécie *G. tigrina* mesmo quando utilizado em baixas concentrações (em microgramas) de abamectina presente no produto comercial, portanto, indicando que o produto representa um risco considerável para os invertebrados aquáticos, como os organismos não-alvo e, portanto, também para o normal funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: abamectina, ecotoxicologia aquática, *Girardia tigrina*, organismos não-alvo, pesticidas.

## Abstract

Pesticides are synthetic chemical products largely used in agricultures and that have selective action on target organisms aiming to reduce their undesirable effects for some crops. A possible consequence of their toxicity properties is a risk that non-target organisms can also be affected in the area of application of the product or due to non-intentional dissemination or even in distant areas due to excessive use or the type of application used. In the present study the freshwater species *Girardia tigrina* was selected as test-organism to evaluate the acute toxicity of the pesticide Vertimec<sup>®</sup> 18 EC, world widely used in agricultural lands in order to protect many crops from insect herbivory. These organisms are known to be sensible to many environmental pollutants. Neonate planarians (organisms with a maximum of seven days age and 48 h without feeding) were exposed to the Vertimec<sup>®</sup> 18EC following concentrations: Control; 0.015; 0.020; 0.025; 0.030; 0.035 e 0.040 mL L<sup>-1</sup>, during 96 hours. The estimated values of LC<sub>50</sub> varied along the 24 to 96 h test duration, varying from 0.0275 to 0.04 mL L<sup>-1</sup>, respectively. The results have shown that the pesticide Vertimec<sup>®</sup> 18 EC cause dose-dependent mortality and also time dependent mortality related to the exposure time, as compared to the control. This pesticide is toxic to the species *Girardia tigrina* even when low concentrations (in micrograms) of abamectin present in the commercial product, therefore indicating that it does represent a considerable risk to aquatic invertebrates as non-target organisms and therefore also to the normal functioning of aquatic ecosystems.

Key words: abamectin, aquatic ecotoxicology, *Girardia tigrina*, non-target organisms, pesticides.

## 1. Introduction

Os pesticidas constituem um grupo de compostos artificialmente sintetizados e usados com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola controlando pragas e patógenos. Contudo, a utilização desses compostos na agricultura pode ocasionar a contaminação das águas superficiais e subterrâneas via escoamento superficial, lixiviação ou via bacia de drenagem (Cerejeira et al., 2003, Tariq et al., 2007).

Quando esses compostos atingem o ambiente aquático podem causar uma grande variedade de efeitos adversos sobre as comunidades aquáticas e, especialmente, sobre espécies não-alvo (Feldhaus et al., 1998). Sua degradação é geralmente baixa o que pode torná-los agentes de toxicidade em longo prazo. Entre os muitos pesticidas utilizados no Brasil e também em outros países, o uso do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE, uma formulação comercial da abamectina, um produto largamente utilizado para controle de pragas nas culturas de frutas, legumes e plantas ornamentais (MAPA, 2013) pode ser apontado como um motivo de preocupação. Este pesticida tem a abamectina como ingrediente ativo, a qual consiste de uma mistura contendo cerca de 80% de avermectina B1a e 20% de avermectina B1b, representada pelas respectivas fórmulas:  $C_{47}H_{70}O_{14}$  e  $C_{48}H_{72}O_{14}$  (Wislocki et al., 1989).

As avermectinas (por exemplo, abamectina, doramectina, ivermectina) são produzidas a partir dos produtos de fermentação natural do actinomiceto de solo, *Streptomyces avermitilis*, que foi descoberto em 1975 pela Merck & Co., Inc (Burg et al., 1979). De acordo com MAPA (2013), a classificação toxicológica oficial do Vertimec é na classe III ("moderadamente tóxico"). No entanto, a sua classificação como potencial de perigo ambiental está na classe II, ou seja, uma substância muito perigosa, altamente persistente e extremamente tóxica para microcrustáceos e peixes, afetando os organismos não-alvo (Campbell, 1989). Além do seu perigo para o ambiente, estes compostos são facilmente solúveis em muitos solventes orgânicos e também considerados altamente lipofílicos. Devido ao seu caráter lipofílico sua distribuição no solo é limitada (Kolar et al., 2008).

Apesar da existência de trabalhos na literatura abordando os efeitos de pesticidas sobre insetos e organismos superiores, há uma escassez comparativa de informações semelhantes sobre as formas de vida mais simples, como os Platyhelminthes.

As planárias são habitantes de ecossistemas de água doce, sendo amplamente distribuídos desde o Atlântico até o Pacífico nos Estados Unidos, Canadá, Brasil, Japão e

Alemanha. Algumas espécies são cosmopolitas, sendo encontradas em riachos, lagos e áreas alagadas associadas às raízes e folhas das macrófitas ou debaixo de pedras nas margens dos rios (Bruzon, 2010). Os indivíduos têm simetria bilateral, corpo longo e achatado com a boca e a faringe dispostas na região mediana ventral do corpo. Sua reprodução pode ser sexuada ou assexuada por bipartição simples (Kenk, 1944, Kawatsu et al., 1995).

A abundância de planárias em muitos habitats de água doce e a facilidade e baixo custo para manutenção destes organismos em laboratório, juntamente com o fato de que eles têm respostas consistentes para diversos tratamentos experimentais, torna as espécies de Turbellaria um grupo com grande potencial para estudos ecotoxicológicos (Kouyoumjia and Uglow, 1974; Horvat et al., 2005).

Os bioensaios utilizando planárias como organismos-teste são considerados uma importante ferramenta para a determinação rápida de várias respostas toxicológicas, incluindo mortalidade aguda, carcinogênese, teratogênese, respostas neurocomportamentais, regeneração e percepção da luz (Triebkorn et al., 1991, Nano et al., 2002, Prá et al., 2005).

Considerando o atual uso intensivo do Vertimec na agricultura e a necessidade de se obter mais informações sobre a toxicidade do pesticida para os invertebrados aquáticos não-alvo, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda (mortalidade) de *G. tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria) exposta a uma série de concentrações deste composto durante um experimento de 4 dias (96h).

