**Toxicidade de mistura de agrotóxicos em ambiente
aquático - reflexos na saúde pública da exposição
simultânea aos herbicidas atrazina e diuron**

RÚBIA YURI TOMITA

Tese apresentada ao Programa de Pós -graduação em
Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Saúde Pública.

Área de concentração: Saúde Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Zuleika Beyruth

São Paulo

2004

*"A virtude é um meio-termo
entre dois vícios,
um por excesso e outro por falta"*

Aristóteles

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À minha mãe Júlia e meu pai Shuji que me deram o dom da vida e da alegria,

À minha tia Iracema pelo dom da alegria e da diversão com muito carinho, desde a minha infância,

Aos meus irmãos Marcos, Mauro e Heitor, pelo dom da graça e da aventura de viver em família,

Aos meus filhos Carolina, Gabriel, Marquinhos, Pedro Jr., Déborah e Paula pelo dom do amor, do sonho e da crença no futuro,

Ao Pedro, pelo dom do amor, da plenitude da vida e da felicidade.

Sem vocês eu não seria eu e minha vida não seria tão maravilhosa!!!!

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas e instituições contribuíram, me estimulando e incentivando para a realização deste curso de pós-graduação. Agradeço imensa e sinceramente a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com este momento, a finalização da Tese. Obrigada pessoal, jamais poderei retribuir tanto carinho!!!!

À minha Família pelo estímulo, carinho e amor ao longo do meu caminho.

À minha orientadora Dra. ZULEIKA BEYRUTH com quem tive o prazer de compartilhar os desafios da pós-graduação, pela orientação e pelo estímulo constantes.

Aos meus amigos pela torcida e pelo incentivo sempre recheados de muito carinho!

Ao Instituto Biológico, à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios e à Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento por terem autorizado minha participação no curso de pós-graduação.

Aos amigos do Instituto Biológico pelo constante estímulo e incentivo. Pessoal, valeu a amizade e o carinho!!!!

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia do Instituto Biológico pela acolhida carinhosa e amistosa, pelo respeito profissional e principalmente pelo incentivo.

À Cynthia Bomfim Pestana, Janete Walter Moura e Regina Sawaia Sáfadi por terem aberto os laboratórios do TECAM (Tecnologia Ambiental), possibilitando a realização deste trabalho.

À todos os funcionários e amigos do TECAM pela seriedade, competência e principalmente pelo carinho que dedicaram à mim e ao nosso estudo.

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública, especialmente do Depto. de Saúde Ambiental, Seção de Pós-graduação e Serviço de Aprimoramento da CPG, pela presteza, competência e atenção ao orientar e informar os alunos.

À todos os professores da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo por terem compartilhado seus conhecimentos e experiência, sempre com respeito e carinho.

À Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. e à Griffin do Brasil Ltda. por terem gentilmente cedido os compostos utilizados no trabalho.

À Dra. Gizela Shimizu pelo apoio incondicional e ajuda inestimável.

RESUMO

Tomita, R.Y. **Toxicidade de mistura de agrotóxicos em ambiente aquático – reflexos na Saúde Pública da exposição simultânea aos herbicidas atrazina e diuron.** São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública/USP].

A avaliação da toxicidade de misturas de agrotóxicos é importante pois é cenário comum, principalmente no ambiente aquático, devido à utilização intensiva e simultânea dos compostos. Assim, foi desenvolvido estudo para comparar o efeito tóxico causado pelos herbicidas atrazina e diuron quando presentes individualmente e em mistura no ambiente aquático. Realizou-se teste de toxicidade aguda com alga *Selenastrum capricornutum* e com microcrustáceo *Daphnia similis* expondo-os à atrazina e diuron individualmente e à mistura dos dois compostos, utilizando os métodos da Associação Brasileira de Normas Técnicas, modificados. Após exposição individualizada aos compostos, o diuron (CE(I)50, 96h= 0,01mg/L) mostrou-se 7 vezes mais tóxico para a alga do que a atrazina (CE(I)50, 96h= 0,07mg/L). Para o microcrustáceo, diuron (CE(I)50, 48h= 1,49mg/L) foi cerca de 15 vezes mais tóxico do que atrazina (CE(I)50, 48h= 22,53mg/L). Nos ensaios onde os organismos estiveram expostos à mistura dos agrotóxicos, o efeito tóxico foi mais severo quando comparado às toxicidades individuais dos herbicidas estudados, para ambos os organismos. Dentre outros aspectos, concluiu-se que o diuron foi mais tóxico do que atrazina e que a

toxicidade aguda dos compostos foi potencializada quando presentes simultaneamente, em mistura, para os organismos estudados, indicando que a toxicidade de misturas de agrotóxicos se constitui em área de pesquisa a ser explorada, inclusive porque não há consenso sobre como conduzir a avaliação de toxicidade de misturas.

Descritores: Toxicidade de mistura; *Daphnia similis*; *Selenastrum capricornutum*; atrazina; diuron; herbicida.

ABSTRACT

Tomita, R.Y. **Toxicidade de mistura de agrotóxicos em ambiente aquático – reflexos na saúde pública da exposição simultânea aos herbicidas atrazina e diuron** [Toxicity of agrochemicals mixture in aquatic environment – reflection on public health due to simultaneous exposition to herbicides atrazine and diuron]. São Paulo (BR); 2004. [PhD Thesis – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brazil].

The evaluation of toxicity of agrochemicals mixture is important because it is a common scenery, specially in the aquatic environment, due to intensive and simultaneous use of compounds. Study has been developed to compare the toxic effect caused by herbicides atrazine and diuron when individually present or as mixture in aquatic environment. Acute toxicity test has been carried out with algae *Selenastrum capricornutum* and microcrustacean *Daphnia similis* exposed to atrazine and diuron individually or as mixture, using methods of “Associação Brasileira de Normas Técnicas” (ABNT), modified. After individual exposition to the compounds, diuron (96h, EC(I)50= 0,01mg/L) showed to be 7 times more toxic to algae than atrazine (96h, EC(I)50= 0,07mg/L). To the microcrustacean, diuron (48h, EC(I)50= 1,49mg/L) showed to be 15 times more toxic than atrazine (48h, EC(I)50= 22,53mg/L). The assays where organisms had been exposed to the agrochemicals mixture, results showed that toxic effects were more severe, when compared to individual toxicities of the studied herbicides, for both

organisms. Among other aspects, it was concluded that diuron was more toxic than atrazine to the organisms, and acute toxicity of the compounds were more potent when simultaneously present, as mixture, for the tested organisms, and it indicates a research field that must be explored, specially because there is no consensus related to the way for conducting the evaluation of mixtures toxicity.

Descriptors: Toxicity of mixture; *Daphnia similis*; *Selenastrum capricornutum*; atrazine; diuron; herbicide.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Agricultura e o uso de agrotóxicos: a questão ambiental	01
1.1.1. Introdução à relevância ambiental do tema	01
1.1.2. Definição de agrotóxico e os diferentes tipos de classificação	03
1.2. Legislação de agrotóxicos e padrão de uso na agricultura	06
1.2.1. Introdução	06
1.2.2. Evolução histórica da legislação de agrotóxicos no Brasil: mudanças no conceito, na denominação e as modificações no padrão de uso dos “produtos fitossaneantes”	08
1.2.3. A introdução de alguns agrotóxicos no Padrão de Potabilidade de Água como questão relevante para a saúde pública	18
1.3. Usos e Abusos da Água na Atualidade	20
1.3.1. Importância, disponibilidade e demanda dos recursos hídricos – a agricultura e sua influência sobre a qualidade da água	20
1.3.2. Contaminação da água e suas implicações para a saúde pública	22

1.4. A água como veículo de agrotóxicos: uma questão ambiental e de saúde pública?	26
1.4.1. Processos de interação entre os agrotóxicos e a água	26
1.4.2. Toxicidade aquática - Fatores que influenciam a toxicidade de compostos químicos	29
1.4.3. Problemas ambientais com agrotóxicos	33
1.5. O uso de agrotóxicos e a qualidade da água	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo Geral	41
2.2. Objetivos Específicos	42
3. PROCEDIMENTO METODOLÓGICO	43
3.1. Compostos	43
3.2. Organismos-teste	46
3.3. Testes de toxicidade	49
3.3.1. Teste de toxicidade com <i>Selenastrum capricornutum</i>	49
3.3.1.1. Condições gerais do teste	50
3.3.1.2. Preparo de soluções	51
3.3.1.2.1. Soluções-estoque	51
3.3.1.2.2. Preparo de soluções-teste	54
3.3.1.3. Preparo do inóculo de algas	56
3.3.1.4. Sensibilidade da cultura algácea	57
3.3.1.5. Procedimentos do teste de toxicidade em <i>Selenastrum capricornutum</i>	57
3.3.1.6. Análises Estatísticas	58

3.3.1.7. Validação dos resultados	59
3.3.2. Teste de toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	59
3.3.2.1. Manutenção do organismo-teste	60
3.3.2.2. Seleção dos organismos-teste	61
3.3.2.3. Preparo de soluções	61
3.3.2.4. Procedimentos gerais do teste de toxicidade com	63
<i>Daphnia similis</i>	
3.2.3.5. Análises estatísticas	64
3.2.3.6. Sensibilidade à substância de referência	64
3.2.3.7. Validação dos resultados	65
4. RESULTADOS	66
4.1. Teste de toxicidade com <i>Selenastrum capricornutum</i>	66
4.1.1. Teste de toxicidade com <i>S. capricornutum</i> exposta ao herbicida atrazina	67
4.1.2. Teste de toxicidade com <i>S. capricornutum</i> exposta ao herbicida diuron	74
4.1.3. Teste de toxicidade com <i>S. capricornutum</i> exposta à mistura dos herbicidas atrazina e diuron	81
4.2. Teste de toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	88
4.2.1. Teste de toxicidade com <i>D. similis</i> exposto ao herbicida atrazina	88
4.2.2. Teste de toxicidade com <i>D. similis</i> exposto ao herbicida diuron	94

4.2.3. Teste de toxicidade com <i>D. similis</i> exposto à mistura dos herbicidas atrazina e diuron	99
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES	121
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXO 1 - Preparo do meio de cultura líquido L. C. Oligo	1-A
ANEXO 2 – Manutenção da cultura de alga <i>Selenastrum capricornutum</i>	3-A
ANEXO 3 – Quantificação de densidade algácea	6-A
ANEXO 4 – Manutenção de cultura de <i>Daphnia similis</i>	8-A
ANEXO 5 – Preparo de água mole reconstituída	10-A
ANEXO 6 – Preparo de alimento composto	12 -A

1. INTRODUÇÃO

1.1. AGRICULTURA E O USO DE AGROTÓXICOS: A QUESTÃO AMBIENTAL

1.1.1. Introdução à relevância ambiental do tema

A agricultura, quando considerada num sentido mais amplo, é responsável direta pela alteração de mais de um terço da superfície terrestre do planeta, atingindo quase todos os biomas, e foi com seu surgimento que ocorreu a primeira grande modificação no grau de interferência humana no ambiente. Aproximadamente 92% dos alimentos do mundo constituem-se de vegetais e seus derivados, sendo a quase totalidade produzida pela agricultura, que ocupa uma extensão de área girando em torno de 1,6 bilhão de hectares, equivalendo aproximadamente à área da América do Sul¹.

O modelo de agricultura adotado baseia-se no uso de agrotóxicos, assim, durante os anos 40 os primeiros agrotóxicos sintéticos foram disponibilizados e trouxeram grandes benefícios para o aumento da produção de alimentos². Estas substâncias são empregadas há muito tempo mas foi a partir da II Guerra Mundial, com a descoberta da propriedade inseticida do dicloro-difenil-tricloroetano, o DDT, que iniciou-se a expansão e desenvolvimento dos usos característicos dos últimos 40 anos e estes passaram então a ser amplamente utilizados^{3, 4, 5}. Não se pode negar que esses produtos possibilitaram o aumento da produtividade agrícola e têm

auxiliado no controle de vetores de diversas doenças^{5, 6}, entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o ambiente. Dentre os efeitos nocivos ao ambiente pode-se citar a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais. Além da contaminação do meio ambiente, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar e ocasionar danos à saúde ^{4, 5, 7}.

Os primeiros relatos sobre resíduos de inseticidas organoclorados no ambiente e nos alimentos datam da década de 50, quando foram observadas as primeiras ocorrências de bioconcentração e bioacumulação na cadeia alimentar, que resultaram em altos teores também para os seres humanos⁸. É importante ressaltar que “não só o uso inadequado dos pesticidas, mas o uso normal desses produtos acarretam dificuldades” para o ambiente, pois embora “atinjam os objetivos desejados, ultrapassam os fins colimados” ⁹. Isto se deve, principalmente, à dificuldade em se prever a persistência dos compostos e/ou metabólitos no ambiente bem como nos produtos agrícolas tratados (grãos, por exemplo). Como ressaltado por Van der Werf, na década de 60 o livro Primavera Silenciosa (Carson, R.L, 1962, Silent Spring, Riverside Press, Cambridge, USA), apontava os impactos negativos sobre o ambiente e a saúde humana, alertando para os efeitos adversos do uso de agrotóxicos ².

Em relação à água, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes¹⁰. Resíduos de inseticidas organoclorados em águas superficiais datam de 1960, quando foi

demonstrada sua toxicidade direta aos organismos aquáticos². Eventos de contaminação de águas subterrâneas foram relatados nas décadas de 80 e 90, aumentando a preocupação com a qualidade destas águas pois em inúmeros países é a principal fonte para abastecimento das populações².

O uso de agrotóxicos possui benefícios, entretanto, traz o risco inerente de contaminação ambiental e há necessidade de ordenar seu comércio e uso, mantendo sua eficiência sob o ponto de vista agrônomo e minimizando os efeitos ambientais deletérios.

1.1.2. Definição de agrotóxico e os diferentes tipos de classificação

A Lei nº 7.802 de 11/07/89 foi a primeira lei brasileira a dispor especificamente sobre agrotóxicos e o fez de maneira abrangente. Seu artigo 2º definiu os agrotóxicos e afins como sendo “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”; incluiu também as “substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Uma das formas de classificação dos agrotóxicos é quanto à sua toxicidade ao homem e foi estabelecida pelo Decreto Federal nº 98.816, de 11/01/90 (que regulamentou a Lei 7.802, no parágrafo único do artigo 2º), obedecendo a seguinte graduação:

- a) classe I – extremamente tóxico;
- b) classe II – altamente tóxico;
- c) classe III – medianamente tóxico; e
- d) classe IV – pouco tóxico.

O estabelecimento dos critérios e a definição dos dados e parâmetros para efetuar-se a classificação toxicológica dentro destas classes estabelecidas, foram editados em 1992 pela Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, através da Portaria nº 03 que define as “Diretrizes e Exigências do Ministério da Saúde, Referentes à Autorização de Registro, Renovação de Registro e Extensão de Uso de Agrotóxicos e Afins”.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) também tomou suas providências editando a Portaria Normativa nº 84 em 15/10/96, onde são estabelecidos os procedimentos e exigências para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins. Assim, outro critério de avaliação estabelecido é quanto ao potencial de periculosidade ambiental e a classificação obedece a seguinte graduação (art. 3º):

Classe I – Produto Altamente Perigoso

Classe II – Produto Muito Perigoso

Classe III – Produto Perigoso

Classe IV – Produto Pouco Perigoso.

O parágrafo único deste mesmo artigo estabelece ainda que os agrotóxicos, seus componentes e afins para os quais não houver disponibilidade no país de métodos para sua desativação, ou que apresente características mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas, ou ainda que a classificação de potencial de periculosidade ambiental (ppa) e/ou avaliação de risco ambiental indicarem índices não aceitáveis de periculosidade e/ou risco, considerando os usos propostos, serão classificados como “Produto de Periculosidade Impeditiva à Obtenção de Registro”.

Em 1981 a Portaria nº 007 do Ministro da Agricultura estabeleceu as normas para classificação de produtos de uso livre, controlado e restrito. Esta portaria evidenciava a preocupação em minimizar efeitos negativos ao meio ambiente, mesmo quando a saúde humana não estava sendo tão acentuadamente afetada. Assim, de acordo com esta portaria os compostos seguiam a seguinte classificação:

- a) uso controlado: formulações classe I e II (altamente e medianamente tóxicos, respectivamente) e aquelas com características altamente poluentes, cuja venda era permitida somente com Receituário Agrônomo;
- b) uso restrito: formulações que envolvam maiores riscos em determinada forma de aplicação, só podem ser comercializadas para venda e aplicada através de empresas especializadas em prestação de serviços fitossanitários, e;

c) uso livre: formulações classe III e IV (pouco tóxicas e praticamente não tóxicas, respectivamente).

O agrotóxico também pode ser classificado quanto ao tipo de praga que irá combater, como por exemplo: insetos = inseticida; ácaros = acaricida; fungos = fungicida; ervas daninhas = herbicida, dentre outros. Há ainda a possibilidade de classificá-los de acordo com suas características químicas em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, compostos uréicos, compostos triazínicos, dentre outros^{5, 7}. Existem ainda outras maneiras de classificação dos agrotóxicos, como por exemplo quanto à sua persistência no meio ambiente e quanto à sua toxicidade a diversos organismos. É importante ressaltar que cada tipo de classificação opera no sentido de uma finalidade e geralmente é impregnado de conceitos que possibilitam inferências quanto à sua periculosidade .

1.2. LEGISLAÇÃO DE AGROTÓXICOS E PADRÃO DE USO NA AGRICULTURA

1.2.1. Introdução

Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira sofreu inúmeras e profundas transformações que alteraram tanto a composição das culturas, como os processos de produção e padrões tecnológicos até então em vigor. O processo de modernização, entendido como uma série de transformações

tecnológicas nos processos produtivos, intensificou o emprego de insumos, como máquinas, fertilizantes e agrotóxicos, que contaram com preços favoráveis e estímulos como crédito farto a juros subsidiados, que facilitaram sua ampla adoção no meio rural. Este modelo baseado no uso intensivo de insumos químicos, sementes melhoradas e mecanização, foi denominado “revolução verde”¹. Havia inclusive algumas resoluções que vigoraram até o início da década de 80, onde o agricultor era obrigado a formalizar sua proposta de financiamento através de projetos técnicos que vinculavam a aplicação de cerca de 15% do orçamento em insumos, cuja aquisição era comprovada ao agente financeiro mediante a entrega de notas fiscais³.

