UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP- DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

“Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves limnicos *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Müller, 1774).”

Analú Egydio Jacomini

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto- USP,
como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM
CIÊNCIAS- Área: BIOLOGIA
COMPARADA.

Ribeirão Preto- SP

2002

"Sonhar mais um sonho impossível,
Lutar quando é fácil ceder,
Vencer o inimigo invencível,
Negar quando a regra é vender

Vencer a tortura implacável,
Romper a incabível prisão,
Voar no limite improvável,
Tocar o inacessível chão.

É minha lei, é minha questão virar este mundo e cravar esse chão.
Não me importa saber se é terrível demais.
Quantas guerras terei que vencer por um pouco de paz?
E amanhã, se esse chão que eu beijei for meu leito e perdão,
Vou saber que valeu delirar e morrer de paixão.
E assim, seja lá como for, vai ter fim a infinita aflição,
E o mundo vai ver uma flor brotar do impossível chão."

Rui Guerra e Chico Buarque

"...é suma alegria, meus irmãos,
quando passais por diversas provações, sabendo que a
prova da nossa fé produz a paciência."
Tiago 1, 2.

Dedico este trabalho ao meu marido,
grande amor da minha vida, Marcelo
Jacomini e aos meus pais Carlos Reis
e Fátima Bárbaro, pelo carinho e
paciência.

Agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar, pela orientação durante a elaboração desta tese, contribuindo para a minha formação científica e profissional.

À Prof^a. Dr^a. Pierina Sueli Bonato, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio científico, por ter colocado à disposição seu laboratório, materiais, seu conhecimento, e principalmente, pelo seu humano *sim*, confiando na minha pessoa.

À Mércia Virgínia Carlos, pelos bons e longos momentos de parceria que passamos em frente ao cromatógrafo.

Ao Álvaro da Silva Costa pelo apoio nas coletas dos bivalves e à Susete Luiza Martim pelas análises de granulometria do sedimento.

Às amigas que passaram e que permanecem no Laboratório de Zoologia de Invertebrados: Marina, Caroline, Érica, Andréa Tomazelli, Daniela Mariano, Daniela Bacconi e Silvia Faustino.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar que muito me ajudaram a desvendar “os segredos da cromatografia”: Cristiane Masetto de Gaitani, Valquíria Jabor, Renato Bortocan, Ricardo Mathias e Luiz.

Ao José Roberto Jabor e Tomaz, que no início deste trabalho apoiaram no uso do cromatógrafo líquido.

Ao Instituto Adolfo Lutz, pela atenção e disponibilidade, representado pela pessoa da pesquisadora Maria Helena Iha.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, pela possibilidade de utilização de seus laboratórios e levantamento bibliográfico informatizado.

Ao Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, pela disponibilidade do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar, sem o qual não teria desenvolvido a metodologia de extração e análise de atrazina nos organismos.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, pela disponibilidade do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência- convênio CAPES/ PADCT, permitindo o desenvolvimento da metodologia e as análises dos organismos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (número do processo: 00/00995-2).

À Novartis, representada pelo Sr. Akira Ueda, por ter cedido gentilmente o padrão de atrazina.

Aos moluscos bivalves utilizados neste trabalho, que fazem parte de uma cadeia alimentar muitas vezes contaminada pelos homens.

Agradeço a Deus, pelo Dom da vida, a Cristo por atender os apelos de momentos difíceis, clareando os caminhos e me ensinando que “a tudo dai graças”.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	1
1.1 Histórico	1
1.2 Presença de pesticidas na água	6
1.3 Herbicidas triazínicos	7
1.4 Ecotoxicologia e monitoramento biológico	9
1.5 Metodologia analítica para análise de resíduos de pesticidas	12
1.6 Justificativa	16
2. Objetivos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1 Bivalves e local de coleta	19
3.2 Parâmetros físico- químicos da água	23
3.3 Manutenção em Laboratório	25
3.4 Análise química do herbicida atrazina	27
3.5 Validação do método	30
3.6 Experimentos de Bioacumulação	34
3.7 Testes de toxicidade aguda (CL 50)	39