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Organismo-teste*

Os espécimes utilizados no estudo pertencem a uma população de *G. tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) plenamente estabelecida em laboratório. As planárias foram coletadas em tanques de concreto ao ar livre, localizados no campus da Universidade Federal de São Carlos (SP, Brasil). Os organismos estavam associados com macrófitas ou galhos em decomposição e folhas oriundas das árvores circundantes. Os espécimes de macrófitas foram amostrados, armazenados em baldes de plástico não tóxico com a água local e levados para o laboratório. No laboratório, o material foi separado em bandejas de plástico atóxico para a coleta dos espécimes com o auxílio de pipetas de Pasteur (de polietileno com a boca grande) que foram transferidos para béqueres. Os cultivos de

*Girardia tigrina* foram montados apenas com adultos ou indivíduos juvenis grandes e mantidos em béqueres de vidro (2 L), contendo água doce reconstituída (ABNT, 2004a). O meio foi preparado dissolvendo-se 0,03 g L<sup>-1</sup> CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0,061 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,048 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> e 0,002 g L<sup>-1</sup> KCl em 1 L de água destilada. O meio tinha uma dureza total equivalente a 40 - 48 mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, faixa de pH entre 7,2 e 7,6 e condutividade média de 160 µS cm<sup>-1</sup>. As culturas foram mantidas a uma temperatura constante de 25 ± 2 ° C, fonte de luz de 800 lux, com um fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro, e densidade populacional inferior a 40 indivíduos, em 2000 mL. Duas vezes por semana, cerca de duas larvas da espécie *Chironomus sancticaroli* (7-8 dias de idade - IV instar) foram fornecidas como alimento para cada planária. Após 12h as larvas que não foram consumidas pelas planárias foram removidas, os béqueres foram limpos e a água reconstituída foi trocada.

Aproximadamente dois a quatro dias após a limpeza, os casulos foram separados e removidos dos béqueres (geralmente fixados na parede ou no fundo dos béqueres) com o auxílio de pipetas de Pasteur (de polietileno com a boca grande). Os casulos foram transferidos para béqueres de vidro de 250 ml, cheios com água reconstituída e mantidos sem troca de água e limpeza, até a eclosão dos casulos. Após aproximadamente 10 dias, a maior parte das pequenas planárias já não estavam no interior dos casulos e, portanto, os casulos, além de quaisquer resíduos, foram removidos e o alimento para os recém nascidos foi fornecido. As pequenas planárias também foram alimentadas com as larvas de *C. sancticaroli*. Visando facilitar a ingestão das larvas de quironomídeos pelas planárias recém nascidas e evitar que alguns indivíduos ficassem sem se alimentar, como observado quando larvas grandes (IV instar) eram fornecidas, cinco larvas de cinco dias de idade (II instar) foram oferecidas para as pequenas planárias, sendo uma larva por indivíduo. Na falta de larvas deste tamanho, larvas maiores eram colocadas em pequenos potes plásticos atóxicos sem água e deixados no freezer por pelo menos 20 minutos, garantindo então a paralisia parcial ou morte das larvas para que as planárias pudessem se alimentar.

Os procedimentos para cultivo e manutenção de *C. sancticaroli* foram previamente descritos nos capítulos 1 e 2.

## 2.2. Testes de toxicidade aguda

Para avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste, eles foram testados quanto à sensibilidade à substância tóxica de referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) nas concentrações nominais: 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 and 4,5  $mg L^{-1}$ . As concentrações foram preparadas a partir de uma solução reserva de dicromato de potássio, que foi dissolvido em água destilada a uma concentração de 500,0  $mg L^{-1}$ . Os resultados foram calculados utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber, expresso como CL50 - 96h (Hamilton et al., 1977).

Os testes de toxicidade aguda definitivos com o pesticida Vertimec foram realizados nas seguintes concentrações nominais: 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035 e 0,040  $mL L^{-1}$  (a solução reserva deste pesticida foi preparada em água destilada a uma concentração de 1  $mL$  de  $L^{-1}$ ). As concentrações foram estabelecidas por meio da realização de testes de toxicidade preliminares. Os testes duraram 96h de observação para toxicidade aguda, após o qual os organismos vivos remanescentes foram contados nos intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas.

Em ambos os testes, organismos com no máximo de sete dias de idade (e 48h sem alimentação) foram utilizados em cada tratamento, com quatro repetições cada. A água utilizada para preparar as diluições e o tratamento controle foi a mesma utilizada como meio nos cultivos, tal como descrito anteriormente. Foram utilizados béqueres de vidro com capacidade de 80 mL, completados com 50 mL da solução-teste. Seis organismos foram adicionados em cada recipiente replicativo. Antes da montagem dos ensaios, as planárias foram transferidas para placas de Petri, a fim de serem inspecionadas sob o microscópio estereoscópico (60x) para verificar e remover, eventualmente, indivíduos que apresentassem algum tipo de lesão ou dano (possivelmente causado por predação ou ataque dentro dos casulos por outros indivíduos da mesma ninhada ou por deformidade natural). Os testes foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura, como descrito anteriormente para a cultura *G. tigrina*. Os organismos foram mantidos no escuro e sem alimentação durante o tempo de exposição de 96 h ao pesticida. A dureza total, a condutividade elétrica, a temperatura e o pH foram avaliados no início e no fim de cada ensaio, na solução de ensaio, em todos os tratamentos.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Dicromato de potássio