Desta forma, a política de crédito rural nos anos 60-70, beneficiou produtos que já dispunham de tecnologias modernas (como o café, algodão e laranja), condicionou os sistemas técnicos de produção, induzindo à utilização de insumos modernos com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas à curto prazo, ao mesmo tempo em que fomentou o setor urbano-industrial, fornecedor desses insumos³.

Dados internacionais estimam que 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos são aplicados anualmente nas culturas agrícolas ao redor do mundo² e segundo dados da Organização Mundial de Saúde de 1992, o mercado mundial contabiliza aproximadamente US\$ 26.400 milhões, sendo que os herbicidas são os compostos mais usados, constituindo 40% do total, enquanto 30% são inseticidas e os fungicidas somam aproximadamente 20% do total comercializado⁶.

1.2.2. Evolução histórica da legislação de agrotóxicos no Brasil: mudanças no conceito, na denominação e as modificações no padrão de uso dos “produtos fitossaneantes”

A análise da legislação relacionada aos agrotóxicos evidencia as diferenças em termos de conceito e denominação dos compostos. Assim, ao longo do tempo inúmeros diplomas legais foram publicados e embora não dispusessem especificamente sobre o tema, alguns já regiam seu uso. As diferentes “filosofias” constantes dos diplomas legais permitem a identificação de 3 fases distintas: a primeira quando os agrotóxicos ainda não eram amplamente utilizados e eram considerados produtos saneantes, demonstrando sua aceitação sem a preocupação com o fato de serem produtos tóxicos para o homem e meio ambiente. Na 2ª fase, já se percebia nos diplomas legais, a consciência de sua toxicidade e eram denominados defensivos agrícolas, porém a necessidade de se implementar a produção agrícola e promover o desenvolvimento urbano-industrial no país, eram prioritários. E, finalmente, o 3ª fase, quando a denominação *agrotóxico* se generalizou e a preocupação com seus efeitos sobre a saúde humana e meio ambiente se faz mais presente, gerando leis que dispõem de forma mais rigorosa sobre o tema.

Em nosso estudo a 1ª fase compreendeu o período de 1921 até o início dos anos 70 e os compostos eram considerados produtos saneantes. Nesta fase há o Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal (aprovado e regulamentado pelo Decreto Federal nº 15.198 de 21/12/21), do então

Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, no capítulo IV – Do trânsito de plantas vivas e das medidas de combate das doenças e pragas – artigo 58, menciona-se “inseticidas e fungicidas, produtos para uso exclusivo no combate à praga ou doença pela associação dentro da área para cuja defesa ela se constitui” e sua análise permite observar que no combate às doenças utilizava-se técnicas de isolamento da região infestada e destruição dos vegetais, com pouca utilização de produtos químicos. Neste período, os agrotóxicos eram enfocados como produtos fitossaneantes e de uso restrito, ainda não se percebia preocupação com a contaminação ambiental.

O Decreto Federal nº 24.114 (12/04/34) aprovou o novo Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal e não se observa alteração significativa no conceito dos produtos saneantes. Este Regulamento vigorou até 1989, quando foi aprovada a Lei Federal nº 7.802 que dispõe especificamente sobre agrotóxicos.

Foi apenas por volta de 1970 que a preocupação com o meio ambiente começou a ocupar espaço nas Portarias Ministeriais e Decretos-Lei, já que cabia somente à União legislar sobre o assunto. É nesta época que se torna mais evidente a mudança na denominação dos produtos saneantes para o termo defensivos agrícolas, pois o conhecimento e a prática já haviam revelado o potencial tóxico destes compostos.

Na perspectiva de nossa análise, a 2ª fase tem lugar a partir do início dos anos 70 e prolonga-se até meados dos anos 80. Neste momento o desenvolvimento urbano-industrial era prioritário embora já houvesse consciência da toxicidade dos agrotóxicos.

Neste período, o Decreto-Lei nº 917, de 07/10/69, dispôs sobre o emprego da aviação agrícola no País no sentido de “fiscalizar as atividades de aviação agrícola no concernente à observância das normas de proteção à vida e à saúde, ... , bem como das de proteção à fauna e à flora”, pois embora a utilização de aeronaves tenha facilitado o emprego dos agrotóxicos, permitindo aplicações rápidas de maior quantidade dos compostos e sem necessidade de mão de obra numerosa, aumentou muito o perigo de contaminação ambiental, principalmente para os corpos d'água adjacentes às áreas de culturas. Mesmo com o conhecimento das condições climáticas e todo o aparato técnico, é impossível restringir a área a ser atingida pelo produto e evitar sua deriva. Assim, como já citado anteriormente, neste momento havia grande incentivo, inclusive fiscal, para o emprego de compostos químicos na agricultura e adoção de técnicas modernas de produção no campo, mas também havia necessidade de se controlar o uso para minimizar os problemas.

Ao longo da década de 70, a Divisão de Defesa Sanitária Vegetal, através de inúmeras portarias restritivas, foi impondo certo controle sobre aqueles compostos mais tóxicos. Estas ações já refletiam os problemas que estavam sendo vivenciados em função do uso destes produtos e pode-se destacar as Portarias nº357 (de 14/10/71) e nº393 (05/10/72), proibindo o uso de organoclorados em pastagens e na cultura do fumo, respectivamente, proibições valiosas pois sabe-se que esta classe de compostos persiste por vários anos no ambiente, além da possibilidade da presença de resíduos tóxicos nas culturas. A Portaria nº 326, de 16/08/74

proibiu o uso de 2,4,5 T (ácido 2,4,5 - triclorofenoxiacético) em florestas e nas margens de rios, lagos, açudes, poços e mananciais, demonstrando preocupação especialmente com a contaminação de corpos d'água. Em 1975, a Portaria nº 002 proibiu o uso de defensivos agrícolas que contivessem na sua formulação compostos de metil-mercúrio, etil-mercúrio e outros alquil-mercúrio, devido às evidências de sua elevada toxicidade, prevenindo assim graves problemas de intoxicações e contaminação ambiental.

As indústrias de pesticidas também começaram a ser controladas, pois somente poderiam operar aquelas que possuísem licença do Ministério da Saúde no caso de produtos domissanitários (uso doméstico), ou licença do Ministério da Agricultura para indústrias de produtos “fitossaneantes ou zoossaneantes” (Decreto Federal nº 67.112/70). A prestação de serviços fitossanitários por empresas especializadas, no território nacional, também foi disciplinada (Portaria nº 429 de 14/10/74).

Inúmeras ações foram ocorrendo em relação à rotulagem, embalagem, aplicação e comércio dos defensivos agrícolas no sentido de salvaguardar a saúde humana e o ambiente. Em 1981, a Portaria nº 007 do Ministro da Agricultura implantou o Receituário Agrônômico, no sentido de controlar a venda de produtos, inclusive para “formulações com características altamente poluentes e que não tenham sido classificadas como altamente tóxicas e medianamente tóxicas”. Em função desta Portaria, em 23/01/81 o Secretário de Defesa Sanitária Vegetal publicou a Portaria nº 01 instituindo o cadastro obrigatório dos varejistas, revendedores,

distribuidores, cooperativas e outras entidades que transacionassem defensivos agrícolas diretamente com usuários, junto às Delegacias Federais de Agricultura (DFA), estabelecendo assim uma fiscalização efetiva sobre o comércio de defensivos sujeitos à venda controlada ou restrita.

É difícil precisar quando a denominação defensivos agrícolas começou a ser substituída por agrotóxicos. Entretanto, no final da década de 70 e início dos anos 80 as diferenças conceituais e filosóficas entre estas duas denominações já eram evidentes. Os segmentos da sociedade preocupados com os possíveis problemas à saúde humana e ao meio ambiente já empregavam o termo agrotóxico e aqueles envolvidos na produção, comercialização e aplicação dos compostos utilizavam o termo defensivo agrícola. Neste momento, no âmbito jurídico também se percebe a mudança conceitual em relação aos agrotóxicos e a preocupação crescente com a proteção da saúde e do ambiente permeando os diplomas legais.

Em 1984 foi aprovada a Lei nº 4.002 no Estado de São Paulo, dispondo sobre a distribuição e comercialização de produtos agrotóxicos e outros biocidas no território estadual (art. 1º, caput), condicionando sua distribuição e comercialização ao cadastramento prévio dos mesmos junto à Secretaria de Agricultura e Abastecimento, a Secretaria de Obras e do Meio Ambiente e a Secretaria de Saúde, sendo exigida certidão expedida por representantes legais das três secretarias, para classificação toxicológica e atendendo às normas e parâmetros estabelecidos nesta lei (art. 1º).

Esta lei avançou na definição de agrotóxicos e nas normas e os critérios para a classificação toxicológica e *ecotoxicológica* dos compostos,

sendo que o dado mais agravante seria usado para classificar o produto. Observa-se claramente que a questão dos agrotóxicos é tratada de maneira mais abrangente, considerando-se os possíveis danos ecológicos oriundos de sua utilização, permitindo inclusive que se exigisse a reavaliação de qualquer produto ou processo físico e agentes biológicos, sempre que a pesquisa científica produzisse dados de caráter relevante. Percebe-se a tentativa de integrar os segmentos diretamente envolvidos na questão dos agrotóxicos, ou seja, saúde - meio ambiente - agricultura, no sentido de se normatizar sua utilização salvaguardando a saúde e o meio ambiente, sem inviabilizar a atividade econômica.

Entretanto, a Lei nº 4.002/84 sofreu vetos por inconstitucionalidade em alguns artigos, pois naquele momento competia exclusivamente à União legislar sobre o assunto. Mas pode-se observar que vários aspectos que dela constavam são encontrados na Lei Federal nº 7.802/89, principalmente em relação à preservação ambiental. Esta lei pode ser considerada um marco do início da 3ª fase e uma demonstração clara da mudança conceitual e filosófica em relação aos agrotóxicos. Embora o art. 5º da Lei nº 4.002/84 tenha sido declarado inconstitucional e sofrido veto, em 02/09/85 o Ministério da Agricultura, através da Portaria nº 429, concordando com o disposto no artigo vetado e reconhecendo sua relevância, proibiu o uso de agrotóxicos comprovadamente de alta persistência ambiental e/ou periculosidade, banindo assim o uso, a comercialização e a distribuição de compostos organoclorados no território nacional. Cabe ressaltar que estes compostos tiveram a comprovação de seu efeito deletério através da ocorrência de fatos

e do resultado das pesquisas científicas nesta área, evidenciando mais uma vez a importância e a necessidade da interação dos diversos segmentos sociais.

A legislação sobre agrotóxicos foi evoluindo com o transcorrer do tempo e se tornando mais restritiva, demonstrando aumento da conscientização aos perigos inerentes à utilização destas substâncias, bem como a preocupação com a qualidade da saúde, alimentos e meio ambiente.

A Constituição Federal de 1988 possui um capítulo exclusivo para tratar da proteção ao meio ambiente (art. 225) e sua “filosofia” passa então a ocupar inúmeros segmentos e nortear legislações setoriais e de políticas públicas. Assim, a chamada Lei dos Agrotóxicos (Lei 7802/89), dispôs sobre a matéria de maneira global e define os agrotóxicos de maneira abrangente, incluindo os “agentes e processos físicos, químicos ou biológicos”.

De acordo com esta Lei, atualmente, há exigência do registro dos agrotóxicos junto aos órgãos federais responsáveis pelos setores de saúde, meio ambiente e agricultura para que se possa produzir, exportar, importar, comercializar e utilizar essas substâncias (art. 3º), evidenciando a complexidade do tema e a necessidade de se equacionar de forma integrada as questões relacionadas aos agrotóxicos. O parágrafo 5º deste artigo é importante pois estabelece que o registro de produto novo só será possível se a ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente, for comprovadamente menor ou igual à daqueles compostos já registrados para o mesmo fim, ficando proibido o registro de agrotóxicos cujas características causem danos ao meio ambiente (alínea f).

A legislação demonstra claramente sua preocupação em proteger o ambiente e a saúde humana pois dispõe inclusive sobre a embalagem dos agrotóxicos, no sentido de impedir que ocorra qualquer problema de vazamento e consequente contaminação (art. 6º), além de estabelecer as normas e advertências que devem constar de rótulos de embalagens e propaganda comercial, informando sobre os riscos ambientais e contendo alertas para as pessoas que forem aplicar ou manipular os produtos (art. 7º e 8º).

A Lei 7.802 estabelece ainda que a venda dos agrotóxicos e afins só pode ser feita através de receituário próprio, prescrito por profissional legalmente habilitado (art. 13º) e dispõe também sobre a responsabilidade civil, administrativa e penal, pelos danos causados à saúde e ao ambiente, podendo ser responsabilizado o profissional, o usuário ou prestador de serviços, o comerciante, o registrador, o produtor ou o empregador, evidenciando desta maneira que todos os atores sociais possuem responsabilidades dentro do processo.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), tomou suas providências editando a Portaria Normativa nº84, de 15/10/96, dentre outras, estabelecendo os procedimentos e exigências para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins.

O artigo 21 desta portaria estabeleceu que os testes a serem desenvolvidos para avaliação de periculosidade ambiental deveriam seguir

as metodologias constantes do “Manual de Testes para Avaliação de Ecotoxicidade de Agentes Químicos do IBAMA”, editado em 1988. Atualmente empregam-se metodologias padronizadas e aceitas internacionalmente e os testes são realizados por laboratórios credenciados e/ou reconhecidos pelo Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO, demonstrando a seriedade com que o tema está sendo abordado pois há tentativa de se garantir a credibilidade e qualidade dos dados gerados.

Em 27/07/00 foi publicado no D.O.U. o Decreto nº 3.550 que regulamentou a Lei 9.974 (06/06/00), sobre a destinação final dos resíduos e embalagens de agrotóxicos, seus componentes e afins, além de fornecer instruções e informações que devem estar contidas nos rótulos e bulas orientando o usuário sobre o destino das embalagens. Deve-se ressaltar que este Decreto visou a proteção ambiental, pois estabeleceu diretrizes para a destinação final das embalagens de agrotóxicos, seus componentes e afins minimizando o risco de acidentes, intoxicações e contaminação ambiental; outro aspecto importante foi a responsabilização de diversos segmentos da sociedade em relação aos produtos tóxicos (fabricantes, transportadores, revendedores). Do ponto de vista de saúde pública, o descarte padronizado e embasado tecnicamente também são aspectos fundamentais para minimizar os riscos, resguardando a saúde e o meio ambiente, contemplados neste Decreto Federal. Assim, os agricultores, revendedores e fabricantes tinham prazo até maio de 2002 para se adequarem a esta nova

Lei que disciplinou a destinação final das embalagens (fonte: O Estado de São Paulo de 02/06/01).

Como já citado anteriormente, o fenômeno de globalização dos mercados está levando os países a procurar harmonizar suas legislações, porém para tornar este fato possível há que se rever as legislações de cada país membro, considerando e tentando minimizar também as diferenças em relação à capacitação técnico-científica; à disponibilidade de infra-estrutura laboratorial e recursos humanos; e, condições sócio-econômicas para possibilitar a ação conjunta. No nível do Mercosul as diferenças são muito grandes principalmente em relação às legislações nacionais e infra-estrutura para se realizar o controle e fiscalização de agrotóxicos e a legislação brasileira atua de maneira muito mais abrangente e completa. Além disto, ainda não há consenso para uma classificação ecotoxicológica regional harmonizada embora desde 1990 o Grupo Permanente de Produtos Fitossanitários (GTPP/PF) venha discutindo os critérios harmonizados para o Mercosul¹¹.

O desafio atual, portanto, é conseguir efetivar a harmonização da legislação de maneira a garantir o uso seguro, eficaz e econômico, com vistas a uma maior competitividade da produção agrícola da região, avançando num Sistema Regional de Registro. Há necessidade de se buscar um “modelo” que contemple as grandes diferenças econômicas, técnicas e culturais existentes com o objetivo de se salvaguardar a saúde humana e o meio ambiente.

1.2.3. A introdução de alguns agrotóxicos no Padrão de Potabilidade de Água como questão relevante para a saúde pública

A agricultura moderna alterou os processos de produção e solucionou vários problemas nos campos de cultivo, injetando nutrientes e energia sob a forma de fertilizantes; tentando controlar as pragas usando agrotóxicos; aumentando a produtividade empregando máquinas e irrigação, além de utilizar sementes geneticamente melhoradas; entretanto, gerou novos problemas a médio e longo prazo¹. Em condições naturais, a vegetação, os animais, os microrganismos, o solo e as águas estão em constante interação, constituindo um equilíbrio dinâmico do ecossistema. Em grande parte, esse equilíbrio é garantido pela reciclagem dos materiais e quase toda a produção do ecossistema é direcionada para suprir a teia ecológica envolvida e manter as condições químicas e físicas dos solos e das águas. A água age como importante agente de reciclagem de nutrientes, pois ao escorrer pelas folhas, galhos e troncos das árvores e culturas, carrega consigo aminoácidos, enzimas, ferro, zinco, fósforo, cloro, potássio, cálcio e outros nutrientes importantes que são absorvidos pelo solo, permitindo que quase todos esses nutrientes sejam reaproveitados pelas raízes¹. Assim, com o advento da agricultura, o homem passou a modificar o meio ambiente, interferindo nos processos ecológicos e alterando a reciclagem dos nutrientes, modificando as espécies e densidades dos vegetais e animais

predominantes numa dada área, provocando grandes modificações no ambiente local.

De acordo com dados publicados pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) das Nações Unidas, 70 a 80% de todo suprimento mundial de água superficial é utilizado nesta atividade humana¹⁰, sendo que no Brasil, cerca de 60% da demanda de água serve à irrigação¹. Além disto, a agricultura é a principal fonte de poluição não pontual dos corpos d'água, sendo tanto a causa como a vítima da poluição, pois com exceção da água perdida através da evapotranspiração, a água agrícola é retrorreciclada para águas superficiais e/ou subterrâneas. Assim, a agricultura é a causa através da descarga de poluentes e sedimentos nas águas, dos processos de erosão, salinização e alagamento de terras, devido às práticas agrícolas inadequadas. E, é sua vítima através do uso de água superficial e subterrânea poluídas que contaminam as plantações, podem transmitir doenças para os consumidores e trabalhadores agrícolas, e ocasionando diversos problemas ambientais¹⁰.