4. Resultados e Discussão	41
4.1 Sedimento da lagoa Galo Bravo e Rio Pardo	41
4.2 Características físico-químicas da água da lagoa Galo Bravo e do rio Pardo .	42
4.3 Sensibilidade à Aclimação	43
4.4 Validação do método	44
4.5 Bioacumulação e Fator de Bioconcentração	51
4.6 Teste de Toxicidade Aguda	75
5. Conclusões	77
5.1 Desenvolvimento do Método	77
5.2 Validação do Método	77
5.3 Bioacumulação	78
5.4 Testes de Toxicidade Aguda	79
6. Perspectivas Futuras	80
7. Bibliografia	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	Esquema da instrumentação para HPLC	15
Figura 3.1:	Moluscos bivalves utilizados neste trabalho. A- <i>Anodontites trapesialis</i> e B- <i>Corbicula fluminea</i>	21
Figura 3.2:	A- Foto da lagoa Galo Bravo no município de Ribeirão Preto. B- Foto indicando a coleta às margens da lagoa, no sedimento e b- bivalve <i>Anodontites trapesialis</i> coletado	22
Figura 3.3:	Foto da região do Rio Pardo- município de Serra Azul- onde foram coletados os espécimes de <i>Corbicula fluminea</i>	24
Figura 3.4:	A- Disposição dos aquários com volume de 20L de água da mina em laboratório aclimatizado. B- Detalhe de um dos aquários mostrando a aeração, t- a tela plástica onde os animais são colocados e b- os bivalves acomodados. C- Esquema de montagem da tela plástica: as extremidades A e C, B e D são unidas por um fio de nylon formando um U onde os animais são encaixados	26
Figura 3.5:	A figura apresenta a estrutura molecular do herbicida atrazina, cuja fórmula química é $C_8H_{14}ClN_5$ e peso molecular 215,72	27
Figura 3.6:	<i>Anodontites trapesialis</i> . Vista do lado esquerdo após a remoção da valva esquerda e do manto. As setas mostram a direção da corrente ciliar	38
Figura 4.1:	Espectro de absorção do UV para a atrazina em metanol: água (6:4)	45
Figura 4.2:	Cromatograma de um bivalve <i>A. trapesialis</i> controle (A) e cromatograma da mesma espécie enriquecida com atrazina na concentração de 0,1µg/100mg de bivalve (B). Fase móvel: metanol: água (6:4), fluxo de 1 mL/min, detecção: 230nm	46

Figura 4.3:	Curva de calibração para análise de atrazina no intervalo de concentrações de 0,1 a 2,0 µg/100mg de bivalve da espécie <i>A. trapesialis</i>	47
Figura 4.4:	Curva de calibração referente à linearidade, obtida para o intervalo de concentrações de atrazina de 0,1 a 8,0 µg/100mg de bivalve da espécie <i>A. trapesialis</i>	48
Figura 4.5:	Bioacumulação de atrazina nos tecidos dos bivalves <i>A. trapesialis</i> do experimento 2 e 3. *n=4; atz, atrazina; biv, bivalve. As legendas correspondem à concentração de atrazina na água do aquário	55
Figura 4.6:	Cromatogramas de amostras de água de um aquário controle (A), e de um aquário com 0,3 µg/mL de atrazina (B)	59
Figura 4.7:	Gráfico de barras ilustrando a concentração média de atrazina nas diferentes estruturas do bivalve <i>A. trapesialis</i> e o desvio padrão	64
Figura 4.8:	Cromatogramas das partes do bivalve <i>A. trapesialis</i> controle	67
Figura 4.9:	Cromatogramas das partes do bivalve <i>A. trapesialis</i> com atrazina	68
Figura 4.10:	Bioacumulação de atrazina nos tecidos dos bivalves <i>C. fluminea</i> dos aquários 1 e 2. Atz, atrazina; biv, bivalve. As legendas correspondem à concentração de atrazina na água do aquário	70
Figura 4.11:	Cromatograma de um bivalve <i>C. fluminea</i> controle (A) e cromatograma da mesma espécie exposta à atrazina em aquário (B). Fase móvel: metanol: água (6:4), fluxo de 1 mL/min, detecção: 230 nm	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1:	Desenvolvimento dos Herbicidas	2
Tabela 1.2:	Vendas de Pesticidas das companhias líderes mundiais	2
Tabela 1.3:	Venda de pesticidas em 1999 e 2000, em quantidade ...	3
Tabela 1.4:	Consumo de pesticidas nas regiões geográficas do Brasil, em quantidade de ingrediente ativo no ano de 2000	4
Tabela 1.5:	Consumo de agrotóxicos em alguns estados do Brasil, em quantidade de ingrediente ativo no ano de 2000	4
Tabela 4.1:	Resultado da granulometria por peneiramento do sedimento da lagoa Galo Bravo e do Rio Pardo (município de Serra Azul)	42
Tabela 4.2:	Média e desvio-padrão dos dados físico-químicos da água da lagoa Galo Bravo (n=5 amostras)	43
Tabela 4.3:	Dados físico-químicos da água do rio Pardo	43
Tabela 4.4:	Recuperação do método de análise de atrazina no molusco bivalve <i>A. trapesialis</i>	49
Tabela 4.5:	Avaliação da precisão do método para análise de atrazina no molusco bivalve <i>A. trapesialis</i>	50
Tabela 4.6:	Limite de quantificação do método. Os valores em negrito são referentes à concentração considerada limite para quantificação	50
Tabela 4.7:	Concentração de atrazina na água dos aquários no início e final dos experimentos e bioacumulação de atrazina nos tecidos dos bivalves <i>A. trapesialis</i> dos experimentos 1, 2 e 3	54
Tabela 4.8:	Média e desvio-padrão dos dados físico-químicos da água dos aquários com <i>A. trapesialis</i> (n=16)	60
Tabela 4.9:	Fator de bioconcentração da atrazina pelo bivalve <i>A. trapesialis</i> dos experimentos 2 e 3	60