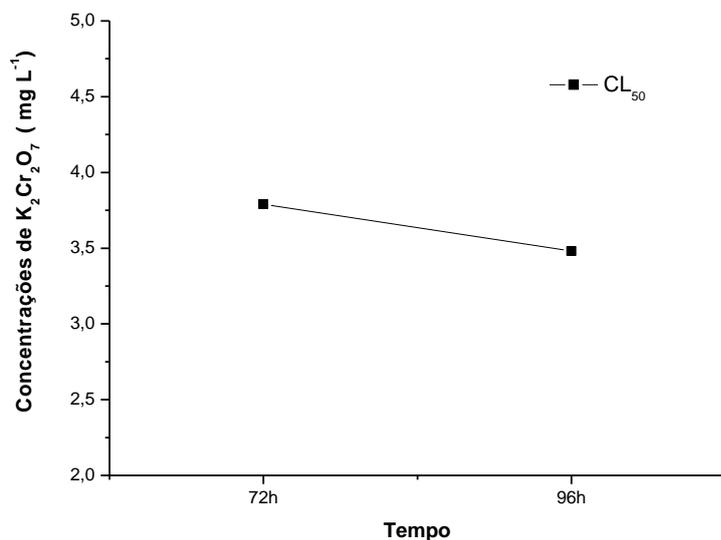
Durante o período experimental, as premissas para a utilização dos organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos foram satisfeitas, como evidenciado pela sensibilidade dos indivíduos de *G. tigrina* cultivados em laboratório à substância tóxica de referência, o dicromato de potássio. A CL50 - 96h para *G. tigrina* no teste de sensibilidade realizado foi de 3,48 mg L<sup>-1</sup>, enquadrando-se na faixa de sensibilidade previamente estabelecida a partir de testes laboratoriais rotineiros (2,90 - 4,00 mg L<sup>-1</sup>) para esta espécie (Tabela 1). Nos ensaios de toxicidade aguda com o dicromato de potássio, o pH mensurado das soluções-teste permaneceu dentro do intervalo 7,10 - 7,60 e não variou mais do que 1,0 unidade para cada teste. A condutividade elétrica variou entre 16,8 e 130,0 µS cm<sup>-1</sup> e a concentração de oxigênio variou entre 5,8 e 7,8 mg L<sup>-1</sup>. As medidas da dureza total das soluções-teste variaram entre 40 e 48 mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Estes resultados confirmam a consistência e também a viabilidade dos testes de toxicidade realizados. Os valores da CL50, e os intervalos de confiança foram calculados a cada teste realizado com a espécie *Girardia tigrina* para cada tempo de exposição de 24h, tal como apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores da concentração letal mediana (CL50 mg L<sup>-1</sup>) para o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), a cada 24 horas, e os intervalos de confiança (IC - 95%) de cada teste de toxicidade aguda com *Girardia tigrina*. NC = não calculável; INC = intervalo não confiável; CV = coeficiente de variação.

Teste	CL <sub>50</sub> -24h(IC-95%)	CL <sub>50</sub> -48h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -72h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -96h (IC-95%)
1	NC	NC	3,04 (2,82-3,29)	2,90 (2,64-3,18)
2	NC	NC	4,33 (3,75-4,99)	3,54 (3,11-4,02)
3	NC	NC	NC	NC
4	NC	NC	4,0 (INC)	4,0 (INC)
5	NC	NC	NC	NC
6	NC	NC	NC	NC
Média	NC	NC	3,79	3,48
Desvio Padrão	NC	NC	NC	0,55
CV (%)	NC	NC	NC	15,87

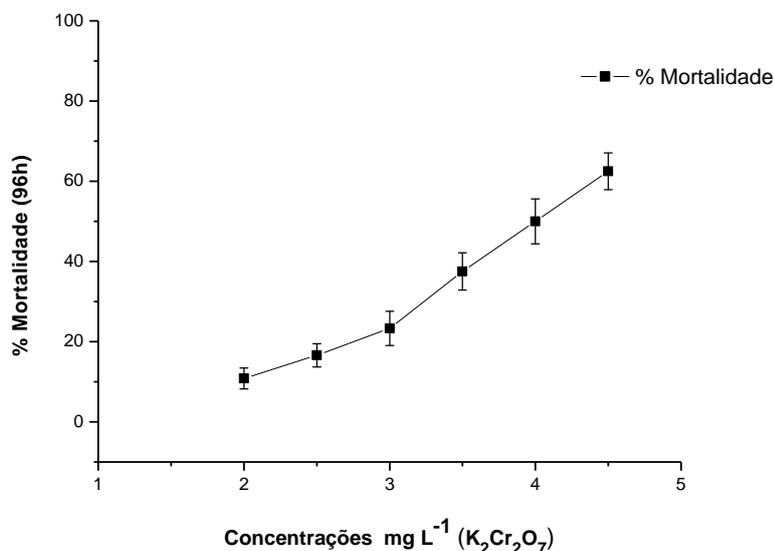
Os valores médios da CL50 - 72h e 96h foram respectivamente, 3,79 e 3,48 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (exceto para 24h e 48h, em que os valores obtidos para a mortalidade não foram suficientes para a realização dos cálculos).

Observou-se que os valores da CL50 diminuíram entre 72 e 96h, evidenciando, em geral, o aumento da toxicidade do dicromato de potássio à espécie *G. tigrina*, com o aumento do tempo de exposição (Figura 1).



**Figure 1.** Mudanças nos valores da concentração letal média (CL50, mg L<sup>-1</sup>) para dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), durante 96h, nos testes de toxicidade aguda realizados com *Girardia tigrina*.

A Figura 2 mostra o aumento da mortalidade de *Girardia tigrina* como resposta ao aumento da concentração de dicromato de potássio. Foram observados valores elevados de mortalidade (50,0 e 62,50%) para as concentrações de 4,0 e 4,5 mg L<sup>-1</sup> de dicromato de potássio.



**Figura 2.** Curva dose-resposta (média da porcentagem de mortalidade e o desvio padrão) da espécie *Girardia tigrina* obtida a partir de testes de toxicidade aguda com o dicromato de potássio após o tempo de exposição de 96h.

### 3.2 Toxicidade Aguda do Vertimec<sup>®</sup> 18 CE para *Girardia tigrina*

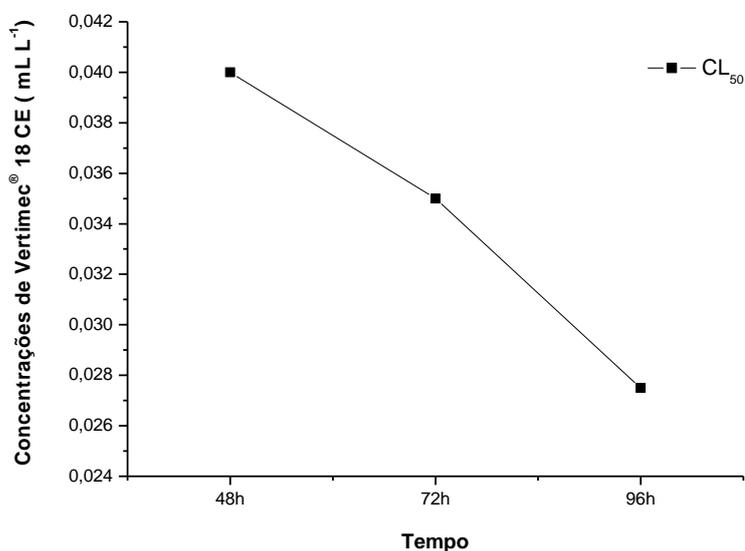
As principais condições físicas e químicas das soluções-teste nos testes de toxicidade realizados com Vertimec foram monitoradas no início e no final de cada teste. O pH nas soluções-teste permaneceu dentro do intervalo 7,33 - 8,00 e não variou mais do que 1,0 unidade em cada teste. A condutividade elétrica variou entre 120,5 e 280  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , a concentração de oxigênio dissolvido entre 6,0 e 7,0  $\text{mg L}^{-1}$  e a dureza da água entre 44 e 48  $\text{mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ .

Os valores da CL50 para o pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE, bem como os respectivos intervalos de confiança foram calculados para cada teste, com a espécie *G. tigrina*, a cada 24h, como apresentado na Tabela 2.

**Table 2.** Valores da concentração letal mediana (CL50 mL L<sup>-1</sup>) para o pesticida Vertimec, a cada 24h, junto com os intervalos de confiança (IC - 95%) de cada teste de toxicidade aguda com *Girardia tigrina*. NC = não calculável; INC = intervalo não confiável.

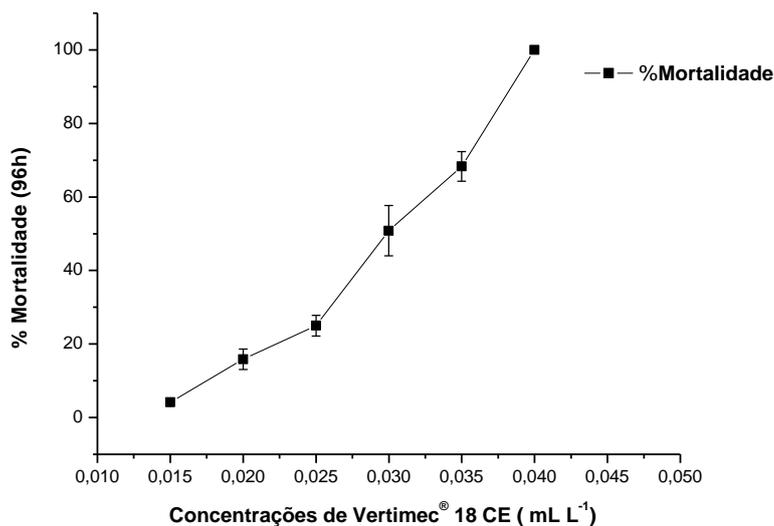
Teste	CL <sub>50</sub> -24h(IC-95%)	CL <sub>50</sub> -48h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -72h (IC-95%)	CL <sub>50</sub> -96h (IC-95%)
1	NC	0,04 (0,04-0,04)	0,03 (0,03-0,03)	0,02 (0,02-0,03)
2	NC	NC	0,04 (INC)	0,03 (0,03-0,04)
3	NC	NC	NC	0,03 (0,03-0,04)
4	NC	NC	NC	0,03 (0,03-0,03)
5	NC	NC	NC	NC
6	NC	NC	NC	NC
Média	NC	0,04	0,035	0,0275
Desvio Padrão	NC	NC	0,007	0,005
CV (%)	NC	NC	20,2	18,18

Os valores médios da CL50 - 48h, CL50 - 72h e CL50 - 96h foram respectivamente: 0,04; 0,035; e 0,0275 mL L<sup>-1</sup> de Vertimec (exceto para 24h em que a mortalidade não foi suficiente para realização do cálculo). Com os valores de CL50, foi possível observar que não houve mudanças na toxicidade ao longo das 96h de exposição. Inicialmente houve uma diminuição na CL50 indicando um aumento na toxicidade até ao final do experimento (Figura 3).



**Figura 3.** Mudanças nos valores da concentração letal média (CL50, mL L<sup>-1</sup>) para o pesticida Vertimec durante 96h, nos testes de toxicidade aguda realizados com *Girardia tigrina*.

A Figura 4 mostra que o pesticida Vertimec causa uma mortalidade dependente da dose (aumento de mortalidade com o aumento das concentrações de Vertimec). Altos valores de mortalidade (68,33 e 100%) foram registrados para as concentrações de 0,035 e 0,04 mL de L<sup>-1</sup> de Vertimec, respectivamente (Figura 4).



**Figure 4.** Curva dose-resposta (média da porcentagem de mortalidade e o desvio padrão) da espécie *Girardia tigrina* obtida a partir de testes de toxicidade aguda com o pesticida Vertimec após o tempo de exposição de 96h.

Os testes de toxicidade com substâncias de referência nos permitem avaliar a repetibilidade para obter mais precisão e confiança em relação a um método de análise ao longo do tempo em um determinado laboratório, e também para realizar comparações entre laboratórios. No presente estudo, optou-se por utilizar o dicromato de potássio como substância de referência devido à sua ampla utilização na avaliação da sensibilidade dos organismos (invertebrados) em testes de toxicidade (Aguilar et al., 2002, Freitas, 2009, Jaconetti, 2005, Jardim, 2005, Massaro, 2006, Zagatto, 1988), além do fato de que o metal cromo é recomendado como a substância de referência para procedimentos de testes de toxicidade padrão (Environment Canada, 1990).

De acordo com os resultados obtidos, observamos uma diminuição da toxicidade do dicromato de potássio em espécimes de *G. tigrina*, considerando o tempo de exposição. A faixa de sensibilidade da espécie *G. tigrina* para o dicromato de potássio, em relação ao valor

de CL50 - 96h, variou entre 2,90 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> (com um valor médio de 3,5 mg L<sup>-1</sup>). Como mostrado na Tabela 3, que apresenta os valores médios da CE e CL50 do dicromato de potássio para diferentes organismos-teste, podemos observar que a população de *G. tigrina* que foi utilizada como organismo-teste no presente estudo é significativamente mais sensível ao de dicromato de potássio, comparado com os resultados obtidos para a mesma espécie por Preza e Smith (2001), Ribeiro (2010) e Annibale (2009), que encontraram valores da CL50 - 96h de 12,0; 22,13 e 27,49 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, respectivamente.

Uma possível explicação para estas diferenças de sensibilidade poderia estar relacionada com o tipo de alimento utilizado para alimentar os planárias nos nossos cultivos porque diferentemente do procedimento convencional adotado em outros estudos que utilizam o fígado bovino para alimentar planárias, utilizamos larvas de *C. sancticaroli* como alimento (que consideramos um alimento natural e não contaminado, e também uma presa real, de acordo com as nossas observações sobre o material coletado em campo. O conhecido elevado teor de proteína (e também de ferro) presente no fígado bovino (e também à possível presença de substâncias tóxicas), provavelmente contribuiu para aumentar a resistência de organismos, tendo em vista a sua menor sensibilidade ao dicromato de potássio.