Os agrotóxicos podem entrar nos ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações. A lixiviação dos agrotóxicos através do perfil dos solos pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos^{2,7}, portanto, além de afetar os próprios cursos de água superficiais, eles podem alcançar os lençóis freáticos cuja descontaminação apresenta grande dificuldade. Existem casos de locais contaminados por aplicações de agrotóxicos feitas em outras áreas, em função dos ciclos hidrológicos. Assim, certas práticas

agrícolas ligadas ao modelo de produção predominante, como o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos, a destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não-preservação das matas ciliares e das vegetações protetoras de nascentes, dentre outros fatores, são responsáveis por grande parte dos problemas com os recursos hídricos¹.

1.3. USOS E ABUSOS DA ÁGUA NA ATUALIDADE

1.3.1. Importância, disponibilidade e demanda dos recursos hídricos – a agricultura e sua influência sobre a qualidade da água

O papel da água no desenvolvimento da civilização é reconhecido desde a mais alta antiguidade; Hipócrates (460-354 a.C.) já afirmava: “a influência da água sobre a saúde é muito grande”, sendo fundamental que a comunidade toda conte com água de qualidade adequada e em quantidade suficiente para todas as suas necessidades.

Embora sempre tenha sido apregoado que a água é um recurso ilimitado, devemos ressaltar que 99,3% da água do planeta encontra-se nos oceanos e calotas polares, inviabilizada para uso por motivos de ordem econômica e tecnológica, sendo que apenas 0,7% está disponível para toda a humanidade e entretanto, quase na totalidade localizada nos lençóis subterrâneos¹². Acrescente-se a isto o fato de que várias atividades antrópicas alteram sua qualidade e que, de acordo com dados da

Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% de todas as doenças que se alastram nos países do terceiro mundo são veiculadas pela água contaminada¹². Percebemos, assim, que as preocupações atuais quanto à disponibilidade e qualidade deste recurso, não são infundadas. Dos inúmeros usos que a água pode ter destacamos o abastecimento de populações, fins industriais, produção de energia elétrica, fins recreativos, navegação e fins agropecuários¹³.

Por seus inúmeros usos e pelo fato do homem interferir em seu ciclo natural, ela é alvo de alterações que estão tornando-a o centro das atenções em nível global, pois vem se transformando em fator limitante para muitas atividades humanas, servindo de veículo para várias doenças como cólera, febre tifóide, gastroenterites infantis, dentre outras. Além disto, o homem por suas múltiplas atividades, nela introduz substâncias das mais diversas naturezas alterando sua qualidade e quantidade.

Na década de 30, pretendia-se controlar e incentivar o aproveitamento industrial das águas e facilitar e garantir seu aproveitamento racional para geração de energia hidráulica, incentivando assim a urbanização e industrialização do país. Deste período há o Código de Águas (Decreto Federal nº 24.643, de 10/07/34), que possui vários aspectos importantes principalmente em relação à definição do domínio (público ou privado) e direito de uso das águas, outorga de concessão ou autorização para produção de energia. Entretanto, naquele momento ainda não se pensava na questão ambiental, na preservação da qualidade da água, em sua

abundância e na proteção dos ecossistemas aquáticos, havia apenas menção à preservação da qualidade original do corpo d'água.

Em concordância com o que ocorreu no caso dos agrotóxicos é a partir da década de 70 que temos leis, portarias e resoluções em nível federal e estadual que visavam controlar a concentração de determinados compostos tóxicos (como o mercúrio) na água, além de estabelecer normas para lançamento de efluentes líquidos tóxicos decorrentes de atividades industriais. Outras atividades causadoras de contaminação e/ou poluição aquática, como por exemplo a atividade de extração de ouro e o parcelamento do solo urbano, também contribuíram na edição de diplomas legais no sentido de solucionar alguns problemas específicos em função destas atividades humanas e, há crescente preocupação em relação aos problemas oriundos da degradação/poluição da água.

1.3.2. Contaminação da água e suas implicações para a saúde pública

Em meados do século XIX, John Snow, o pai da epidemiologia, concluía em seu estudo a existência de associação causal entre a epidemia de cólera que assolava Londres e o consumo de água contaminada por fezes de doentes¹⁴, comprovando que a qualidade ambiental possui estreita relação com a saúde humana.

Na atualidade, o Ministério da Saúde possui competência para normalizar estes aspectos, quase sempre com estreita relação com a

proteção ambiental, evidenciando a influência da qualidade do ambiente sobre a saúde pública. Assim, em relação à água, além do conhecimento técnico-científico existe o aparato legal editado na Portaria nº 1469 (de 29/12/00), que substituiu a Portaria nº 36 (19/01/90) e que estabeleceu o Padrão de Potabilidade de Água destinada ao consumo humano bem como os procedimentos e responsabilidades relativos ao seu controle e vigilância. As novas recomendações contidas nesta portaria estabeleceram os valores máximos permissíveis de vários compostos para as águas destinadas ao consumo humano, incluindo as características físicas, como odor, sabor e turbidez; características químicas, como componentes inorgânicos e orgânicos que afetam a saúde, onde incluem-se alguns agroquímicos; e, características organolépticas, onde se incluem componentes como alumínio, agentes tensoativos, cloretos, cobre, dureza total, zinco, dentre outros. As características bacteriológicas também são estabelecidas, sendo que coliformes fecais devem estar ausentes em 100mL de amostra. O local e a frequência de amostragem e os métodos analíticos a serem empregados também são estabelecidos nesta portaria. Esta nova versão do padrão de potabilidade é mais restritiva do que a anterior e inclui a pesquisa de cianobactérias (grupo conhecido anteriormente como algas cianofíceas ou algas azuis) e das toxinas por elas produzidas cujas presenças podem representar riscos à saúde humana, além de microrganismos que não eram contemplados anteriormente e têm importante significado para a saúde humana. Os parâmetros exigidos pelo Padrão de Potabilidade, em relação às substâncias químicas que representam riscos à saúde aumentou de 50

para 76. As alterações mais relevantes em relação aos parâmetros anteriormente estabelecidos são:

1- Definição dos deveres e responsabilidades em nível federal, estadual e municipal da qualidade da água para consumo humano;

2- Inclusão de mecanismos que possam impedir o uso de substâncias que, se presentes na água de consumo, mostram-se danosas à saúde humana;

3- Valorização dos direitos do consumidor por intermédio da divulgação de informações sobre a qualidade da água consumida;

4- Inclusão de definições de responsabilidades para os sistemas sob gestão pública ou privada, com relação ao fornecimento, captação, tratamento, controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano;

5- Retirada do rol de produtos a serem analisados, para detecção de resíduos, de alguns agrotóxicos que não são mais comercializados e outros proibidos para comercialização;

6- Inclusão na listagem de produtos a serem analisados, para detecção de resíduos, de agrotóxicos desenvolvidos mais recentemente e comercializados sem que existisse até o momento, a obrigatoriedade de seu controle por parte dos prestadores de serviços de abastecimento de água e a vigilância por parte do setor da Saúde;

No Estado de São Paulo, o controle da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público é atividade que compete à CETESB desde 1973 (Lei Estadual 118 de 29/06/73); entretanto, em 1969, tendo em

vista atender ao Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água preconizado pelo Ministério da Saúde, iniciou-se o monitoramento da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público¹². Aproximadamente, até a década de 80, os parâmetros bacteriológicos eram as grandes preocupações quando se falava em potabilidade de água, porém, em função dos inúmeros problemas ambientais e de contaminações em níveis agudos, os parâmetros e critérios foram sendo modificados, os padrões foram sendo revisados e incluíram-se inúmeros agrotóxicos, além de outros compostos químicos tóxicos. A Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) possui o Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI) e através da implantação do Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde, irá priorizar informações no campo da vigilância sanitária ambiental, de fatores biológicos, qualidade da água para consumo humano, contaminantes ambientais químicos e físicos que possam interferir na qualidade da água, ar e solo, e os riscos decorrentes de desastres naturais e de acidentes com produtos perigosos¹⁵.

1.4. A ÁGUA COMO VEÍCULO DE AGROTÓXICOS: UMA QUESTÃO AMBIENTAL E DE SAÚDE PÚBLICA?

1.4.1. Processos de interação entre os agrotóxicos e a água

Como já mencionado anteriormente, no passado os organismos indesejáveis à agricultura eram controlados através da aplicação de pequeno número de compostos inorgânicos à base de cobre e arsênico, além de alguns inseticidas de ocorrência natural como as piretrinas ^{4,13}. Até a II Guerra Mundial o desenvolvimento e uso efetivo de compostos orgânicos foi lento, porém, com a descoberta da propriedade inseticida do diclorodifeniltricloroetano, o DDT, iniciou-se a expansão e desenvolvimento característicos dos últimos 40 anos ^{4,5,11,12}.

Uma vez lançados no ambiente, os agrotóxicos podem alcançar o ambiente aquático através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações ^{2,4,5,6}, dentre outros processos (Figura 1). Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser destoxificados ou acumulados^{2, 4, 5, 6, 16}. Eles podem ser transportados através do sistema aquático por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos. Alguns agrotóxicos e/ou metabólitos podem também retornar à atmosfera por volatilização⁶. Assim, fica evidenciado que há uma interação

Figura 1 – Esquema dos mecanismos de transporte de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos. Adaptado de Nimmo, 1985.

contínua dos agrotóxicos entre sedimento e água, influenciada pelo movimento da água, turbulência e temperatura¹⁷. Desta interação, pode resultar inclusive um maior tempo de exposição dos organismos aquáticos aos compostos tóxicos. Portanto, na contaminação de águas superficiais, subsuperficiais e subterrâneas estão envolvidas propriedades dos agentes químicos e as variáveis ambientais¹⁶.

Na literatura internacional existem inúmeros estudos para determinar a presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas¹⁷⁻²¹ bem como estudos nacionais sobre os efeitos de herbicidas sobre organismos aquáticos^{22, 23}, enfatizando a preocupação que cerca o tema. Tais estudos muitas vezes envolvem compostos que ainda não são controlados pela legislação, mas que já são apontados como problemas em potencial para o ambiente e a saúde¹⁶.

Os agrotóxicos que estão presentes em corpos d'água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas portas e seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e especialmente de suas características físicas e químicas^{2, 4, 24}. Os peixes e invertebrados podem acumular os agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, pois estes compostos podem se ligar ao material particulado em suspensão e ser ingeridos¹³ pelos organismos aquáticos, dentre outros processos.

É possível fazer-se comparações entre diferentes compostos químicos de acordo com seu potencial cumulativo e esta informação

juntamente com outras variáveis, pode permitir estimar-se qual a concentração do composto químico representa um risco “aceitável” em um ambiente aquático²⁴.

Inúmeros compostos químicos, dentre eles os agrotóxicos, surgem no ambiente como micropoluentes e por estarem presentes em vários substratos do ecossistema apenas em níveis de concentração traço (de partes por 10^{12} a partes por 10^6) normalmente permanecem “indetectáveis” até que: a) tornem-se concentrados muitas vezes por magnificação biológica, ou b) tenham alguma manifestação física como as espumas dos detergentes e efluentes; ou c) produzam uma resposta fisiológica, como ocorreu por exemplo no caso do lacrimejamento provocado pelo *smog*²⁵.

Os agrotóxicos compreendem uma ampla variedade de substâncias com diferentes estruturas químicas e conseqüentemente, grandes diferenças no seu modo de ação, absorção, biotransformação e eliminação. Assim, sua capacidade de produzir efeitos tóxicos sobre a saúde humana e sobre o meio ambiente também varia muito ⁶.

1.4.2. Toxicidade aquática - Fatores que influenciam a toxicidade de compostos químicos

A toxicologia aquática pode ser definida como o estudo dos efeitos de compostos químicos e outros xenobióticos sobre os organismos aquáticos com ênfase especial nos efeitos adversos ou danosos^{4, 25}. Inúmeros testes

toxicológicos são utilizados para avaliar as concentrações e a duração da exposição a estes agentes químicos necessária para produzir um efeito pré-determinado, ou seja, um teste toxicológico é desenvolvido para mensurar o grau da resposta produzida por um nível específico de estímulo (concentração do composto em estudo)²⁶.

Os estudos em toxicologia aquática são qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos podem incluir tanto a letalidade (mortalidade) e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento. Os efeitos podem ser expressos através de critérios mensuráveis como o número de organismos mortos, porcentagem de ovos chocados, alterações no tamanho e peso, porcentagem de inibição de enzima, incidência de tumor, dentre outros. Além disto, a toxicologia aquática também está relacionada com as concentrações ou quantidades dos agentes químicos que podem ocorrer no ambiente aquático (água, sedimento ou alimento)^{4, 26}. A toxicidade de um composto químico depende da exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e de fatores ambientais. A exposição é o contato/reação entre o organismo e o composto químico, sendo que os fatores mais importantes relacionados à exposição são: o tipo, duração e frequência da exposição e a concentração do agente químico. Dependendo do tipo de exposição a toxicidade será afetada; por exemplo, os compostos hidrossolúveis estão mais prontamente disponíveis aos organismos do que aqueles mais lipofílicos que estarão

mais fortemente adsorvidos ou de alguma maneira ligados às partículas em suspensão, matéria orgânica ou sistemas biológicos. Assim, os agentes químicos mais hidrossolúveis podem penetrar num organismo através de toda a superfície do corpo e boca, enquanto os mais lipofílicos têm que ser ingeridos e absorvidos através do trato gastrintestinal²⁶.

A duração e a frequência da exposição dos organismos ao agente químico também afetará a toxicidade. Na exposição aguda, os organismos entram em contato com o composto químico num evento único ou em eventos múltiplos que ocorrem num pequeno período de tempo, geralmente variando de horas a dias. Nas exposições agudas onde o agente químico é rapidamente absorvido, normalmente os efeitos são imediatos, embora seja possível a produção de efeitos retardados similares àqueles resultantes de exposição crônica. Na exposição crônica normalmente os organismos são expostos a baixas concentrações do agente tóxico que é liberado continuamente ou com alguma periodicidade num longo período de tempo (semanas, meses ou anos). Exposição crônica a compostos químicos pode induzir a efeitos rápidos e imediatos como os efeitos agudos, em adição aos efeitos que se desenvolvem lentamente²⁶.

A frequência da exposição também afeta a toxicidade dos compostos químicos. Uma exposição aguda a uma única concentração pode resultar num efeito adverso imediato num organismo, enquanto duas exposições sucessivas cumulativas iguais à exposição aguda única podem ter efeito reduzido ou nenhum efeito, devido ao metabolismo (mecanismo de

destoxificação) do organismo entre as exposições ou à aclimação do organismo ao composto²⁶.

Como já mencionado, a toxicidade depende da suscetibilidade dos organismos ao composto químico. Diferentes espécies possuem suscetibilidades diferentes de acordo com seu aparato metabólico, de acordo com seus hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, dentre outros aspectos. Indivíduos jovens ou imaturos geralmente são mais suscetíveis aos agentes químicos do que adultos, provavelmente em função das diferenças no grau de desenvolvimento dos mecanismos de destoxificação. Organismos estressados em função de exposição prévia a outros toxicantes também podem ser mais suscetíveis aos compostos químicos, cenário comum na realidade dos ecossistemas, pois normalmente a presença de diferentes produtos é simultânea²⁶.

As características do composto químico também influenciam grandemente na toxicidade, como por exemplo sua composição, ou grau de pureza, pois impurezas ou contaminantes que muitas vezes são consideravelmente mais tóxicos do que o agente propriamente dito podem estar presentes. Assim, a identidade e a pureza dos compostos químicos são importantes nos testes de toxicidade. As propriedades físicas e químicas como solubilidade, pressão de vapor e pH, que afetam a biodisponibilidade, persistência, transformação, e o destino do agente químico no ambiente também são fatores importantes nos testes de toxicidade. Existem compostos químicos não seletivos em seu modo de ação e que provocam efeitos indesejáveis em numerosas células e tecidos dos organismos

aquáticos. Em contraste, há os compostos com modo de ação seletivo que afetam adversamente apenas um tipo de célula ou tecido, sendo inofensivo para os demais com os quais esteve em contato direto, assim, o modo de ação dos compostos químicos também afeta sua toxicidade²⁷.

Os fatores ambientais definidos pelas características bióticas e abióticas também podem alterar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático. Os fatores bióticos incluem o tipo de organismo (alga, inseto ou peixe), estágio de desenvolvimento (larva, juvenil, adulto), tamanho, estado nutricional e de saúde, alterações sazonais no estado fisiológico, dentre outros, sendo que estes fatores bióticos influenciam a resposta ao poluente de diferentes maneiras. Os fatores abióticos que podem atuar modificando a toxicidade incluem todas as características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo, como a temperatura, o pH, o teor de oxigênio dissolvido, a salinidade, a dureza, conteúdo de matéria orgânica e material particulado em suspensão, a velocidade do fluxo da água, dentre outros²⁷.

1.4.3. Problemas ambientais com agrotóxicos

Dentre os inúmeros casos de problemas ambientais já relatados pela literatura internacional, destaca-se o caso do DDT, inseticida organoclorado, o primeiro usado em larga escala a partir de 1945. Após 27 anos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.E.P.A.) banuiu seu uso²⁵ por

apresentar alta persistência no ambiente e ser bioacumulado e biomagnificado. NIMMO¹³ relata inúmeros casos de problemas ambientais com agrotóxicos e outras substâncias químicas como as bifenilas policlorados (PCB's) que também são compostos organoclorados, com estrutura química muito similar aos agrotóxicos DDT, dieldrin e aldrin. Os relatos incluem casos de contaminação da água e de organismos.

SPACIE & HAMELINK²⁴ também reportaram que a bioacumulação e biomagnificação de poluentes recebeu atenção pública pela primeira vez nos anos 60, com a descoberta de resíduos de DDT, DDD e de metil-mercúrio em peixes e animais silvestres. Problemas de mortalidade e de reprodução em peixes e pássaros que se alimentam de peixes foram relacionados às altas concentrações de DDT ou seus metabólitos encontradas no tecido adiposo destes animais. Como especialmente os pássaros que eram carnívoros estavam com as concentrações mais elevadas de resíduos do que o alimento (peixes) que ingeriram, era lógico postular que a acumulação havia ocorrido primariamente pela transferência através da cadeia trófica. Esta idéia apoiou-se indiretamente na observação dos resíduos de DDT que aumentavam passo a passo de um nível trófico para o próximo.