Tabela 4.10:	Concentração de atrazina nos quatro grupos das diferentes estruturas do bivalve <i>A. trapesialis</i> , média e desvio padrão	63
Tabela 4.11:	Concentração de atrazina na água dos aquários no início e final do experimento, bioacumulação de atrazina nos tecidos dos bivalves <i>C. fluminea</i> e BCF para 48h de experimento	69
Tabela 4.12:	Média e desvio-padrão dos dados físico-químicos da água dos aquários com <i>C. fluminea</i> (n=3)	74

RESUMO

Inúmeros pesticidas são usados na agricultura, para controle de pragas e ervas daninhas. Dentre eles destaca-se o herbicida atrazina, intensivamente utilizado nas culturas de cana-de-açúcar, milho e sorgo, que ocupam extensas áreas no estado de São Paulo. Grande parcela do herbicida, que é aplicado na agricultura, entra em contato com o solo, podendo ser lixiviado, atingindo as águas superficiais. Neste sentido, alguns animais como, por exemplo, moluscos bivalves, podem ser utilizados como monitores biológicos do ambiente aquático e auxiliar no estudo da ecotoxicologia.

Considerando o risco de contaminação do ambiente aquático pela atrazina, propõe-se, no presente trabalho, desenvolver uma metodologia de análise daquele herbicida nos tecidos nas espécies de bivalves límnicos *Anodontites trapesialis* (LAMARCK, 1819) e *Corbicula fluminea* (Muller, 1789), validar esse método e, finalmente, verificar se ocorre a bioacumulação do herbicida nas partes moles dessas duas espécies.

Como técnica de extração utilizou-se a extração líquido- líquido e como técnica de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Palavras- chave: bivalves; atrazina; bioacumulação; validação

ABSTRACT

Large amount of pesticides have been used for the control of agriculture pests and weeds. Particularly important among herbicides is atrazine, extensively employed in cultures of sugar cane, corn and sorghum, that occupies an extensive area in São Paulo state. Large portions of atrazine, applied in the agricultural fields, leaches from the soil to surface water systems. In this way, some organisms such as fresh-water mollusks bivalves, can be used as biological monitors of aquatic environments, contributing for ecotoxicology studies.

Considering the existence of risk of contamination by atrazine of the aquatic environment, the purpose of this work was, (i) to develop a method for the analysis of atrazine in the fresh- water bivalves species *Anodontites trapesialis* (LAMARCK, 1819) and *Corbicula fluminea* (MULLER, 1789), (ii) to validate such method and, (iii) to detect if these organisms can bioaccumulate atrazine in their tissues.

This method involved a simple liquid-liquid extraction procedure, followed by high- performance liquid chromatographic analysis (HPLC).

Keywords: bivalves; atrazine; bioaccumulation; validation