**Tabela 3.** Valores da CE50 ou CL50 para diferentes organismos expostos à substância de referência dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

Organismo-teste	Parâmetro	CE <sub>50</sub> /CL <sub>50</sub> (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> mg L <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Daphnia magna</i> (Cladocera)	Imobilidade - 48h	0,09	Arauco (2002)
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (Cladocera)	Imobilidade - 48h	0,046	Oliveira-Neto (2000)
<i>Pseudosida ramosa</i> (Cladocera)	Imobilidade- 48h	0,11	Freitas and Rocha (2010)
<i>Chironomus xanthus</i> (Diptera)	Mortalidade - 96h	7,12	Almeida (2002)
<i>Chironomus tentans</i> (Diptera)	Mortalidade - 96h	11,8	Khangerot and Ray (1989)
<i>Hyalella azteca</i> (Amphipoda)	Mortalidade - 48h	0,41	Araújo (2005)
<i>Hydra viridissima</i> (Hydrozoa)	Mortalidade - 96h	3,55	Massaro (2011)
		3,5	This study
<i>Girardia tigrina</i> (Platyhelminthes)	Mortalidade - 96h	22,13	Ribeiro (2010)
		27,49	Annibale (2009)
		12	Preza and Smith (2001)
<i>Physa heterostropha</i> (Gastropoda)	Mortalidade - 96h	16,8	Patrick et al. (1968)
<i>Danio rerio</i> (Pisces)	Mortalidade - 48h	107,8	Meletti (2003)

O valor de  $3,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  que obtivemos para a CL50 - 96h em *Hydra viridissima* é muito similar ao obtido por Massaro (2011), que obteve um valor de CL50 - 96h médio de  $3,55 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  também para a mesma linhagem deste cnidário. Outra constatação das comparações feitas na Tabela 2 é que a espécie *G. tigrina* tem uma maior sensibilidade ao de dicromato potássio do que as larvas das espécies de dípteros largamente utilizados como organismos-teste, como *Chironomus santicaroli*, ao qual a CL50 - 96h ao dicromato de potássio foi de  $7,12 \text{ mg L}^{-1}$  (Almeida, 2002) ou as larvas da espécie *Chironomus tentans*, com o valor médio da CL50 - 96h de  $11,80 \text{ mg L}^{-1}$  (Khangarot & Ray, 1989). Meletti (2003) avaliando a sensibilidade do peixe *Danio rerio* ao dicromato de potássio obteve um valor médio da CL50 - 96h de  $107,8 \text{ mg L}^{-1}$ , demonstrando que esta espécie do peixe também é muito mais resistente ao metal cromo do que a planária *G. tigrina*, aqui estudada. Segundo Moore e Ramamoorthy (1984), entre as espécies de água doce, os efeitos tóxicos de cromo indicam que os peixes são organismos altamente resistentes. No entanto, os valores médios da CL50 -96h do dicromato de potássio obtidos no presente estudo para a espécie *G. tigrina* foram maiores que aqueles relatados para o cladóceros *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Pseudosida ramosa* para os quais os valores da CE50 - 48h foram de 0,09 (Arauco, 2002), 0,046 (Oliveira-Neto, 2000) e  $0,11 \text{ mg L}^{-1}$  (Freitas & Rocha, 2010), respectivamente. Araújo (2010) avaliando a sensibilidade do anfípode *Hyaella azteca*, obteve o valor médio da CL50 - 48h de  $0,41 \text{ mg L}^{-1}$  de dicromato de potássio também evidenciando que esta espécie tem uma maior sensibilidade a este composto em comparação com o organismo-teste avaliado no presente estudo. Por outro lado, Patrick et al. (1968) quantificaram a mortalidade da espécie *Physa heterostropha* (Gastropoda) e encontraram uma CL50 - 96h de  $16,8 \text{ mg L}^{-1}$ , evidenciando uma maior tolerância deste molusco à toxicidade do dicromato de potássio do que a espécie *G. tigrina*.

Existe na literatura uma vasta informação em relação os estudos toxicológicos sobre os efeitos dos pesticidas organoclorados. Villar et al. (1994) observaram a letalidade e toxicidade comportamental de cinco desses compostos: Diazinon, Fenitrothion, Malathion, Methylparathion e p-Nitrofenol, em organismos intactos da espécie *G. tigrina*, e os efeitos sobre organismos sem cabeça durante testes de regeneração. Os pesticidas utilizados produziram sinais indicativos de interferência no sistema nervoso (respostas de sobressalto, protrusão da faringe, espasmos, movimentos laterais e tremores da cabeça, contrações anormais e depressão). Entre os pesticidas estudados foram obtidos os valores da CL50 - 96h,

para temperaturas variando entre 19 e 24 °C que variaram de 0,63 - 12,1 mg L<sup>-1</sup> de Diazon e p-Nitrofenol, respectivamente, com a maioria das mortes ocorrendo nos dois primeiros dias de exposição, para todos os inseticidas testados.

Estudos com a espécie *G. tigrina* com o objetivo de avaliar os efeitos do pesticida Vertimec ainda são raros na literatura. Na Tabela 4 estão apresentados os valores da CE50 ou da CL50 para vários organismos-teste expostos a uma gama de concentrações do ingrediente ativo, a abamectina, e, para as fórmulas comerciais utilizadas (Vertimec<sup>®</sup> 18 CE).

A abamectina é um agente antiparasitário usado há muito tempo na medicina veterinária e também é utilizado como um importante ingrediente na composição de inseticidas, acaricidas e nematicidas utilizados para o controle de pragas na agricultura. No entanto, quando usado em culturas vegetais ou em animais os seus produtos residuais podem atingir e afetar espécies não-alvo. De acordo com a Moore et al. (1993), alguns estudos tem demonstrado os efeitos da exposição a abamectina na reprodução, funções fisiológicas e sobrevivência de organismos não-alvo, para ambas as espécies, terrestres e aquáticas, que desempenham papéis importantes na cadeia alimentar trófica de uma variedade de habitats e os ecossistemas.

**Tabela 4.** Valores da CE50, CL50 e IC50 para as diferentes espécies aquáticas expostas a diferentes concentrações da fórmula comercial ou do ingrediente ativo puro da abamectina, a partir da literatura.