Inúmeros outros compostos já foram detectados em águas superficiais, em águas subterrâneas e de abastecimento²⁸⁻³², relacionando atividades urbanas e agrícolas com os casos de contaminação ambiental. De acordo com TEKEL & KOVACICOVÁ²⁸ na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos os herbicidas representam mais de 50% de todos os agrotóxicos usados e, portanto, não é de se surpreender que esta classe de

compostos contribuam de maneira tão significativa para a contaminação do ambiente, particularmente solo, águas superficiais e subterrâneas. Em água de abastecimento também já foram encontrados resíduos de herbicidas, principalmente a atrazina que é um herbicida triazínico. As triazinas são os herbicidas mais antigos e mais comumente usados, sendo responsáveis por cerca de 30% do mercado mundial de pesticidas. Mais recentemente as triazinas, especialmente atrazina, estão sendo gradualmente substituídas por herbicidas que apresentem risco ambiental menor²⁸.

AMARANENI & PILLALA³³ encontraram resíduos de vários agrotóxicos nas duas espécies de peixes usados como bioindicadores, coletados no lago Kolleru, Índia. Os resultados demonstraram que os peixes continham resíduos de agrotóxicos em níveis superiores aos padrões estabelecidos pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), constituindo-se em mais uma fonte de exposição dos habitantes da região aos agrotóxicos. Os resultados refletiram também o nível de poluição por estes compostos naquele lago bem como o perigo ao qual os habitantes estavam expostos ao consumirem os peixes contaminados.

Outro tipo de problema bastante comum é a exposição múltipla, isto é, exposição à mistura de agentes tóxicos. O emprego de misturas é conhecido como vantajoso em relação à aplicação de um único composto³⁴. As vantagens relatadas são: (a) aumento da eficiência contra os organismos alvo, (b) aumento da segurança para organismos não-alvo, (c) diminuição das quantidades aplicadas sem redução da eficiência e com quantidades menores de resíduos no meio ambiente, e, (d) custos reduzidos para o

material de aplicação³⁴. Entretanto, há equívocos em relação ao conceito de toxicidade de misturas pois esta não é resultante da soma das atividades tóxicas dos compostos. A mistura de diferentes agentes pode ocorrer inadvertidamente porque alguns compostos persistem por longos períodos no meio ambiente ou porque são aplicados repetidamente ou, como já citado, para melhorar a eficácia e diminuir os custos³⁴.

Existem dados sobre a toxicidade de misturas de inseticidas organofosforados³⁴ onde se observou aumento da toxicidade (sinergismo) quando comparada aos resultados de aplicações individuais. Há relatos também de exposições a múltiplos compostos químicos onde ocorreu antagonismo, pois a exposição a uma mistura de agentes químicos resultou em efeito menor do que o esperado pela exposição a cada composto individual³⁴. Assim, sinergismo e antagonismo são termos genéricos para os fenômenos que resultam da exposição a vários agentes químicos presentes no ambiente³⁴, entretanto, o grau de toxicidade não se resume simplesmente à soma das toxicidades individuais.

Estudo realizado nos Estados Unidos demonstrou ocorrência de efeito sinérgico com a aplicação dos herbicidas simazina e diuron, resultando em controle mais eficiente de ervas daninhas, comprovando desta maneira que o uso de misturas possui vantagens do ponto de vista agrônomo³⁵, entretanto, como ressaltado por TOMITA & BEYRUTH⁴ (2002), permanece a dúvida: o efeito sinérgico resultou em efeito tóxico mais severo apenas para os organismos-alvo?

A compreensão do conceito de toxicidade de misturas e o desenvolvimento da capacidade para calcular quantitativamente a toxicidade adicionada de misturas de agentes químicos podem ser ferramentas úteis para se determinar as vantagens e desvantagens do uso de misturas³⁴. ARAÚJO *et al.*³⁶ (2000), relataram em estudo realizado em Pernambuco, que a ocorrência de uso preventivo de agrotóxicos na cultura de tomate, gerou problemas como a necessidade de uso crescente de novos produtos e de emprego de misturas. Os autores também ressaltam que embora exista uma legislação nacional e normas regulamentando o uso e descarte de embalagens de agrotóxicos, a prática entre alguns agricultores locais ainda consiste em deixar as embalagens vazias ou restos de produtos espalhados pelo campo e que certamente esta prática resultará na contaminação das águas por agrotóxicos de diversas naturezas químicas, levando à exposição múltipla de todo o ecossistema aquático bem como do homem.

Embora existam vários estudos publicados em nível internacional quanto à toxicidade de agrotóxicos em ambiente aquático, o próprio IBAMA³⁶ destaca que há necessidade de se elaborar programas de integração, padronização, capacitação e divulgação de informações para subsidiar a detecção de poluição e de seus efeitos, pois a aplicação por várias instituições, de diferentes metodologias de análise e coleta dificultam a comparação de resultados e em última análise dificultam a proposição de ações de controle, gestão e planejamento dos recursos hídricos; além disto, estudos sobre a toxicologia de misturas de compostos químicos também necessitam ser incrementados.

1.5. O USO DE AGROTÓXICOS E A QUALIDADE DA ÁGUA

O ambiente deve sempre ser considerado na íntegra, entretanto, didaticamente, para facilitar sua compreensão e possibilitar o estudo dos processos que nele ocorrem, normalmente é compartimentado. Neste sentido pode-se dizer que o ambiente aquático é um dos compartimentos mais suscetíveis de ser contaminado pelos mais diversos compostos, dentre os quais destacam-se os agrotóxicos. Aproximadamente 6 milhões de substâncias químicas sintéticas são conhecidas e 63 mil são de uso cotidiano, podendo, portanto, ser encontradas no ambiente, sendo que 118 agentes químicos são considerados mundialmente como prioritários para efeito de controle³⁸.

É fácil verificar a necessidade de desenvolver legislação e mecanismos formais para controlar e avaliar o risco para a saúde e para o ambiente. Existem inúmeros modelos matemáticos e químicos que podem ser usados diretamente em investigações e também para análises de risco e perigo³⁹. Para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos dos agentes químicos para a biota aquática têm sido utilizados, nestas últimas décadas, testes com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, sob condições de campo e de laboratório³⁸ onde se verifica a toxicidade dos compostos. Estes testes possibilitam o estabelecimento de limites permissíveis para várias substâncias químicas e a avaliação do impacto destes poluentes sobre a biota dos recursos hídricos receptores. O

procedimento para determinar as concentrações aceitáveis de agentes químicos no ambiente é denominado avaliação de risco⁴⁰.

A análise de risco baseia-se na verificação da concentração esperada do contaminante no ambiente e a concentração que não causa efeito aos organismos, através dos testes de toxicidade acima citados. A capacidade de bioacumulação das substâncias químicas é um parâmetro importante usado na análise de risco⁴¹ e prever a bioacumulação através de medidas efetuadas em laboratório constitui-se em dado de grande importância nos esquemas de avaliação. Assim, de posse dos dados se verifica a probabilidade de ocorrência do risco e se tal risco é significativo. A avaliação de risco é de particular importância nos casos em que novas substâncias são sintetizadas, sendo necessário que a previsão de impacto dessas substâncias seja efetuada antes da comercialização dos produtos que as contenham⁴⁰. Assim, dependerá do julgamento científico avaliar se os dados gerados são suficientes para estabelecer uma razoável margem de segurança, entre as concentrações ambiental e de efeito de um agente químico, além de verificar a toxicidade devido às exposições múltiplas e/ou individuais a agrotóxicos e outros compostos químicos.

Considerando os aspectos citados e que na natureza normalmente o cenário que se tem, intencionalmente ou não, é a presença de mais de um agente químico simultaneamente, pode-se inferir que há possibilidade de alteração da toxicidade destes agrotóxicos no meio ambiente quando em misturas e que há necessidade de se verificar a toxicidade quando há exposição múltipla. Portanto, se apresenta a questão: O uso de agrotóxicos

em mistura no ambiente aquático representa nova perspectiva em toxicologia aquática? Quais seriam os reflexos na saúde pública?

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o aumento do uso de misturas de agrotóxicos, o padrão de emprego destes compostos está sendo alterado. Esta alteração poderá igualmente modificar a toxicidade de agrotóxicos em ambiente aquático. Considerando estes pressupostos, pode-se dizer que o uso de misturas de agrotóxicos pode caracterizar uma nova perspectiva para a análise de risco ambiental destas substâncias. Assim, colocam-se como objetivos do presente trabalho, os seguintes enunciados:

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a toxicidade de agrotóxicos em ambiente aquático quando empregados isoladamente e quando aplicados em mistura e a partir dos resultados analisar se a toxicidade de misturas de agrotóxicos constitui uma nova linha de pesquisa, necessária para ampliar o conhecimento atual na toxicologia aquática.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Verificar a toxicidade aguda de atrazina em alga e microcrustáceo.

2.2.2. Verificar a toxicidade aguda de diuron em alga e microcrustáceo.

2.2.3. Verificar a toxicidade aguda da mistura atrazina e diuron em alga e microcrustáceo.

2.2.4. Analisar comparativamente a toxicidade aguda dos compostos em estudo quando aplicados isoladamente e em mistura e discutir as implicações para a análise toxicológica e os possíveis reflexos sobre a saúde pública.

3. PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

3.1. COMPOSTOS

Segundo dados do *Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Defesa Agrícola (SINDAG)*⁴², o Brasil é o 10^o maior consumidor mundial de agrotóxicos (consumo de 3,2kg/ha), sendo o primeiro lugar ocupado pela Holanda (17,5kg/ha). De acordo com estimativas do SINDAG⁴², as vendas no setor, em 2003, garantiriam uma receita de aproximadamente US\$2,3 bilhões e em torno de 7.000 empregos diretos. Nos últimos 5 anos, acima de 50% do total de agrotóxicos comercializados no País eram herbicidas⁴². O presidente do SINDAG, em entrevista concedida em 02/09/03⁴², comentou que houve 88% de aumento das importações de herbicidas em relação a 2002 e afirmou que do total de agrotóxicos comercializados no País a cultura de soja é a maior consumidora (cerca de 38%), seguida pela cana-de-açúcar que consome aproximadamente 11,5% e pelo algodão (9%). A *Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF)*⁴³ relata que o Estado de São Paulo é o maior consumidor de agrotóxicos, totalizando aproximadamente 25% do total geral transacionado no país, sendo os produtos pertencentes à classe de herbicidas os mais vendidos. Analisando-se estes dados é possível verificar o significado dos herbicidas na atividade agrícola no Estado de São Paulo, destacando-se a cultura da cana-de-açúcar. No presente estudo, a escolha dos compostos se baseou nas indicações de uso para a cultura de cana-de-açúcar e pela importância desta cultura que cobre uma área superior a 3 milhões de hectares

só no Estado de São Paulo (Fonte: Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo).

Assim, serão empregados os herbicidas diuron (figura 2), cujo nome químico segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) é 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilouréia, e atrazina (figura 3) com nome químico (IUPAC) 6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamino ⁴⁴. Ambos agrotóxicos são autorizados atualmente pelo Ministério de Agricultura para uso em cana-de-açúcar, dentre outras culturas. Os compostos atrazina e diuron grau técnico (tabela 1), tiveram seus graus de pureza química superiores a 97%, confirmados pelo Laboratório de Química Ambiental do Instituto Biológico de São Paulo.

O diuron, herbicida derivado da uréia, pertence à Classe Toxicológica III-Medianamente Tóxico - possui persistência média no ambiente⁴⁵. Sua propriedade herbicida de inibidor da fotossíntese foi descrita em 1951⁴⁴ e atualmente seu uso agropecuário é autorizado para aplicação em pós-plantio e em pré e pós-emergência nas culturas de abacaxi e alfafa. O diuron pode ser empregado também na dessecação e desfolhamento na cultura do algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros e uva e ainda no plantio direto da soja, trigo e milho e, em canais de irrigação. O limite máximo de resíduos estabelecido para cana-de-açúcar é de 0,1ppm (partes por milhão) e o intervalo de segurança para esta cultura é de 150 dias ⁴⁵.

A atrazina é um herbicida do grupo das triazinas e também pertence à Classe Toxicológica III. Igualmente ao diuron, possui persistência média no ambiente. Segundo TOMLIN (2000)⁴⁴, sua ação herbicida foi relatada em 1957 e atualmente seu uso agropecuário é autorizado para aplicação em pré-plantio

Figura 2 – Fórmula estrutural do herbicida diuron.

Figura 3 - Fórmula estrutural do herbicida atrazina.

ou pré-emergência nas culturas de cana-de-açúcar, milho e sorgo. Nas culturas de abacaxi, sisal, coníferas, seringueira e roseira, seu uso é autorizado em pré e pós-emergência precoce das ervas daninhas. A tolerância em cana-de-açúcar é de 0,25ppm e por ser de uso desde a pré-emergência até atingir 30 a 40 dias, seu intervalo de segurança não é especificado⁴⁵. Ambos os ingredientes ativos não possuem autorização para uso domissanitário.

Tabela 1 – Características físico-químicas e dados toxicológicos dos herbicidas diuron e atrazina.

PARÂMETRO	DIURON	ATRAZINA
Fórmula molecular	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	$C_8H_{14}ClN_5$
Peso molecular	233,1	215,7
Ponto de fusão	158-159 °C	175-177 °C
Pressão de vapor (25 °C)	0,41mPa	0,04mPa
Solubilidade em água (20 – 25 °C)	36,4 mg/L	33 mg/L
DL ₅₀ oral aguda para ratos	3.400mg/kg	1.869-3.080 mg/kg
CL ₅₀ (96h) truta arco-íris	5,6 mg/L	4,5-11 mg/L
CL ₅₀ (96h) carpa	n.c.	76 mg/L
CL ₅₀ (24h) <i>Daphnia sp</i>	n.c.	87mg/L
CL ₅₀ (48h) <i>Daphnia sp</i>	12mg/L	n.c.
CE ₅₀ (72h) <i>S. capricornutum</i>	n.c.	0,13mg/L

Fonte: The e-Pesticide Manual: A World Compendium, Grã-Bretanha, 2000.

n.c. - Não consta.

3.2. ORGANISMOS-TESTE

Para se obter dados sobre os efeitos dos herbicidas atrazina e diuron na biota aquática, foram desenvolvidos testes de toxicidade com a alga verde *Selenastrum capricornutum* (Clorophyceae) e o microcrustáceo *Daphnia similis*

(Crustacea, Cladocera), cujas culturas são mantidas no Laboratório TECAM*, onde o trabalho foi desenvolvido.

Estes organismos-teste são aceitos internacionalmente para testes de toxicidade de agentes químicos, sendo que inúmeras organizações nacionais e internacionais de normalização possuem metodologias padronizadas com estes organismos²⁵. Além disto, representam dois níveis tróficos distintos do ambiente aquático. As algas são produtores primários e constituem elementos básicos na cadeia alimentar, transformando matéria inorgânica em orgânica; os consumidores primários representados pelo microcrustáceo *Daphnia similis*, componente do zooplâncton constituem importante elo entre os níveis tróficos inferiores e superiores da cadeia alimentar do ecossistema ⁴⁶.

A alga verde *Selenastrum capricornutum* (figura 4) tem sido amplamente utilizada em biotestes e pode ser encontrada em várias coleções de culturas⁴⁷. No *World Catalogue of Algae* há listas de culturas com mais de 25 linhagens cultivadas denominadas *S. capricornutum*⁴⁷. Esta alga já foi utilizada em testes de laboratório para avaliação da toxicidade de solventes orgânicos⁴⁸, em experimentos de campo para avaliar a toxicidade de herbicidas⁴⁹ e também já teve seu emprego avaliado para estudos de toxicidade de sedimentos⁵⁰, dentre outros.

Embora sua utilização em testes de toxicidade seja amplamente disseminada, o microcrustáceo *Daphnia similis* (figura 5) continua sendo alvo de estudos e reavaliações taxonômicas^{51, 52}; além disto também é amplamente

* TECAM – Tecnologia Ambiental Ltda. R. Fábria, 59. V. Romana – S.P.

empregado em estudos para se avaliar a toxicidade de efluentes industriais⁵³, bem como para verificação da eficiência de processos de tratamento de efluentes industriais⁵⁴. *Daphnia similis* é utilizado em estudos de toxicidade aguda e crônica de substâncias químicas⁵⁵ e na avaliação da toxicidade de sedimentos⁵⁶, demonstrando ser instrumento importante para inúmeros tipos de estudos e avaliações, com diversos tipos de matrizes ambientais e não apenas água.

Figura 4 - Foto da vista geral de *Selenastrum capricornutum*.

Figura 5 – Foto da vista geral de *Daphnia* sp.

3.3. TESTES DE TOXICIDADE

3.3.1. Teste de toxicidade com *Selenastrum capricornutum*

O teste de toxicidade com alga foi baseado no método da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR 12648 e OECD 201, com algumas modificações. O método consistiu em expor cultura axênica, ou seja, cultura monoespecífica de alga e isenta de contaminação microbiana, a várias concentrações dos compostos em estudo, sob condições controladas de laboratório, por período de 96 horas. O controle também foi efetuado, utilizando-se a cultura axênica de alga em meio de cultura, porém sem exposição aos compostos em estudo. Tal procedimento permitiu determinar-se a concentração efetiva inicial mediana, CE(I)50, 96h, ou seja, a concentração nominal da substância-teste presente no início do ensaio, que causou efeito (inibição do crescimento) a 50% dos organismos em 96 horas de exposição, nas condições de teste. Os regimes de exposição empregados foram:

- a) somente atrazina;
- b) somente diuron,e;
- c) simultaneamente aos dois herbicidas.

O teste de toxicidade com alga (*Selenastrum capricornutum*) foi conduzido em duas etapas; primeiramente desenvolveu-se a fase preliminar para se encontrar a faixa de concentração adequada para o desenvolvimento do teste e posteriormente a fase definitiva, onde os testes definitivos em cada regime de exposição foram conduzidos. O teste definitivo possibilitou a

determinação da CE(I)50, 96h, sendo que realizou-se dois ensaios preliminares para atrazina e diuron.