Organismo-teste	Parâmetro	EC <sub>50</sub> /LC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> (Abamectina µg L <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Chlorophyceae)	Inhibition of growth - 96h	15,5 103	Vieira (2010)
<i>Daphnia similis</i> (Cladocera)	Imobilidade - 48h	5,1 10- 3	Novelli et al. (2012)
<i>Daphnia magna</i> (Cladocera)	Imobilidade - 48h	0,25	Tišler and Erzen (2006)
<i>Chironomus xanthus</i> (Diptera)	Mortalidade - 96h	2,67	Novelli et al. (2012)
<i>Chironomus crassicaudatus</i> (Diptera)	Mortalidade- 96h	1,63	Ali and Nayar (1985)
<i>Chironomus sancticaroli</i> (Diptera)	Mortalidade - 96h	9,7 10- 2 *	This study (chapter 1)
<i>Hydra viridissima</i> (Hydrozoa)	Mortalidade- 96h	2,52 103 *	This study (chapter 3)
<i>Girardia tigrina</i> (Platyhelminthes)	Mortalidade - 96h	494 *	This chapter 4
<i>Danio rerio</i> (Pisces)	Mortalidade - 48h	85,32	Mendes (2011)
<i>Danio rerio</i> (Pisces)	Mortalidade - 96h	55,1	Tišler and Erzen (2006)

\*Valores da CL50 para diferentes organismos quando expostos a partir da concentração nominal abamectina do presente no produto comercial utilizado (Vertimec<sup>®</sup> 18 CE).

Os resultados do presente estudo indicam que as concentrações de abamectina testadas foram tóxicas à espécie *G. tigrina* mesmo quando em baixas concentrações presentes no

produto comercial (Vertimec), considerando-se que a concentração que causou letalidade a 50% dos indivíduos foi de 494,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

As planárias de água doce são adequadas para testes de toxicidade, sendo consideradas muito sensíveis a baixas concentrações de contaminantes ambientais (Nano et al., 2002).

No entanto, a concentração letal encontrada neste estudo para *G. tigrina* é maior do que a faixa relatada na literatura para outros organismos-teste. Alguns autores registraram valores muito mais baixos de CE50 para os dafinídeos *Daphnia similis* e *Daphnia magna*, (5,1  $10^{-3}$  e 0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  de abamectina) (Novelli et al. 2012 e Tišler & Erzen, 2006, respectivamente). De acordo com Tišler e Erzen (2006) uma possível razão para a elevada toxicidade da abamectina sobre dafinídeos se deve à absorção deste produto via alga durante o processo de alimentação por filtração. O efeito tóxico do abamectina (mortalidade) para as espécies *C. xanthus*, *C. tentans* e *C. sancticaroli* também ocorreu em baixas concentrações, com valores para CL50 - 96h de 2,67; 1,63 e 9,7  $10^{-2}$   $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente (Novelli et al., 2012, Ali & Nayar, 1985 e neste estudo, **capítulo 2**).

Mendes (2011) e Tišler e Erzen (2006) obtiveram valores da CL50 (48 e 96h), correspondentes a 33,1 e 55,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o peixe *Danio rerio*. Podemos observar a partir dos dados da Tabela 4, que apenas as espécies *P. subcapitata* e o cnidário *Hydra viridissima* tiveram maior tolerância à abamectina (valores de IC50 e CL50 -96h correspondentes a 15,5  $10^{-3}$  e 2,52  $10^{-3}$   $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente) quando comparado com a planária *G. tigrina*. Alguns fatores podem estar associados à baixa toxicidade da abamectina para as espécies com estrutura nervosa menos complexa como as algas que, devido ao modo da ação neurotóxica do pesticida, atua ligando sua molécula ao glutamato através dos canais de cloreto, aumentando a permeabilidade aos íons do cloreto, a hiperpolarização, paralisia e, finalmente, a morte (Campbell, 1989).

Portanto, uma toxicidade mais baixa da abamectina às espécies de algas é esperada, considerando que estes organismos não possuem sistema nervoso. Quanto às hidras, estes invertebrados têm um sistema nervoso menos complexo comparado com o das planárias, o que justifica a sua assim uma maior tolerância ao composto testado.

Para a ivermectina, um derivado sintético da abamectina (Lankas & Gordon, 1989), Alves e Melo (2013) observaram que quando os indivíduos da *G. tigrina* foram expostos às concentrações de 1,0; 5,0 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ , durante 30, 60 , e 120 minutos, e para 12 e 24h, os grupos de planárias começaram a apresentar contrações e excitações em todas as

concentrações testadas e isto também foi dependente do tempo da exposição. Após 24 horas de exposição e em períodos de verificação de 24 h, a frequência da mortalidade atingiu 20% dos indivíduos, persistindo até ao final do período de observação. De acordo com Egerton et al. (1979) e Eriksson Panula (1994), estes resultados sugerem que, durante o período de exposição, o pesticida também pode atuar nas extremidades neuromusculares com o envolvimento de canais de cloreto e GABA, induzindo a despolarização da membrana, porque *G. tigrina* contém numerosas fibras de GABA no o seu sistema nervoso central e periférico.

#### **4. Conclusões**

Com base nos dados de toxicidade aguda obtidos no presente estudo, a planária de água doce *G. tigrina* parece ser relativamente sensível à toxicidade do pesticida Vertimec (CL50 - 96h correspondente a 494,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Comparado com os organismos-teste comumente utilizados em estudos ecotoxicológicos, esta espécie apresentou menor sensibilidade à abamectina. No entanto, com os resultados obtidos, foi demonstrado que o pesticida Vertimec não representa um risco considerável para os invertebrados aquáticos, e, portanto, também para o funcionamento normal dos ecossistemas aquáticos.

## 5. Referências bibliográficas

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2004a. NBR 12713.

Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea).

AGUILAR, J. F. et al. 2002. Estratégias para avaliação da toxicidade da água de abastecimento público do município de Piracicaba através de bioensaios. Anais 32 ASSEMAE, Rio de Janeiro, Hotel Glória, p. 38-42.

ALI, A. and NAYAR, JK.1985. Activity of an avermectin insecticide, abamectin (MK-936), against mosquitoes and chironomid midges in the laboratory. Journal of the American Mosquito Control Association vol.1, p.384–386.

ALMEIDA, CA. 2002. Estudo ecotoxicológico do sedimento de represas do Rio Tietê com o organismo-teste bentônico *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 119p. Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental.

ALVES, SN. and MELO, AL. 2013. Effects of Benzodiazepine and ivermectin on *Girardia tigrina* (Platyhelminthes: Turbellaria). Bioscience Journal. vol. 29, n. 1, p. 209-215.

ANNIBALE, FS. 2009. Cultivo de planárias (*Girardia tigrina*) e ensaios de sensibilidade com dicromato de potássio. Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba. Trabalho de Conclusão de Curso. 40p.

ARAUCO, L R R. 2002. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnias* em presença e ausência de sedimento. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 86p. Mestrado em Aquicultura.

ARAÚJO, RPA. 2005. Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. 283 p. Tese (Doutorado).

BRUZON, AC. 2010. Efeito da toxicidade de microcistina em bioensaios com planárias *Dugesia tigrina* Girard. 58p. Universidade Federal de São Carlos. Trabalho de Conclusão de Curso.

BURG, RW., MILLER, BM; BAKER, EE., BIRNBAUM, J., CURRIE, SA., HARTMAN, R., KONG, Y., MONAGHAN, RL., OLSON, G., PUTTER, I., TUNAC, JB., WALLICK, H., STAPLEY, OE., OIWA and OMURA, S. 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. Antimicrobial agents and Chemotherapy. vol. 15, p.361-367.

CAMPBELL, WC.1989. Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.

CEREJEIRA, MJ., VIANA, P., BATISTA, S., PEREIRA, T., SILVA, E., VALÉRIO, MJ, SILVA, A., FERREIRA, M. and SILVA-FERNANDES, AM. 2003. Pesticides in Portuguese surface and groundwaters. Water Research.vol. 37, n.5 , p.1055–1063.

EGERTON, J.R., OSTLIND, DA., BLAIR, LS., EARY, DH., SUHAYDA, D., CIFFELI, S., RIEK, RF. And CAMPBELL, WC. 1979. Avermectins, new family of potent antihelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 15, n. 3, p. 372-378.

ERIKSSON, KS. and PANULA, P. 1994. Gamma-aminobutyric acid in the nervous system of a planarian. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 345, n. 4, p. 528-536.

ENVIRONMENT CANADA. Report EPS 1/RM/12. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Ottawa. 1990.

FELDHAUS, JM., FELDHAUS, AJ., ACE, LN. and POPE, CN. 1998. Interactive effects of the pesticides mixture on the neurobehavioral responses and AChE levels of planaria. *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. p.140-150.

FREITAS, E. C. 2009. Utilização da espécie nativa *Pseudosida ramosa* (Crustacea, Cladocera) como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos. Universidade Federal de São Carlos. 253p. Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais.

FREITAS, EC. and ROCHA, O. 2010. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. vol.60, n.2, p.241-249.

HAMILTON, M., RUSSO, RC and THURSTON, RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*. vol. 11, p.714-719.

HORVAT, T., KALAFATIĆ, M., KOPJAR, N. and KOVAČEVIĆ, G. 2005. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species – the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Aquatic Toxicology*, vol.73, n.4, p.342-352.

JACONETTI, PCM. 2005. Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 206p. Dissertação (Mestrado).

JARDIM, G. M. 2005. Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 127 p. Dissertação ( Mestrado).

KHANGAROT, BS. and RAY, PK. 1989. Sensitivity of midge larvae of *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera Chironomidae) to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. vol. 42, n.3, p. 325–330

KENK, R. 1944. The fresh-water triclads of Michigan. Museum of Zoology, University of Michigan Miscellaneous Publications. vol. 60, p.1-44 + 7 plates.

KOLAR, L., ERZEN, NK; HOGERWERF, L; CORNELIS, AM and GESTEL, V. 2008.

Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*.vol. 151, n.1, p.182-189.

LANKAS, GR., GORDON, LR.1989. Toxicology. In: Campbell, W.C. (Ed.), Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York, p. 89–112.

MASSARO, FC. 2006. Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 95p. Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental.

MASSARO, FC. 2011. Estudos ecológicos e ecotoxicológicos de espécies nativas de *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 502 p. Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Agrofit, sistemas de agrotóxicos fitossanitários.

[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulado\\_tecnico=5314&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5314&p_tipo_janela=NEW). Accessed 14 February 2013.

MELETTI, P. 2003. Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 209p. Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental.

MENDES, LB. 2011. Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec<sup>®</sup> 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes) por meio de estudos experimentais. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 109 p. Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental.

MOORE, J W. and RAMAMOORTHY, S. 1984. Heavy metals in natural waters. New York: Springer- Verlag. 328 p.

MOORE, JC.; DERUITER, PC. and HUNT, HW. Soil invertebrate/micro-invertebrate interactions: disproportionate effects of species on food web structure and function. *Veterinary Parasitology*, vol. 48, n.1-4, p. 247–60, 1993.

NANO, GM., BIANCO, MA., UGAZIO, G. and BURDINO, S. 2002. *In vivo* tests to evaluate potencial biological activity in natural substances. *Fitoterapia*, vol.73, n.2, p.140-146.

NOVELLI, A., VIEIRA, BH., CORDEIRO, D. ; CAPPELINI, LTD, VIEIRA, EM and ESPÍNDOLA, ELG. 2012a. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere*. vol. 86, n.1, p.36-40.

OLIVEIRA-NETO, AL. 2000. Toxicidade de alguns metais pesados (Cd, Cr, Pb) em organismos planctônicos lacustres da região subtropical. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 152p. Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental.

PATRICK, R., SCHEIER, A. and CAIRNS, J Jr. 1968. The relative sensitivity of diatoms, snails, and fish to twenty common constituents of industrial wastes. *The Progressive Fish-Culturist*. vol. 30, n. 3, p. 137-140.

PRÁ, D., LAU, AH., KNAKIEVICZ, T., CARNEIRO, FR. and ERDTMANN, B. 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. vol.585, n. 1-2, p.79-85.

PREZA, DL. and SMITH, D. 2001. Use of Newborn *Girardia tigrina* (Girard, 1850) in Acute Toxicity Tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. vol.50, n.1, p.1-3.

RIBEIRO, AR and UMBUZEIRO, GA. 2010. Relação tempo de exposição e mortalidade em testes com filhotes de *Girardia tigrina*. In: *Anais XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*. Bombinhas, Santa Catarina.

TARIQ, MI., AFZAL, S., HUSSAIN, I. and SULTANA, N. 2007. Pesticide exposure in Pakistan: a review. *Environment International*. vol. 33, n.8, p.1107–1122.

TIŠLER, T. and ERZEN, NK. 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*. vol. 15, n.6, p.495–502.