Os testes foram conduzidos nas dependências do Laboratório TECAM, que possui credenciamento junto ao INMETRO, através do programa de “Boas Práticas de Laboratório (BPL)”, atendendo, portanto, a todas as exigências para condução de testes de acordo com os critérios de rastreabilidade.

3.3.1.1. Condições Gerais do Teste

- a) O sistema-teste foi mantido durante as 96 horas do período experimental à temperatura de 25 ± 2 °C.
- b) Os frascos-teste foram mantidos em mesa agitadora com agitação constante de 100 a 175 rpm e sob iluminação contínua.
- c) A iluminação contínua foi efetuada com lâmpadas fluorescentes de intensidade entre 2.500 e 3.500 lux.
- d) O controle para cada teste foi preparado somente com meio de cultura e água desionizada estéril onde foi adicionado o inóculo inicial de algas.
- e) O preparo das soluções de agrotóxicos, preparo do inóculo de algas e a montagem do teste foram feitos em câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação da cultura algácea.
- f) Água desionizada estéril foi utilizada no preparo de soluções.

- g) A retirada de alíquotas diárias foi feita em câmara de fluxo laminar.
- h) A quantificação de alíquotas retiradas diariamente, foi efetuada em espectrofotômetro HACH DR/2000.

3.3.1.2. Preparo de soluções

3.3.1.2.1. Soluções-estoque

Os compostos foram pesados em balança analítica e as soluções-estoque dos agrotóxicos foram preparadas sempre no momento da realização do ensaio, em vidraria volumétrica e calibrada, diluindo-se os compostos em água desionizada estéril e utilizando-se pipetas e recipientes autoclavados. Foram relatados somente os procedimentos de preparo das soluções utilizadas nos testes definitivos. Nos ensaios preliminares e definitivos, todo procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, com exceção da pesagem dos produtos.

Para o preparo de solução-estoque de atrazina pesou-se 0,0025g do composto e diluiu-se em água em balão volumétrico de 250mL; a partir desta solução-estoque de concentração 10,0mg/L preparou-se as demais soluções-estoque em balão volumétrico de 100mL como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Preparo de soluções-estoque de atrazina com água desionizada estéril, em balões volumétricos de 100mL, feitas a partir da diluição da solução-estoque de 10mg/L, para o teste definitivo.

Conc. n ^o	Concentração nominal (mg/L)	Volume adicionado da solução-estoque (mL)
1	2,500	25,000
2	1,250	12,500
3	0,625	6,250
4	0,312	3,125
5	0,156	1,562

Para o preparo de solução-estoque de diuron pesou-se 0,0025g e diluiu-se em balão volumétrico de 250mL, resultando numa concentração 10,0mg/L. Tomando-se alíquotas desta solução-estoque preparou-se as demais soluções-estoque em balão volumétrico de 100mL, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Preparo de soluções-estoque de diuron com água desionizada estéril, em balões volumétricos de 100mL, feitas a partir da diluição da solução-estoque de 10mg/L, para o teste definitivo.

Conc. n ^o	Concentração nominal (mg/L)	Volume adicionado da solução-estoque (mL)
1	0,60	6,0
2	0,30	3,0
3	0,15	1,50
4	0,075	0,750
5	0,038	0,375

A solução-estoque da mistura dos herbicidas foi preparada em balão de 250mL com água desionizada estéril, pesando-se 0,0070g de atrazina e 0,0010g de diuron. A solução de maior concentração coincidia com a CE(l)50, 96h individual dos compostos para a alga e as demais concentrações foram preparadas a partir da diluição de alíquotas com diferentes volumes desta solução, conforme consta da tabela 4. Todas estas soluções-estoque foram preparadas em balões volumétricos de 100mL.

Tabela 4 – Preparo de soluções-estoque da mistura atrazina e diuron com água desionizada estéril, em balões volumétricos de 100mL, feitas a partir da diluição da solução-estoque de mistura 28,0mg/L atrazina e 4,0mg/L diuron, para o teste definitivo.

Conc.	Concentração nominal (mg/L)		Volume adicionado da solução- estoque (mL)
	Atrazina	Diuron	
A	0,700	0,100	6,250
B	0,350	0,050	3,125
C	0,175	0,025	1,563
D	0,0875	0,0125	0,7815
E	0,0437	0,0062	0,3908
F	0,0219	0,0031	0,1954

3.3.1.2.2. Preparo de soluções-teste

As soluções-teste foram preparadas em erlenmeyeres contendo 89,0mL de meio L.C. Oligo estéril (ANEXO 1), acrescido de 10mL de solução-estoque de agrotóxico e 1,0mL de inóculo de alga. Este sistema-teste foi então

colocado na mesa agitadora e mantido sob as condições de luminosidade e temperatura descritas, durante todo período experimental. Na tabela 5 estão as concentrações das soluções-teste às quais os organismos estiveram expostos durante o experimento.

Tabela 5 - Concentrações das soluções-teste dos herbicidas atrazina, diuron e mistura atrazina/diuron às quais cultura de alga *Selenastrum capricornutum* esteve exposta por 96 horas nos testes definitivos de toxicidade.

Conc. nº	Atrazina (mg/L)	Diuron (mg/L)	Mistura (mg/L)	
			Atrazina	Diuron
1	0,25	0,06	0,0022	0,0003
2	0,125	0,03	0,0044	0,0006
3	0,0625	0,015	0,0088	0,0012
4	0,0312	0,0075	0,0175	0,0025
5	0,0156	0,0038	0,0350	0,005
6	---	---	0,0700	0,010

3.3.1.3. Preparo do inóculo de algas

O inóculo de algas para o teste de toxicidade foi feito a partir da cultura de alga mantida no Laboratório TECAM, conforme consta do ANEXO 2. O inóculo inicial de cada teste foi quantificado em espectrofotômetro e sempre tinha densidade variando de 1 a 5×10^4 células/mL. O preparo do inóculo inicial foi efetuado em câmara de fluxo laminar, de acordo com as etapas descritas a seguir:

- 1- 100mL da cultura de alga foi centrifugada por 5 minutos a 3.200rpm.
- 2- O sobrenadante foi retirado e descartado.
- 3- Em seguida adicionou-se 25mL de solução de bicarbonato de sódio (15mg/L de água desionizada e estéril) para lavar as algas e centrifugou-se novamente a 3.200rpm por 5 minutos.
- 4- Retirou-se e descartou-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais duas vezes.
- 5- Adicionou-se 25mL de solução de bicarbonato de sódio à cultura de células de alga e homogeneizou-se por agitação.
- 6- Em seguida retirou-se alíquota de 1mL e adicionou-se em 89mL de meio L.C. Oligo acrescidos de 10mL de água desionizada. Desta mistura retirou-se alíquota de 2mL para quantificação do inóculo de alga em espectrofotômetro (HACH – DR/2000) com comprimento de onda 750nm, nas condições estabelecidas no TECAM (ANEXO 3), de acordo com sua “Curva de densidade celular x Absorvância” (ANEXO 3).

3.3.1.4. Sensibilidade da cultura algácea

De acordo com o procedimento estabelecido no Laboratório TECAM, mensalmente a sensibilidade da cultura é verificada através de testes de toxicidade com a substância de referência, dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), para o estabelecimento da “Carta-controle de Sensibilidade”. Para tanto, o valor da $CE(I)_{50; 96h}$ obtida deve estar compreendida num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie e substância. O teste é realizado com 5 concentrações de $K_2Cr_2O_7$ e durante o período em que todos os testes com atrazina e diuron foram desenvolvidos, a sensibilidade da cultura algácea esteve dentro dos padrões adequados para sua utilização.

3.3.1.5. Procedimentos do teste de toxicidade em *Selenastrum capricornutum*

- 1- Em erlenmeyeres de 250mL esterilizados com 89mL de meio L.C.Oligo, adicionou-se 10 mL da solução-estoque adequada, de maneira a se obter o volume total de solução-teste de 99mL.
- 2- Acrescentou-se 1mL do inóculo de alga com densidade variando de 1 a 5×10^4 células/mL. Para cada concentração e controle foram preparados três erlenmeyeres contendo as soluções-teste que tinham as concentrações descritas na tabela 5.
- 3- Os frascos foram agitados para homogeneização, tampados e distribuídos ao acaso na mesa agitadora. Diariamente, a posição dos

frascos na mesa foi alterada para minimizar as interferências no crescimento da cultura em função de diferenças de temperatura e luminosidade.

- 4- Diariamente, foram retiradas alíquotas de cerca de 2mL de cada erlenmeyer, para contagem do número de células e estabelecimento da curva de crescimento das culturas. A quantificação da densidade algácea foi efetuada por método indireto em espectrofotômetro e comprimento de onda de 750nm. Além do crescimento da biomassa algácea, foram anotadas diariamente as observações em relação ao crescimento, possibilitando uma avaliação qualitativa além da quantitativa.
- 5- Diariamente foram feitas medidas de temperatura da água e ambiente (máxima e mínima) e de luminosidade em 5 pontos da mesa agitadora, para controle das condições de teste.

3.3.1.6. Análises estatísticas

Calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle (biomassa relativa), através da subtração das biomassas obtidas após 96 horas de exposição (biomassa produzida) daquelas verificadas no tempo zero. O cálculo foi efetuado com a média das triplicatas de cada concentração.

A CE(I)50, 96h, foi estimada através de análise de regressão linear, utilizando o logaritmo das concentrações e a porcentagem de biomassa relativa, ou seja, a biomassa de cada concentração expressa como

porcentagem de inibição em relação ao controle (ABNT, 1992), o intervalo de confiança de 95% foi calculado através da equação descrita em CETESB (1990). Para a comparação da inibição do crescimento da cultura em cada concentração com o controle foram aplicados o teste-F e o teste-t⁵⁷.

3.3.1.7. Validação dos resultados

Os resultados foram considerados válidos, de acordo com os critérios estabelecidos pela ABNT (1992), quando ao término do ensaio, a densidade final de células, no controle, era superior a 10^6 células/mL.

3.3.2. Teste de toxicidade com *Daphnia similis*

A toxicidade com microcrustáceo *Daphnia similis* foi verificada empregando-se o Método ABNT NBR 12713 e OECD 211, modificados. O teste foi realizado em duas etapas: o teste preliminar para selecionar-se a faixa de concentração adequada para realizar o teste definitivo, e o teste definitivo, que possibilitou a determinação da concentração efetiva inicial mediana, capaz de causar a imobilidade em 50% dos organismos expostos aos compostos - CE(I)50, 48h. Para atrazina foram realizados 3 ensaios preliminares e para diuron apenas um foi suficiente para determinação da faixa de concentração adequada para o teste definitivo. Em ambas as fases, o procedimento foi

idêntico, diferindo apenas nas concentrações das soluções dos compostos empregados.

O teste consistiu em expor indivíduos jovens (idade de 6 a 24 horas) de *Daphnia similis* a diferentes concentrações dos agrotóxicos por 48 horas, nos mesmos regimes de exposição utilizados no teste de toxicidade em alga, ou seja, só atrazina, só diuron e a mistura dos dois compostos.

Para cada concentração preparou-se quatro réplicas, colocado-se 25mL de solução e acrescentando-se cinco organismos em béqueres de 30mL. Para cada teste, foi preparado controle somente com água de diluição e com o mesmo número de organismos, em quadruplicata. Durante o período do teste, os frascos foram mantidos em câmaras de incubação (D.B.O.), a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro e sem alimentação. Ao término do período de dois dias de exposição foi efetuada a leitura dos organismos imóveis de cada frasco, que possibilitou a determinação da CE(I)50, 48hs, após exposição aos agrotóxicos isoladamente e em mistura.

3.3.2.1. Manutenção do organismo-teste

A cultura dos organismos pertence ao Laboratório TECAM e sua manutenção e cultivo seguem os protocolos estabelecidos pelo Laboratório, com base em normas oficiais já citadas anteriormente (ANEXO 4).

3.3.2.2. Seleção dos organismos-teste

Os organismos-teste utilizados nos testes de toxicidade eram de idade variando de 6 a 24 horas. A seleção de jovens de *D. similis* era realizada 24 horas antes do início do teste. As culturas de fêmeas ovígeras eram isoladas com a remoção dos animais jovens do recipiente. O horário do isolamento sempre era anotado (ANEXO 4).

3.3.2.3. Preparo de soluções

O preparo de soluções-estoque foi feito empregando-se vidraria volumétrica e calibrada. Foram relatados somente os preparos das soluções dos testes definitivos (tabela 6). As soluções-estoque foram preparadas sempre no momento da realização dos ensaios. Os compostos, pesados em balança analítica, foram diluídos em água mole reconstituída (ANEXO 5), utilizada como água de diluição e quando se utilizou Tween-80, como dispersante, para solubilizar os herbicidas, empregou-se sempre concentração igual ou inferior a 0,01ml/L. Neste caso também foram preparadas amostras controle de Tween-80, para verificar se o dispersante estaria influenciando no resultado do teste de toxicidade. A concentração utilizada nas amostras controle de Tween sempre era equivalente à maior concentração presente na solução-teste mais elevada dos compostos. Na tabela 6 estão as concentrações utilizadas nos testes com atrazina, diuron e mistura (atrazina + diuron).

Tabela 6 – Concentrações das soluções-teste de atrazina, diuron, mistura atrazina e diuron e, Tween-80 empregadas nos testes definitivos de toxicidade com *Daphnia similis*.

Conc. nº	Atrazina (mg/L)	Diuron (mg/L)	Mistura (mg/L)	
			Atrazina	Diuron
Controle	0	0	0	0
1	12,50	0,156	0,1762	0,0117
2	25,00	0,312	0,3524	0,0235
3	50,00	0,625	0,7047	0,0470
4	100,00	1,25	1,4094	0,0940
5	200,00	2,50	2,8187	0,1875
6	400,00	5,00	5,6375	0,375
7	---	10,00	11,275	0,75
8	---	---	22,55	1,50
9	---	---	45,10	3,00
10	---	---	90,20	6,00
Tween-80	---	---	0,010mL/L	0,010mL/L
Tween-80	0,025mL/L	---	---	---
Tween-80	0,050mL/L	---	---	---

3.3.2.4. Procedimentos gerais do teste de toxicidade com *Daphnia similis*

As soluções-estoque foram preparadas em balões volumétricos de 250mL e 25mL de cada solução foram transferidos para béqueres de vidro, em 4 réplicas. O controle (25mL de água mole), também foi efetuado em 4 réplicas. O conjunto de béqueres (4 de cada concentração, 4 de controle e 4 de controle de Tween-80), foram mantidos por 40 minutos em câmara de incubação tipo D.B.O. com temperatura de 20 ± 1 °C, para aclimação.

Em outros frascos foram colocados aproximadamente 150mL de cada solução-estoque e colocados para climatização juntamente com os béqueres. Após este período, com auxílio de uma pipeta Pasteur, os jovens previamente selecionados para o teste foram aleatoriamente adicionados em cada frasco contendo 150mL de cada concentração, até completar 20 organismos em cada. Este procedimento visa minimizar a diluição das soluções-teste quando os animais são adicionados aos béqueres de teste contendo um volume tão pequeno de solução-teste (25mL).

Em seguida, cinco organismos foram transferidos a cada béquer contendo as soluções-teste, controle e controle de Tween-80, quando necessário. Após a adição dos organismos-teste, iniciou-se o teste e os béqueres permaneceram por 48 horas na câmara incubadora. Ao término do período de exposição, verificou-se o número de organismos imóveis e móveis de cada béquer. Animais capazes de nadar num intervalo de 15 segundos após uma agitação suave do béquer, foram considerados vivos e animais flutuantes foram considerados imóveis (mortos).

No início e no final do teste foram realizadas medições de pH, condutividade e teor de oxigênio dissolvido da água mole (água de diluição), para garantir que estes parâmetros estavam nas faixas adequadas à realização do teste.

3.3.2.5. Análises estatísticas

Com os dados de imobilidade dos organismos em cada concentração, a CE(I)50, 48h e seu intervalo de confiança 95% foram determinados através do método estatístico Spearman-Kärber, modificado⁵⁸.

3.3.2.6. Sensibilidade à substância de referência

Igualmente às algas, periodicamente a sensibilidade da cultura de *Daphnia similis* foi avaliada através de testes de toxicidade com a substância de referência, dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), para o estabelecimento da “Carta-controle de sensibilidade”. O valor de CE(I)50, 48h obtida deveria estar compreendido num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie e substância.

Para realização do teste foram empregadas cinco concentrações de $K_2Cr_2O_7$. No Laboratório TECAM, este teste era realizado mensalmente e preferencialmente, após cada nova coleta de água de manutenção (água

natural) e após a cultura estar aclimatada por no mínimo uma semana à nova água. Durante todo o período experimental, os organismos estiveram com sensibilidade adequada à sua utilização em ensaios de toxicidade.

3.3.2.7. Validação dos resultados

Os resultados foram considerados válidos, de acordo com os critérios estabelecidos pela ABNT(1993), quando no término do ensaio a porcentagem de organismos imóveis no controle não excedia 10% e o teor de oxigênio dissolvido era maior que 2mg/L.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de toxicidade com *Selenastrum capricornutum*

Como já mencionado no item 3.3.1., o teste de toxicidade com alga *Selenastrum capricornutum* foi conduzido em duas etapas, sendo a primeira fase preliminar para se encontrar a faixa de concentração adequada para o desenvolvimento da fase definitiva. Na etapa preliminar, foram conduzidos dois ensaios com atrazina e dois com diuron.

Cultura axênica foi exposta a várias concentrações dos compostos em estudo, sob condições controladas de laboratório, por período de 96 horas. Controle também foi efetuado, utilizando-se a cultura axênica de alga em meio de cultura, porém sem exposição aos compostos em estudo. Desta maneira foi possível determinar-se a concentração nominal da substância-teste presente no início do ensaio, que causou efeito (inibição do crescimento) a 50% dos organismos em 96 horas de exposição (CE(I)50, 96h) nas condições de teste. Os regimes de exposição empregados foram:

- a) somente atrazina;
- b) somente diuron, e;
- c) simultaneamente aos dois herbicidas.

Durante o desenvolvimento de todos os testes preliminares e definitivos, as condições (de luminosidade, temperatura, agitação) e o pH

das soluções-teste, foram monitoradas diariamente e se mantiveram sempre dentro dos limites estabelecidos e adequados para a condução dos ensaios.