TRIEBSKORN, R., KOHLER, HR., ZAHN, T., VOGT, G., LUDWIG, M., RUMPF, S., KRATZMANN, M., ALBERTI, G. and STORCH, V. 1991. Invertebrate cells as targets for hazardous substances. *Z. Angew Zoology*. vol. 78, n.3, p.277–285.

VIEIRA, BH. 2010. Efeitos do agrotóxico Vertimec<sup>®</sup> no fitoplâncton: um estudo laboratorial e “in situ”. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 181 p. Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental.

VILLAR, D., GONZALEZ., GUALDA, MJ. And SCHAEFFER, DJ. Effects of Organophosphorus Insecticides on *Dugesia tigrina*: Cholinesterase Activity and Head Regeneration. 1994. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. vol.52, p.319-324.

WISLOCKI, PG., GROSSO, LS. and DYBAS, RA.1989. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: Campbell, W.C. (Ed.), *Ivermectin and Abamectina*.Springer Verlag, New York, p. 182–200.

ZAGATTO, PA. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. *Ambiente*. 1988. vol. 2, n. 2, p. 79- 83.

## Conclusões gerais

O pesticida Vertimec<sup>®</sup> 18 CE, o qual é amplamente utilizado no controle de pestes na agricultura pode atingir os sistemas aquáticos via escoamento superficial, em concentrações capazes de atingir espécies não-alvo, como foi evidenciado nos quatro capítulos anteriores.

A simulação de escoamento superficial após um evento de chuva em um campo agrícola sem cobertura vegetal no qual o pesticida Vertimec foi aplicado em concentrações usualmente utilizadas em culturas de morango produziu um lixiviado de solo que quando testado em laboratório resultou em toxicidade aguda ao organismo-teste *Chironomus sancticaroli*, com valor de CL<sub>50</sub> 96 h para o Vertimec, numa ordem de grandeza de apenas microgramas por litro, um valor muito baixo, evidenciando que esta formulação comercial da abamectina é extremamente tóxica às larvas desta espécie de inseto aquático.

O mesmo lixiviado (*runoff* contaminado) quando inoculado em mesocosmos em condições semi-naturais, resultou em toxicidade crônica a este mesmo organismo-teste, ocasionando diminuição no crescimento corporal, e deformidades no mento.

A adição direta do pesticida nos mesocosmos (tratamento V) resultou em 100% de mortalidade das larvas do quironomídeo *Chironomus sancticaroli*, corroborando os resultados anteriores de testes de toxicidade em laboratório.

No experimento de mesocosmos a comunidade bentônica natural previamente estabelecida, antes da contaminação e monitorada ao final de 7 dias evidenciou elevada toxicidade crônica do lixiviado contaminado, alterando a estrutura (composição taxonômica) e a densidade das populações. Em relação à composição o efeito crônico da adição direta deste pesticida, levou ao desaparecimento total dos representantes da Classe Insecta, ocasionando uma diminuição na riqueza de táxons da comunidade bentônica em cerca de 80%. Em relação à densidade houve também redução extrema, com redução superior a 80% do número inicial de organismos da comunidade bentônica.

Os resultados de testes de toxicidade aguda realizados com invertebrados de outros grupos taxonômicos revelaram que o pesticida Vertimec também afeta adversamente outros componentes da biota aquática como o turbelário *Girardia tigrina* e o cnidário *Hydra viridissima*, embora os valores de CL<sub>50</sub> 96 h deste pesticida para estas espécies sejam bem mais elevados que para as larvas do quironomídeo *Chironomus sancticaroli*. Estas diferenças

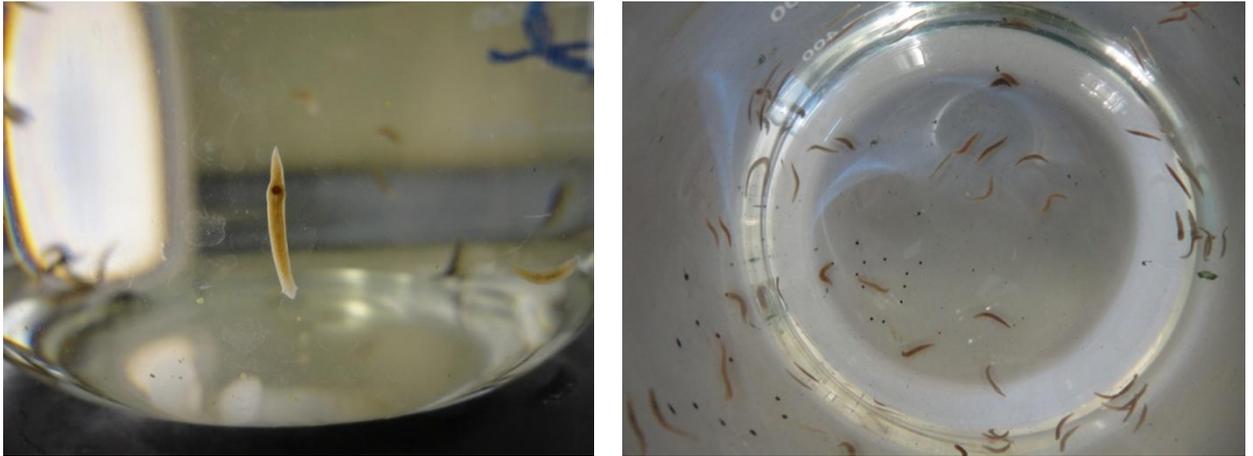
resultaram do modo de ação neurotóxica deste pesticida e das diferenças em relação à complexidade do sistema nervoso dos organismos-teste utilizados.

Em síntese pode-se concluir com este estudo que o Vertimec é um composto altamente tóxico, que pode atingir os ecossistemas aquáticos superficiais via *lixiviado* e que ocasiona ambas, toxicidade aguda e crônica, em diferentes níveis de organização: indivíduos, populações e comunidade. Apesar de ser primariamente um poderoso inseticida, ele afeta também outros organismos não-alvo como evidenciado neste estudo e também por estudos anteriores vinculados ao mesmo projeto experimental.

## **Apêndice A**

### **Fotos referentes ao Capítulo 4**





**Figura 1.** Seqüência de fotos evidenciando o cultivo de *Girardia tigrina*. Cultivo da espécie *Chironomus sancticaroli* (**a**) para sua posterior utilização como alimento (**b, c e d**) e momento da postura e fixação dos casulos no Becker (**g e h**).