4.1.1. Teste de toxicidade com *S. capricornutum* exposta ao herbicida atrazina

Nas tabelas 7 e 8 estão os resultados obtidos nos testes preliminares de toxicidade para *Selenastrum capricornutum*, após exposição ao herbicida atrazina. Os resultados obtidos com a leitura de alíquotas das culturas expostas a diferentes concentrações de atrazina (Tabela 7) confirmaram as observações efetuadas dos efeitos sobre o crescimento das culturas, onde desde o início da exposição mesmo à menor concentração foi verificado efeito de inibição do crescimento, quando comparado ao crescimento das amostras controle.

Nas concentrações utilizadas no primeiro teste preliminar com atrazina (tabela 7) em todas as amostras ocorreu a formação de grumos de algas visíveis após 72 horas de exposição, fato não observado nas réplicas de controle, que não tiveram seu crescimento alterado, como pode ser observado na tabela 7. Devido à ocorrência de inibição do crescimento da cultura de alga mesmo na menor concentração testada, foi necessário realizar outro teste preliminar.

Tabela 7 – Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* (x 10⁴ células/mL) expostas a cinco diferentes concentrações do herbicida atrazina, por 96 horas (inóculo inicial de 5 x 10⁴ cél./mL), no primeiro teste preliminar.

Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	5	23	62	122	188
0,94	5	5	4	2	3
1,88	5	8	2	2	2
3,75	5	5	4	5	2
7,50	5	4	2	3	1
15,00	5	4	3	2	1

a- Média de amostras em triplicata.

Conforme consta da tabela 8, as concentrações empregadas no segundo teste preliminar com atrazina foi a partir da menor concentração utilizada no primeiro teste preliminar sendo as demais concentrações calculadas com base em fator 0,5.

Os resultados obtidos no segundo teste preliminar com atrazina (tabela 8), possibilitaram a determinação da faixa de concentração a ser utilizada no teste definitivo. Como pode ser observado, no segundo teste preliminar a amostra controle apresentou crescimento normal. De acordo com as análises estatísticas (testes F e t) as amostras expostas ao herbicida tiveram seu crescimento inibido a partir da concentração 0,06mg/L sendo que a partir de 0,50 mg/L a inibição foi muito severa. Estes resultados estavam sempre de acordo com as observações efetuadas ao longo da realização do ensaio, quando foram observados grumos de alga após 48 horas de exposição a partir da concentração 0,125mg/L. Após análise dos dados obtidos neste teste, foi estabelecida a faixa de concentração para o teste definitivo, variando de 0,0156mg/L a 0,250mg/L.

Tabela 8 – Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas ao herbicida atrazina em cinco diferentes concentrações, por 96 horas (inóculo inicial de 5×10^4 cél./mL), no segundo teste preliminar.

Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	5	28	84	124	185
0,062	5	11	25	46	79
0,125	5	14	24	21	31
0,250	5	11	14	6	17
0,500	5	7	0	3	4
1,00	5	11	9	5	4

a- Média de amostras em triplicata.

A tabela 9 relata os resultados obtidos no teste definitivo de alga *Selenastrum capricornutum* exposta a cinco concentrações do herbicida atrazina.

Tabela 9 – Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas a cinco diferentes concentrações do herbicida atrazina, por 96 horas (inóculo inicial de 5×10^4 cél./mL), no teste definitivo.

Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	5	31	105	226	411
0,0156	5	25	67	157	401
0,0312	5	24	57	143	402
0,0625	5	17	31	62	221
0,125	5	9	22	31	83
0,250	5	4	16	20	33

a- Média de amostras em triplicata.

Os dados obtidos no teste definitivo de toxicidade de atrazina com cultura de alga demonstraram que a partir da solução-teste com concentração 0,0625mg/L o efeito deletério sobre o crescimento algáceo pode ser observado após 24 horas de exposição e ao final do período de 96 horas, nesta concentração, o crescimento algáceo foi praticamente 50%

menor do que no controle. Os dados de observação diária das culturas corroboraram os resultados obtidos pela quantificação das mesmas em espectrofotômetro. Assim, nas amostras controle observou-se crescimento da biomassa algácea, enquanto nas amostras expostas, a partir da concentração 0,0625mg/L este crescimento era sempre inferior, tendo sido comprovado estatisticamente através dos testes F e t.

Figura 6 - Representação gráfica do crescimento de cultura algácea de *Selenastrum capricornutum* exposta a cinco diferentes concentrações de atrazina por período de 4 dias, sob condições de laboratório, no teste definitivo de toxicidade.

A figura 6 é a representação gráfica dos dados contidos na tabela 9 e com estes dados calculou-se a CE(1)50, 96h do herbicida atrazina para a alga *Selenastrum capricornutum*. O crescimento das culturas algáceas foi considerado diferente do controle nas concentrações 0,0625mg/L, 0,1250mg/L e 0,2500mg/L, após a análise estatística (testes F e t).

A concentração nominal efetiva de atrazina presente no início do ensaio, que causou efeito agudo, isto é, inibição do crescimento a 50% dos organismos em 96 horas de exposição, nas condições aqui descritas foi calculada como sendo 0,07mg/L, com limite inferior de 0,032 mg/L e o superior de 0,16mg/L (intervalo de confiança de 95%).

Na figura 7 está representada graficamente a diminuição da biomassa relativa (%) proporcionalmente ao aumento da concentração do herbicida atrazina na solução-teste ($\log_{10}$ da concentração expressa em mg/L), quando comparada ao controle. O coeficiente de correlação (r^2) calculado foi 0,9660 comprovando a existência da relação dose-efeito.

Figura 7 – Representação gráfica da diminuição da biomassa algácea após exposição de 96 horas às diferentes concentrações do herbicida atrazina, comparada ao controle.

4.1.2. Teste de toxicidade com *S. capricornutum* exposta ao herbicida diuron

Para o teste de toxicidade do herbicida diuron as soluções-estoque foram preparadas de acordo com o item 3.3.1.2.1. e as condições gerais para condução do teste foram controladas e diariamente monitoradas, tendo permanecido dentro dos limites descritos no item 3.3.1.1.

Na tabela 10 e 11 estão os resultados dos testes preliminares de toxicidade de diuron sobre o crescimento algáceo. No primeiro teste preliminar (tabela 10) as amostras controle tiveram crescimento normal, porém nas demais concentrações os resultados obtidos foram atípicos, pois

nas concentrações intermediárias houve crescimento enquanto nas menores e nas maiores concentrações ocorreu inibição do crescimento. Diante dos dados obtidos foi necessária a realização de outro teste preliminar.

Tabela 10 - Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas ao herbicida diuron em cinco diferentes concentrações, por 96 horas (inoculo inicial de 1×10^4 cél./mL), no primeiro teste preliminar.

Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	1	2	17	46	122
0,02	1	2	2	8	20
0,04	1	0	1	0	2
0,08	1	2	17	48	135
0,16	1	2	17	54	123
0,32	1	2	1	2	4

a- Média de amostras em triplicata.

Na tabela 11 estão os resultados do segundo teste preliminar de toxicidade do diuron sobre a cultura de alga *S. capricornutum*. Neste teste, nas amostras controle não foi observado efeito, enquanto nas demais ocorreu inibição do crescimento. Na menor concentração do herbicida (0,0156mg/L) não há diferença estatisticamente significativa, embora numericamente exista diminuição de aproximadamente 50%. A partir da concentração 0,0312mg/L até a solução-teste mais concentrada (0,250mg/L) a inibição foi significativamente diferente do controle, quando se aplicou os testes F e t., o que comprovou a ocorrência da inibição do crescimento algáceo.

Tabela 11 - Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas ao herbicida diuron em cinco diferentes concentrações, por 96 horas (inóculo inicial de 5×10^4 cél./mL), no segundo teste preliminar.

Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	5	34	94	203	272
0,0156	5	15	27	52	142
0,0312	5	14	22	34	74
0,0625	5	5	18	15	22
0,125	5	4	5	8	8
0,250	5	8	8	2	6

a- Média de amostras em triplicata.

Com a realização destes dois testes preliminares foi possível definir-se a faixa de concentração para o teste definitivo de toxicidade do diuron sobre a alga. Na tabela 12 estão resumidos os dados deste teste definitivo onde as concentrações variaram de 0,0038mg/L a 0,0600mg/L, sendo que as concentrações intermediárias diferiram uma da outra num fator de 0,5.

Tabela 12 - Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas ao herbicida diuron em cinco diferentes concentrações, por 96 horas (inóculo inicial de 2×10^4 cél./mL), no teste definitivo.

Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle	2	12	32	99	204
0,0038	2	9	22	81	183
0,0075	2	1	13	50	107
0,0150	2	12	14	31	66
0,0300	2	1	7	11	10
0,0600	2	2	4	3	3

a- Média de amostras em triplicata.

Os resultados obtidos mostraram que nas amostras controle não ocorreu inibição do crescimento, porém a partir da concentração 0,0075mg/L o efeito ocorreu, pois ao aplicar os testes F e t demonstrou-se que havia

diferença significativa no crescimento das amostras quando comparadas ao controle.

A Figura 8 é a representação gráfica dos resultados obtidos (tabela 12) e com estes dados foi possível estimar-se a concentração nominal efetiva do herbicida diuron, presente no início do teste, capaz de provocar inibição de 50% no crescimento algácea após 96 horas de exposição da cultura de alga ao composto.

Figura 8 - Representação gráfica do crescimento de cultura algácea de *Selenastrum capricornutum* exposta a cinco diferentes concentrações de diuron por período de 4 dias, sob condições de laboratório, no teste definitivo de toxicidade.

A CE(I)50, 96h de diuron para a alga *Selenastrum capricornutum* foi estimada em 0,01mg/L. Considerando o limite de confiança de 95% o limite inferior foi calculado em 0,004mg/L enquanto o limite superior em 0,023mg/L. Na figura 9 está a reta resultante da análise de regressão linear da biomassa relativa com o logaritmo da concentração. O r^2 calculado resultou em 0,971, indicando que há correlação entre a concentração da solução-teste e a inibição do crescimento da cultura algácea.

Figura 9 – Representação gráfica da diminuição da biomassa algácea após exposição às cinco diferentes concentrações do herbicida diuron, por 96 horas, comparada ao controle.

4.1.3. Teste de toxicidade com *S. capricornutum* exposta à mistura dos herbicidas atrazina e diuron

Para verificar a toxicidade da mistura dos herbicidas atrazina e diuron preparou-se uma solução contendo os dois compostos, como descrito no item 3.3.1.2. O teste preliminar desenvolvido com a mistura dos herbicidas resultou em inibição do crescimento superior a 80% quando as culturas algáceas foram expostas à menor concentração (0,175mg/L de atrazina e 0,0250mg/L de diuron). O teste foi repetido e incluiu-se mais uma diluição da mistura. Na tabela 13 estão os resultados do teste preliminar de toxicidade, onde culturas de *S. capricornutum* estiveram expostas a cinco soluções de diferentes concentrações da mistura dos herbicidas atrazina e diuron.

Tabela 13 - Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas à mistura dos herbicidas atrazina e diuron em cinco diferentes concentrações, por 96 horas (inóculo inicial de 2×10^4 cél./mL), no teste preliminar.

Concentração (mg/L)		Tempo de exposição (horas)				
		0	24	48	72	96
Controle		1	12	31	87	146
Atrazina	Diuron					
0,0875	0,0125	1	2	13	39	58
0,175	0,0250	1	1	6	12	29
0,350	0,050	1	2	8	17	8
0,700	0,100	1	0	14	13	8
1,400	0,200	1	1	11	14	2

a- Média de amostras em triplicata.

Os resultados demonstraram que não ocorreu inibição do crescimento nas amostras controle, entretanto, em todas as amostras expostas à mistura dos herbicidas o crescimento foi inibido. Na concentração mais baixa

(0,0875mg/L de atrazina e 0,0125mg/L de diuron) a inibição do crescimento foi de aproximadamente 60%, quando comparada ao controle e na concentração mais elevada (1,400mg/L de atrazina e 0,200mg/L de diuron) a inibição foi muito grande, pois desde o início do experimento não ocorreu crescimento.

Em função dos resultados obtidos no teste preliminar, para o teste definitivo da mistura de atrazina e diuron, foram preparadas seis concentrações, conforme descrito no item 3.3.1.2.2. (Tabela 5). Como pode ser observado, as concentrações dos dois herbicidas, em mistura, foram bem inferiores às empregadas nos testes individuais e as concentrações diferiram entre si num fator 0,5.

Na tabela 14 estão resumidos os resultados do teste definitivo de toxicidade com *S. capricornutum* após exposição à mistura de atrazina e diuron, por 96 horas, sob condições controladas. Os resultados indicaram que nas amostras controle não houve inibição do crescimento algáceo ao longo do período experimental, comprovando que as condições de desenvolvimento do teste estavam adequadas. Como observado na tabela 14, na mistura denominada F, de maior concentração (0,0700mg/L de atrazina e 0,0100mg/L de diuron) a inibição do crescimento, ou seja, o efeito, foi muito severo quando comparado ao controle. Nas demais concentrações, conforme diminuía a concentração dos herbicidas na mistura, a severidade do efeito também decrescia, sendo que, aplicando-se os testes F e t houve diferença significativa até a concentração denominada D (0,0175mg/L de atrazina e 0,0025mg/L de diuron).

Tabela 14 - Concentração celular^a em culturas de *Selenastrum capricornutum* ($\times 10^4$ células/mL) expostas à mistura dos herbicidas atrazina e diuron em seis diferentes concentrações, por 96 horas (inóculo inicial de 1×10^4 cél./mL), no teste definitivo.

Concentração (mg/L)			Tempo de exposição (horas)				
			0	24	48	72	96
Controle			1	17	59	132	225
	Atrazina	Diuron					
A	0,0022	0,0003	1	2	27	53	95
B	0,0044	0,0006	1	11	63	160	213
C	0,0088	0,0012	1	4	36	78	161
D	0,0175	0,0025	1	1	21	29	66
E	0,0350	0,0050	1	2	20	18	35
F	0,0700	0,0100	1	1	13	5	8

a- Média de amostras em triplicata.

A figura 10 representa graficamente os resultados da tabela 14, onde é possível visualizar o crescimento da biomassa algácea. As concentrações das misturas dos herbicidas em ordem crescente, estão representadas pelas letras A, B, C, D, E e F, conforme consta da tabela 14.

Na figura 10 observa-se que na concentração denominada B, ou seja, na segunda menor concentração da mistura (0,0044mg/L de atrazina e 0,0006mg/L de diuron) praticamente não houve efeito, pois o crescimento algáceo acompanhou o crescimento das amostras controle durante todo o período experimental. Resultado anômalo foi observado na menor concentração (curva A na Figura 10), que apresentou efeito mais intenso, com diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle. Este fato provavelmente ocorreu em função de algum aspecto que não inclui o procedimento experimental nem a concentração dos herbicidas na mistura. O coeficiente de correlação (r^2) entre as biomassas relativas e o logaritmo das concentrações calculado através da análise de regressão linear foi 0,73 (Figura 11).

Para a realização do cálculo das concentrações nominais efetivas presentes no início do teste da mistura dos herbicidas, capaz de causar 50% de efeito (inibição do crescimento algáceo) sobre *S. capricornutum*, as concentrações foram individualizadas. Desta forma a CE(I)50, 96h calculada, com intervalo de confiança de 95%, para atrazina foi 0,0084mg/L (limite inferior 0,0006 e limite superior 0,13mg/L) e para o diuron a CE(I)50, 96h calculada foi de 0,0012mg/L (limite inferior 0,0001mg/L e limite superior 0,02mg/L).

Figura 10 - Representação gráfica do crescimento de cultura algácea de *Selenastrum capricornutum* exposta a seis diferentes concentrações da mistura dos herbicidas atrazina e diuron por período de 4 dias, sob condições de laboratório, no teste definitivo de toxicidade.

Figura 11 – Representação gráfica da diminuição da biomassa algácea após exposição às seis diferentes concentrações da mistura dos herbicidas atrazina e diuron, por 96 horas, comparada ao controle.

4.2. Teste de Toxicidade com *Daphnia similis*

O teste de toxicidade com *Daphnia similis* foi realizado em duas etapas conforme descrito no item 3.3.2. Na etapa preliminar foram realizados dois testes com atrazina e um com diuron, para definir-se a faixa de concentração para os testes definitivos e assim proceder a estimativa da concentração efetiva inicial mediana, CE(I)50, 48h, após exposição aos agrotóxicos nos regimes:

- a) somente atrazina;
- b) somente diuron; e,
- c) mistura de atrazina e diuron.

As condições para a realização do teste foram descritas no item 3.3.2.4., foram monitoradas por todo o período experimental e estiveram dentro dos limites estabelecidos durante a realização dos testes. A sensibilidade dos organismos (item 3.3.2.6.) também foi monitorada e sempre esteve adequada para sua utilização em testes de toxicidade.

4.2.1. Teste de toxicidade com *D. similis* exposto ao herbicida atrazina

No teste de toxicidade de atrazina com microcrustáceo *D. similis*, foram preparadas as soluções-estoque nas concentrações que constam da

tabela 15 para realização do primeiro teste preliminar de toxicidade. As concentrações diferem entre si num fator de 0,1.

Nas replicatas do controle do primeiro teste preliminar (Tabela 15) não ocorreu imobilidade, indicando que os organismos estavam adequados para sua utilização no teste, embora tenha ocorrido 55% de imobilidade nas amostras onde os organismos estiveram expostos à solução de Tween-80. Nas demais concentrações também não ocorreu imobilidade. Na concentração mais alta observou-se 100% de imobilidade, que pode ser parcialmente atribuída à presença do dispersante Tween-80 nesta concentração, em função destes resultados, houve necessidade de conduzir-se outro teste preliminar, diminuindo-se a faixa de concentração do teste.

Tabela 15 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a cinco soluções de diferentes concentrações do herbicida atrazina, por 48 horas, no primeiro teste preliminar de toxicidade.

Concentração (mg/L)	n ^o organismos imóveis	n ^o total de organismos	Imobilidade (%)
Controle	0	20	0
Tween 0,01mL/L	11	20	55
0,01	0	20	0
0,1	0	20	0
1,0	0	20	0
10,00	0	20	0
100,00	20	20	100

Os resultados do segundo teste preliminar estão resumidos na tabela 16, quando os organismos estiveram expostos a soluções de atrazina variando de 100,00mg/L a 6,25mg/L, diferindo entre si num fator de 0,5.

Os resultados obtidos indicaram que a concentração que causaria 100% de imobilidade estava acima da mais alta concentração utilizada,

assim, foi necessário realizar-se outro teste para que fosse possível o cálculo da CE(I)50, 48h. As amostras controle e de Tween-80 não apresentaram imobilidade, comprovando que os organismos estavam adequados para serem empregados nos testes e que as condições experimentais também estavam adequadas.

Tabela 16 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a cinco soluções de diferentes concentrações do herbicida atrazina, por 48 horas, no segundo teste preliminar de toxicidade.

Concentração (mg/L)	n ^o organismos imóveis	n ^o total de organismos	Imobilidade (%)
Controle	0	20	0
6,25	0	20	0
12,50	1	20	5
25,00	5	20	25
50,00	3	20	65
100,00	15	20	75

Na tabela 17 estão os resultados obtidos no teste definitivo de toxicidade de atrazina para *D. similis*. Neste teste as concentrações diferiram num fator de 0,5 , variando de 12,50mg/L a 400,00mg/L. O preparo das soluções foi efetuado de acordo com o descrito no item 3.3.2.3. Os resultados obtidos permitiram o cálculo da CE(I)50; 48h de atrazina para *Daphnia similis*, através do método estatístico de Spearman-Kärber.

Tabela 17 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a seis soluções de diferentes concentrações do herbicida atrazina, por 48 horas, no teste definitivo de toxicidade.

Concentração (mg/L)	n ^o organismos imóveis	n ^o total de organismos	Imobilidade (%)
Controle	0	20	0
12,50	0	20	0
25,00	14	20	70
50,00	19	20	95
100,00	20	20	100
200,00	20	20	100
400,00	20	20	100

Apenas nas réplicas do controle, onde os organismos estavam expostos à água mole reconstituída e na concentração mais baixa de atrazina não ocorreu imobilidade. Nas demais amostras, conforme houve aumento da concentração, a imobilidade também aumentou.

Na figura 12 está a representação gráfica do efeito (imobilidade) em relação ao logaritmo das diferentes concentrações (mg/L) do herbicida atrazina, após 48 horas de exposição.

Figura 12 – Representação gráfica da imobilidade (%) do microcrustáceo *Daphnia similis* exposto a seis diferentes concentrações (mg/L) do herbicida atrazina, por 48 horas, sob condições laboratoriais, no teste definitivo.

As condições experimentais (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, e condutividade) foram monitoradas e se mantiveram dentro dos limites exigidos durante o desenvolvimento do ensaio. A sensibilidade de *D. similis* também esteve dentro dos limites exigidos para sua utilização em teste de toxicidade. Assim, os resultados obtidos permitiram o cálculo da CE(I)50; 48h sendo 22,53mg/L com intervalo de confiança de 95%, sendo o limite inferior 19,25mg/L e o limite superior 26,37mg/L.

4.2.2. Teste de toxicidade com *D. similis* exposto ao herbicida diuron

As soluções para a realização do teste de toxicidade de diuron com *D. similis* foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.3.2.3. As condições de realização do teste e a sensibilidade dos organismos foram monitoradas e estiveram sempre de acordo com os critérios estabelecidos e descritos nos itens 3.3.2.4. e 3.3.2.6.

Como já mencionado, foi conduzido um teste preliminar com diuron para definir-se a faixa de concentração adequada para a realização do teste definitivo de toxicidade e desta maneira proceder-se o cálculo da CE(I)50, 48h. Os resultados do teste preliminar de diuron estão resumidos na tabela 18.

Tabela 18 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a cinco soluções de diferentes concentrações do herbicida diuron, por 48 horas, no teste preliminar de toxicidade.

Concentração (mg/L)	nº organismos imóveis	nº total de organismos	Imobilidade (%)
Controle	0	21	0
0,040	1	21	5
0,156	0	20	0
0,625	2	22	9
2,50	9	22	41
10,00	22	22	100

Os resultados obtidos mostraram que as condições de realização do teste bem como os organismos selecionados estavam adequados para o teste de toxicidade pois nas réplicas de controle não ocorreu imobilidade. Na menor concentração testada (0,040mg/L) ocorreu imobilidade em 5% dos organismos, enquanto na concentração imediatamente superior (0,156mg/L) não foi observada imobilidade. Entretanto, este fato não invalidou o teste pois nas réplicas de controle o limite de 10% de imobilidade não foi

ultrapassado, indicando que as condições de realização do teste e dos organismos estavam adequadas. Este fato também destaca a necessidade e importância de sempre haver réplicas de controle. Nas demais concentrações a imobilidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de diuron. Neste teste preliminar a diferença de uma concentração para outra foi de um fator de 0,25. Como a faixa de concentração estava adequada, realizou-se mais um experimento nesta mesma faixa de concentração, porém diminuindo a diferença de uma concentração para outra, aplicando-se fator 0,5.

Na tabela 19 estão os resultados obtidos com o teste definitivo de toxicidade do herbicida diuron com *D. similis*, a partir dos quais foi possível, empregando-se o método estatístico de Spearman-Kärber, estimar-se a concentração nominal efetiva presente no início do teste e que foi capaz de causar a imobilidade em 50% dos organismos expostos.

Como pode ser observado, nas réplicas de controle e na menor concentração (0,156mg/L) não ocorreu imobilidade. Nas demais concentrações utilizadas, o efeito (imobilidade) foi se intensificando proporcionalmente ao aumento da concentração da solução do herbicida, sendo que a partir de 5,00mg/L o efeito era máximo pois 100% dos organismos estavam imóveis após o período de exposição.

A CE(I) 50, 48h de diuron estimada foi de 1,486mg/L com intervalo de confiança de 95%, sendo o limite inferior 1,202mg/L e o limite superior 1,837mg/L.

Tabela 19 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a sete soluções de diferentes concentrações do herbicida diuron, por 48 horas, no teste definitivo de toxicidade.

Concentração (mg/L)	nº organismos imóveis	nº total de organismos	Imobilidade (%)
Controle	0	20	0
0,156	0	20	0
0,312	2	20	10
0,625	2	20	10
1,250	4	20	20
2,50	17	20	85
5,00	20	20	100
10,00	20	20	100

A figura 13 representa graficamente os resultados obtidos no teste definitivo de toxicidade de diuron ao microcrustáceo *D. similis*, relacionando o efeito de imobilidade (%) com o logaritmo da concentração do herbicida diuron na solução-teste (mg/L). Na representação gráfica destacou-se o aumento do efeito de 20% para 85% quando as concentrações aumentaram num fator de 0,5 indo de 1,25mg/L a 2,50mg/L.

Figura 13 – Representação gráfica da imobilidade (%) do microcrustáceo *Daphnia similis* exposto a sete diferentes concentrações (mg/L) do herbicida diuron, por 48 horas, sob condições laboratoriais.

4.2.3. Teste de toxicidade com *D. similis* exposto à mistura dos herbicidas atrazina e diuron

As soluções para a realização do teste de toxicidade de mistura de atrazina e diuron com *D. similis* foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.3.2.3. As condições de realização do teste bem como a sensibilidade dos organismos foram monitoradas e estiveram sempre de acordo com os critérios estabelecidos e descritos nos itens 3.3.2.4. e 3.3.2.6.

Os resultados do primeiro teste preliminar estão resumidos na tabela 20 e indicaram que a faixa de concentração da mistura deveria ser superior àquelas empregadas pois não houve efeito nem na solução de concentração mais elevada que continha 90,1252mg/L de atrazina e 10,1880mg/L de diuron. Embora a amostra de Tween-80 com concentração de 0,01mL/L tenha resultado em 15% de imobilidade, este resultado não invalidou o teste preliminar pois não foi observado efeito em nenhuma amostra, assim como nas réplicas de controle. Desta forma, foi necessária a realização do segundo teste preliminar, cujos resultados estão na tabela 21.

Tabela 20 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a cinco soluções de diferentes concentrações da mistura dos herbicidas atrazina e diuron, por 48 horas, no primeiro teste preliminar de toxicidade.

Concentração (mg/L)		n ^o organismos imóveis	n ^o total de organismos	Imobilidade (%)
Controle		0	20	0
Tween 0,005mL/L		0	20	0
Tween 0,01mL/L		3	20	15
Atrazina	Diuron			
5,6408	0,7431	0	20	0
11,2819	1,4863	0	20	0
22,5637	2,9726	0	20	0
45,1275	5,9452	0	20	0
90,1252	10,188	0	20	0

No segundo teste preliminar, a faixa de concentração utilizada foi acima daquela utilizada no primeiro teste preliminar, tendo variado de 90,1252mg/L a 1442,0032mg/L de atrazina e de 10,188mg/L a 163,008mg/L para o diuron, diferindo entre si num fator de 0,5. Os resultados deste teste

estão na tabela 21 e como pode ser observado todas as concentrações foram extremamente tóxicas, causando 100% de imobilidade. As réplicas de controle demonstraram que as condições de realização do teste estavam adequadas.

Tabela 21 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a cinco soluções de diferentes concentrações da mistura dos herbicidas atrazina e diuron, por 48 horas, no segundo teste preliminar de toxicidade.

Concentração (mg/L)		nº organismos imóveis	nº total de organismos	Imobilidade (%)
Controle		0	20	0
Tween 0,08mL/L		2	20	10
Tween 0,16mL/L		1	20	5
Atrazina	Diuron			
90,1252	10,188	20	20	100
180,2504	20,376	20	20	100
360,5008	40,752	20	20	100
721,0016	81,504	20	20	100
1442,0032	163,008	20	20	100

Para o teste definitivo utilizou-se 10 concentrações diferentes da mistura de atrazina e diuron que variou conforme consta da tabela 22. Com os resultados obtidos para a mistura, procedeu-se os cálculos da CE(I)50; 48h, porém, para realização dos cálculos os dados de concentração dos herbicidas foram individualizados. Assim, quando presentes nas misturas testadas a CE(I)50, 48h de atrazina foi 12,512mg/L, enquanto para o diuron foi de 0,832mg/L.

As réplicas de controle não apresentaram efeito e comprovaram que as condições laboratoriais estavam adequadas para o desenvolvimento do ensaio, bem como as amostras expostas ao Tween-80 na concentração 0,01mL/L, embora tenha ocorrido 5% de imobilidade (Tabela 22). Esta porcentagem de imobilidade, entretanto, não invalidou o teste pois encontrava-se abaixo de 10% que foi o limite estabelecido para o teste.

A figura 14 representa graficamente a relação do logaritmo das concentrações das misturas testadas com a porcentagem de imobilidade. Pode-se observar que ocorreu aumento da imobilidade com o aumento da concentração da mistura e que entre a sétima (11,275 mg/L de atrazina + 0,750mg/L de diuron) e oitava (22,50mg/L de atrazina + 1,50mg/L de diuron) concentrações da mistura há incremento significativo da toxicidade (de 25% para 75% de imobilidade), enquanto o aumento da concentração foi num fator de 0,5. A partir da concentração 9 (45,10mg/L de atrazina e 3,0mg/L de diuron) ocorreu 100% do efeito tóxico.

Tabela 22 – Imobilidade (%) dos microcrustáceos *Daphnia similis* expostos a dez soluções de diferentes concentrações da mistura dos herbicidas atrazina e diuron, por 48 horas, no teste definitivo de toxicidade.

Conc. n°	Concentração (mg/L)		n° org. imóveis	n° total de org.	Imobilidade (%)
	Controle		0	20	0
	Tween 0,01mL/L		1	20	5
	Atrazina	Diuron			
1	0,1762	0,0117	0	20	0
2	0,3523	0,0234	1	20	5
3	0,7047	0,0469	0	20	0
4	1,4094	0,0938	2	20	10
5	2,8188	0,1875	2	20	10
6	5,6375	0,3750	2	20	10
7	11,275	0,750	5	20	25
8	22,55	1,50	15	20	75
9	45,10	3,00	20	20	100
10	90,20	6,00	20	20	100

Figura 14 – Representação gráfica da imobilidade (%) do microcrustáceo *Daphnia similis* exposto a dez diferentes concentrações (log10 mg/L) da mistura dos herbicidas atrazina e diuron, por 48 horas, sob condições laboratoriais, no teste definitivo.

5. DISCUSSÃO

Concordando com o comentário do artigo especial de FORATTINI⁵⁹, o presente estudo foi norteado pelo espírito da “busca permanente de soluções, de idéias e de fatos e de formulação de hipóteses explicativas”, na tentativa de se encontrar o conhecimento passível de ser utilizado para a melhora constante da qualidade de vida do homem. Em concordância com a opinião deste autor, no campo da saúde pública as atividades são caracteristicamente multidisciplinares, ou seja, é imprescindível o “concurso de variadas áreas de estudo”, se não na condução do estudo em si, ao menos na maneira de se abordar o tema. Assim, desejamos que a abordagem do tema (embora este seja específico) revele nosso trabalho de maneira que seja palatável e interessante às variadas áreas do conhecimento.

De acordo com CAIRNS⁶⁰, alguns anos após a II Guerra Mundial ocorreu aumento da preocupação com a condição ecológica dos sistemas naturais, especialmente devido às descargas de origem industrial nos E.U.A. e assim, a motivação de ordem prática, ou seja: tentar determinar se uma descarga industrial em particular estava danificando o ambiente, conduziu ao interesse pela toxicologia ambiental e conseqüente desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Este mesmo autor, em sua análise critica os testes de toxicidade com espécies individuais e o fato de servirem como instrumentos para validar métodos e credenciar laboratórios,

pois considera que os testes com espécies individuais, a validação de métodos e o credenciamento de laboratórios não são requisitos suficientes para a proteção efetiva dos ecossistemas. Entretanto, não se pode negar que estes testes são muito utilizados para monitorar a qualidade ambiental quando há exposição às mais diversas substâncias (efluentes industriais, efluentes domésticos, metais pesados, dentre outras), bem como para fins de regulamentação e se constituem em instrumento valioso para a proteção ambiental.

Na década de 80 o gênero *Daphnia* já era amplamente utilizado para avaliação de toxicidade de agentes químicos, pois além de ser facilmente mantido em laboratório, possui sensibilidade a diferentes grupos de compostos químicos⁶¹ além de desempenhar papel importante no fluxo energético da cadeia trófica em sistemas aquáticos⁶¹. Inúmeros trabalhos relatam estudos, diagnósticos, monitoramentos ambientais e avaliação de estações de tratamento de efluentes industriais com este organismo^{62 - 68}, demonstrando as inúmeras aplicações possíveis dos testes de toxicidade com organismos aquáticos.

No caso dos agrotóxicos, de acordo com a lei 7.802 de 11/07/89, testes de toxicidade com vários organismos são exigidos para análise de seu potencial de periculosidade ambiental, para concessão (ou não) de registro junto aos órgãos federais competentes, possibilitando sua comercialização no território nacional.

Em nosso estudo, a alga *Selenastrum capricornutum* e o microcrustáceo *Daphnia similis* foram expostos aos herbicidas atrazina e

diuron, individualmente, e aos dois compostos simultaneamente, em mistura. Os resultados obtidos demonstraram que a alga *Selenastrum capricornutum* sempre foi mais sensível do que o microcrustáceo *Daphnia similis*, independente do composto. Este fato provavelmente se deu porque os dois compostos são herbicidas inibidores da fotossíntese, além disto, as espécies respondem diferentemente quando isoladas das outras espécies, sendo isto apontado como um dos pontos fracos dos testes de toxicidade⁶⁰.

Na literatura existem inúmeros estudos onde foram utilizados organismos aquáticos para avaliar a toxicidade de agrotóxicos pertencentes a diferentes classes químicas. Os resultados do estudo sobre os efeitos do inseticida organofosforado fenitrothion no crescimento de cinco espécies de algas fitoplanctônicas e uma cianobactéria permitiram concluir que houve ampla variação na sensibilidade dentre as espécies ao fenitrothion e que o inseticida estudado foi menos perigoso do que o herbicida atrazina, dentre outros⁶⁹. Os resultados obtidos por SABATER & CARRASCO⁶⁹ também indicaram que há diferenças de sensibilidade entre as cinco espécies de algas expostas ao inseticida organofosforado fenitrothion, pois o crescimento da espécie *Scenedesmus acutus* foi inibida em concentrações de 0,40mg/L a 2,5mg/L, enquanto para a espécie *Chlorella vulgaris* exposta a concentração de 4,6mg/L, não foram observados efeitos significativos sobre a taxa de crescimento algáceo. As diferenças de sensibilidade entre inúmeros organismos-teste incluindo algas, invertebrados, microrganismos e peixes expostos a 18 diferentes ésteres ftálicos também foram

demonstradas em artigo de revisão que compilou dados de toxicidade crônica e aguda⁷⁰.

Plantas aquáticas (*Lemna gibba*) foram utilizadas para avaliar o efeito tóxico de inibição da fotossíntese causada pelo herbicida diuron e seus metabólitos principais⁷¹, através da medida da fluorescência. Neste estudo, as alterações no padrão de fluorescência de *L. gibba* foram causadas pela exposição a diferentes concentrações de diuron e seus metabólitos, indicando que não apenas os compostos em si, mas também seus produtos de degradação podem apresentar toxicidade e comprometer a qualidade do ambiente aquático. Comunidades estuarinas foram expostas a coquetel de atrazina e simazina, sob condições de laboratório para verificar a hipótese de que um sistema bem balanceado seria mais suscetível aos distúrbios, mas que em seguida ocorreria redução dos níveis de herbicida devido à alta atividade metabólica específica da comunidade⁷². O estudo concluiu que o sistema costeiro em questão não foi capaz de atuar como tampão para este tipo de poluição e que, portanto, não ocorreria redução ou modificação dos herbicidas que seriam então, transportados para o Mar Báltico⁷².

A variação de sensibilidade entre as espécies é fato já observado em inúmeros trabalhos e se constitui numa das razões para realizar-se testes com diversas espécies. Também foi muito oportuna a avaliação do teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, realizado por BERTOLETTI, NIPPER & MAGALHÃES (1992)⁷³, onde se concluiu que este se constitui num método analítico fidedigno, pois a precisão analítica interlaboratorial expressa pelo coeficiente de variação (C.V.) foi de 14,4% nos testes

utilizando o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), o que indicou boa precisão do método⁷³.

Os resultados obtidos demonstraram que os dois herbicidas estudados foram tóxicos tanto para *Selenastrum capricornutum* como para *Daphnia similis*, sendo o diuron mais tóxico do que a atrazina para ambos os organismos. Conforme consta da tabela 23, que resume os resultados obtidos, o diuron foi 7 vezes mais tóxico para a alga do que a atrazina, pois a CE(I)50; 96 horas estimada para o diuron foi 0,01mg/L enquanto para atrazina foi 0,07mg/L. Em relação ao microcrustáceo, com os resultados obtidos em nosso estudo a CE(I)50; 48h de atrazina foi 22,53mg/L e de diuron foi estimada em 1,49mg/L, indicando que o diuron foi aproximadamente 15 vezes mais tóxico do que a atrazina, após exposição individualizada aos compostos.

Estes resultados concordam com os obtidos em outro estudo⁷⁴, onde algas unicelulares e ciliados foram expostos a diferentes compostos e o diuron foi mais tóxico do que atrazina para a alga *Scenedesmus subspicatus*. Este estudo também demonstrou que o ciliado *Tetrahymena pyriformis* foi menos sensível do que as algas aos agentes tóxicos estudados, novamente demonstrando a variação de sensibilidade entre organismos de diferentes espécies.

Em outro estudo⁶⁹ a atrazina foi considerada mais tóxica do que o inseticida fenitrothion e piridafention a cinco espécies diferentes de algas planctônicas⁶⁹, o que pode ser explicado pelo fato de atrazina ser herbicida inibidor de fotossíntese. Em estudo de herbicidas triazínicos⁷², também

Tabela 23 – CE(I)50, 96h para *Selenastrum capricornutum* e CE(I)50, 24h para *Daphnia similis*, após exposição dos organismos aos herbicidas atrazina e diuron, individualmente ou em mistura.

Composto	CE(I)50, 96h <i>S. capricornutum</i> (mg/L)	CE(I)50, 24h <i>D. similis</i> (mg/L)
Atrazina	0,07	22,53
Diuron	0,01	1,49
Mistura	Atrazina	0,0084
	Diuron	0,0012

foram citados outros autores que demonstraram os efeitos de atrazina sobre a fotossíntese de inúmeras espécies de algas, além de variações na suscetibilidade específica em função de diferenças de espécies e mesmo de linhagens dentro de uma mesma espécie. Sob a ótica da bioquímica atrazina

e diuron afetam a fotossíntese pois bloqueiam o transporte de elétron no fotossistema II (PSII), bloqueando assim, o fluxo de elétrons^{71, 72}; provavelmente o modo de ação dos dois compostos sobre a alga *Selenastrum capricornutum* se dê de maneira bem similar, causando assim a inibição do crescimento da cultura.

No ensaio onde a alga *Selenastrum capricornutum* e o microcrustáceo *Daphnia similis* foram expostos à mistura de atrazina e diuron, a solução com a mistura cuja concentração coincidia com a CE(I)50 individual dos compostos para alga foi a solução de maior concentração utilizada e a partir desta, foram preparadas mais 5 soluções de misturas (tabela 14), diferindo entre si num fator de 0,5. Assim, quando a alga foi exposta individualmente, a CE(I)50, 96h de atrazina estimada foi 0,07mg/L e de diuron foi 0,01mg/L, enquanto no teste da mistura, esta foi a solução mais concentrada. Fica evidenciado desta forma, que a toxicidade da mistura dos herbicidas para alga foi bem superior à toxicidade estimada para cada composto individualmente.

A CE(I)50, 96h calculada, com intervalo de confiança de 95%, para atrazina foi 0,0084mg/L e para o diuron foi de 0,0012mg/L. Diuron continuou sendo mais tóxico do que atrazina para *S. capricornutum*, entretanto, quando presentes em mistura a toxicidade de diuron e de atrazina foram cerca de 10 vezes maior do que quando presentes individualmente.

No teste de toxicidade para *Daphnia similis*, a CE(I)50, 48h estimada para atrazina foi 22,53mg/L e para diuron foi 1,49mg/L, demonstrando que o diuron foi novamente mais tóxico do que atrazina. Para o teste definitivo com

a mistura dos dois herbicidas, foram testadas 10 concentrações diferentes, que variaram conforme consta da tabela 22. Igualmente aos cálculos para alga, nos cálculos da CE(I)50, 48h, os dados de concentração dos herbicidas foram individualizados. Assim, quando presentes nas misturas testadas a CE(I)50, 48h de atrazina foi 12,51mg/L, enquanto para o diuron foi de 0,83mg/L. Com os resultados obtidos, foi possível verificar que a toxicidade de atrazina e diuron para o microcrustáceo se potencializou quando em mistura, ficando cerca de 50% superior, quando comparada às toxicidades individuais dos herbicidas estudados.

Embora ainda não haja consenso em relação aos testes para se avaliar a toxicidade de misturas, vários autores já abordaram este tema e desenvolveram estudos com agrotóxicos utilizando inúmeras espécies. Em estudo realizado com larvas do mosquito *Chironomus tentans*, expondo-as ao herbicida atrazina em mistura binária ou terciária com outros inseticidas organofosforados, foi observado efeito sinérgico em inúmeras combinações testadas⁷⁵. Em outro estudo, o efeito tóxico observado para a mistura do inseticida organofosforado diazinon com amônia foi menor do que aquele estimado pelo CE50 dos dois compostos individualmente⁷⁶, demonstrando que efeito antagônico também pode ocorrer. Através de combinação binária dos herbicidas triazínicos atrazina e cianazina com o inseticida organofosforado clorpirifós, foi comparado o efeito tóxico das misturas com o efeito dos compostos individualmente, sobre *Chironomus tentans*⁷⁷, tendo resultado em efeito sinérgico. Neste estudo⁷⁷ foi discutido o mecanismo hipotético da atrazina como facilitador da absorção e da biotransformação de

clorpirifós em metabólito mais tóxico, o que explicaria a relação dose-dependente entre a concentração do herbicida e a porcentagem de mosquitos afetados pelo clorpirifós.

Anfípoda *Hyaella azteca* e o inseto *Musca domestica*, foram utilizados em estudo para verificar a toxicidade da mistura de atrazina com inseticidas organofosforados em combinações binárias⁷⁸. Este estudo demonstrou que ocorreu efeito sinérgico, ou seja, o efeito tóxico observado foi sempre maior quando os anfípodas foram expostos às misturas do que quando foram expostos aos compostos individualmente (o aumento foi de 1,6 ; 1,7 e 2 vezes, após exposição à atrazina em mistura com o clorpirifós, metil-paration e diazinon, respectivamente)⁷⁸. Outro aspecto destacado neste estudo é que a toxicidade dos organofosforados foi significativamente aumentada nos anfípodas que haviam tido contato prévio com atrazina, ou seja, antes da exposição ao inseticida fosforado. Contrariamente, para o mosquito *M. domestica* não ocorreu aumento da toxicidade após exposição às misturas, provavelmente porque atrazina não foi capaz de ativar o complexo enzimático responsável pela biotransformação dos inseticidas organofosforados, evitando desta maneira, a transformação em metabólitos mais tóxicos, ou ainda porque houve ativação das isoenzimas responsáveis pela detoxificação, minimizando os efeitos⁷⁸. Num estudo que verificou a toxicidade aguda da mistura de diazinon e cobre a *Ceriodaphnia dubia*, foi demonstrado que embora o efeito não tenha sido sinérgico, é importante notar que a toxicidade da mistura sempre foi maior do que a toxicidade de cada composto individualmente⁷⁹, representando aspecto importante do

ponto de vista da toxicologia ambiental e para análise de risco⁷⁹. O herbicida atrazina foi intensamente utilizado na agricultura e a probabilidade de estar presente no ambiente simultaneamente com outras substâncias é muito alta, o que justifica o fato de ter sido objeto de vários estudos.

A presença simultânea de duas ou mais substâncias pode alterar as propriedades físicas e químicas dos componentes como a solubilidade (dentre outras) e afetar a biodisponibilidade e/ou as respostas⁸⁰. Como ressaltado por ALTENBURGER, NENDZA & SCHÜÜRMANN⁸⁰ análise da ação de misturas é de interesse de várias áreas do conhecimento como na farmacocinética, fitofarmacologia, carcinologia, toxicologia ambiental e toxicologia aquática, pois a ação conjunta pode ocorrer de variadas maneiras. Estes autores⁸⁰ relatam que normalmente compostos com modos de ação similares atuam como se fossem diluições um do outro e que combinações de substâncias diferentes podem revelar respostas estatisticamente independentes. Assim, o efeito após exposição à mistura pode ser sem interação, ou com interação em termos qualitativos ou quantitativos (antagonismo ou sinergismo).

Com relação à toxicidade os contaminantes podem afetar mutuamente não apenas a cinética das interações entre os compostos tóxicos e seus alvos (absorção, distribuição e excreção), mas também o metabolismo (biotransformação) e a biodisponibilidade, alterando o transporte e a distribuição, bem como as propriedades de membranas, de enzimas metabólicas ou competindo nas reações de conjugação⁸⁰. A toxicidade resultante de uma mistura pode ser aditiva, mas apenas se os

processos principais forem equivalentes e se eles não se alterarem na presença de outros compostos⁸⁰. Considerando estes aspectos, a ação tóxica aditiva (sinérgica) observada para a mistura de atrazina e diuron no estudo aqui desenvolvido poderia ser explicada. Entretanto, substâncias com modos de ação diferentes, podem interagir aditivamente, dentro de certos limites⁸⁰.

ALTENBURGER, NENDZA & SCHÜÜRMAN⁸⁰ em seu trabalho evidenciam a falta de consenso em relação às metodologias e em relação às maneiras de se compreender e prever os mecanismos de ação de misturas. Transportando a temática da toxicidade de misturas presentes em efluentes industriais para o campo de misturas de agrotóxicos, há outro aspecto que ainda não é consensual e diz respeito à abordagem para avaliação e controle de agentes tóxicos, ou seja, a abordagem deve ser sob a ótica das substâncias químicas específicas presentes na mistura ou sob a ótica da toxicidade global da mistura? As vantagens e desvantagens destas abordagens foram discutidas por outros autores^{66, 81}. Assim, a análise da toxicidade da mistura como um todo permite verificar o efeito tóxico conjunto de todas as substâncias presentes na mistura e avaliar a disponibilidade biológica bem como as interações entre os constituintes. Como desvantagem pode-se apontar a falta de dados e conhecimento para se tentar reduzir a toxicidade e desconhecimento dos processos operantes^{66, 81}. Na abordagem através de substâncias específicas as vantagens apontadas referem-se à disponibilidade de dados para sistemas ou estratégias de tratamento, possibilidade de realizar-se análises químicas (nos casos mais

simples) que podem ser menos dispendiosas do que testes para avaliação da toxicidade e a possibilidade de controle direto de substâncias carcinogênicas ou que são bioacumuláveis. Como desvantagens da abordagem através de substâncias específicas, foram apontados o fato de que as substâncias tóxicas presentes em misturas mais complexas dificilmente podem ser identificadas na sua totalidade e portanto, não se poderia estabelecer exigências de controle para cada uma; além deste, outro aspecto apontado como desvantagem desta abordagem diz respeito à impossibilidade de se determinar a disponibilidade biológica dos agentes tóxicos e as interações que ocorrem^{66, 81}.

Fica evidente que é problemático generalizar-se sobre o grau de interação de diferentes compostos sob as condições de exposição simultânea quando fatores como efeitos da matriz, contaminantes em diferentes proporções, e diferentes espécies precisam ser considerados^{76, 79}. É fundamental e urgente determinar-se portanto, o grau de interação através de métodos empíricos, além de se obter melhores modelos empíricos^{75, 76, 79}, pois como já citado anteriormente, a toxicidade resultante da exposição simultânea pode ser muito discrepante, dependendo dos organismos e compostos utilizados⁷⁸. Retomando às nossas colocações no início da Discussão, o emprego dos testes de toxicidade com espécies individuais foi objeto de análise⁸², e embora haja certo grau de incerteza, este tipo de teste é instrumento útil e eficiente para prever os efeitos sobre comunidades aquáticas. Tais incertezas são causadas por fatores como variabilidade no habitat, hidrologia, qualidade da água, toxicidade dos efluentes,

comunidades biológicas e os resultados dos testes com espécies individuais⁸². Entretanto, é vital que se esclareça o papel das contribuições relativas de cada um destes fatores e seus potenciais para causar previsões de falsos positivos e falsos negativos. Outro ponto destacado neste estudo é que as incertezas existentes não invalidam estes testes para fins de monitoramento e regulamentação⁸², sendo fundamentais os estudos de avaliação da sensibilidade dos organismos e da precisão analítica interlaboratorial, a exemplo de estudo realizado no Brasil⁷³, mas de maneira organizada e rotineira.

Os desafios na área de Toxicologia Ambiental são variados, indo desde a inclusão do homem como elo da cadeia harmônica representada pela natureza até a definição dos instrumentos e conhecimentos necessários para se prever a transformação e interação das substâncias no ambiente. Como comentado⁸³, “além das variáveis ambientais, da toxicocinética e da toxicodinâmica do(s) agente(s) no organismo, também fatores genéticos, nutricionais, de idade, hipersuscetibilidade, reações alérgicas individuais e fatores sócio-econômicos influenciam e modificam a toxicidade dos xenobióticos”. Mas é preciso intervir antes mesmo da fase de produção massificada (dos agrotóxicos e outros contaminantes), pois “a salvaguarda da saúde do ambiente com medidas preventivas tem custo social inferior às obras de correção e recuperação”⁸³; assim, para que o processo de crescimento se dê de maneira consistente faz-se necessário garantir as condições básicas de manutenção da saúde do ambiente e conseqüentemente da saúde do homem⁸³.

Muitos são os desafios na área da toxicologia e da toxicologia de misturas, como bem analisado em outro estudo⁸⁴. Dentre estes desafios pode-se destacar a necessidade de desenvolver métodos para verificar até que ponto é possível usar dados de uma mistura para avaliar outra similar, ou ainda, desenvolver métodos quantitativos para incorporar dados de misturas na avaliação de risco, embora a avaliação de risco seja muito mais difícil no caso de misturas⁸⁴.

O homem tem estado exposto a milhares de substâncias químicas simultaneamente presentes no ambiente e as dificuldades para se avaliar a toxicidade destas misturas são igualmente variadas em função do imenso número de substâncias e da gama de interações possíveis; assim, em concordância com opiniões de outros autores^{75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85}, os desafios são imensos.

Estudo brasileiro³⁶, destacou que os agrotóxicos são responsáveis por mais de 20.000 mortes não intencionais por ano, sendo a maioria em países do Terceiro Mundo e estima-se que 25 milhões de trabalhadores agrícolas sejam intoxicados de forma aguda anualmente. Estima-se ainda que cerca de 2% da população brasileira é contaminada anualmente, e que para cada caso constatado em hospitais e ambulatórios, aproximadamente 250 vítimas não são registradas, principalmente pela falta de conhecimentos toxicológicos dos médicos³⁶, além da falta de conhecimento da população, que não chega nem a procurar os serviços médicos nos casos não agudos.

Além dos desafios já citados do ponto de vista metodológico e de avaliação, há o desafio sob a ótica da Saúde Pública, que fica bastante

vulnerável se considerarmos o volume de acidentes já registrados e estimados, que nem sequer consideraram se a exposição foi a um único composto ou simultaneamente a diversos agrotóxicos.

Como relatado⁸⁴, os bancos de dados em Toxicologia consistem principalmente de testes com uma substância química e cada etapa do processo de análise de risco, ou seja, a identificação do perigo, a avaliação de relação dose-resposta, a avaliação da exposição e a caracterização do risco, é muito mais difícil quando se trata de misturas de compostos, sendo um dos desafios principais proceder a análise adequada do potencial de risco para a saúde humana a partir destes dados com um único composto.

Assim, no caso dos agrotóxicos, seria importante priorizar aqueles compostos cuja probabilidade de presença simultânea no ambiente fosse maior e avaliar suas toxicidades quando em misturas. As metodologias analíticas necessitariam ser testadas e adequadamente avaliadas, bem como os organismos-teste, para que se tentasse chegar a algum consenso no Brasil para estudos desta natureza.

No caso de agrotóxicos, a priorização dos compostos talvez seja possível, pois diferentemente de outros compostos químicos, os agrotóxicos têm seu registro autorizado para usos específicos, em culturas e épocas pré-definidas, e com estes dados seria possível classificar e priorizar os compostos e determinadas misturas para se proceder estudos toxicológicos, verificando desta maneira se haveria maior ou menor risco para o ambiente e para o homem oriundo deste tipo de exposição. Além disto, organismos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Ibama, já dispõe

de banco de dados toxicológicos e ecotoxicológicos que contribuiriam grandemente para esta priorização. O ponto principal, portanto, é que este tipo de investigação seja desenvolvida de maneira lúcida, seriamente direcionada e programada, para que os dados obtidos possam servir realmente para embasar a tomada de decisão.

6. CONCLUSÕES

Após a realização dos ensaios de toxicidade aguda onde a alga verde *Selenastrum capricornutum* e o microcrustáceo *Daphnia similis* estiveram expostos aos herbicidas atrazina e diuron individualmente ou em mistura foi possível concluir-se que:

- O herbicida atrazina foi mais tóxico para *Selenastrum capricornutum* (CE(I)50, 96h = 0,07mg/L) do que para *Daphnia similis* (CE(I)50, 48h = 22,53mg/L), pois é um composto inibidor da fotossíntese tendo efeito tóxico mais severo sobre os organismos fotossintetizantes.
- A toxicidade aguda de diuron foi maior para *Selenastrum capricornutum* (CE(I)50, 96h = 0,01mg/L) do que para *Daphnia similis* (CE(I)50, 48h = 1,49mg/L), pois igualmente à atrazina o diuron é agrotóxico inibidor da fotossíntese.
- Comparando-se a toxicidade individual dos compostos, a toxicidade de diuron foi maior do que de atrazina para ambos os organismos, demonstrando que há variação na severidade do efeito dos compostos, provavelmente devido às diferenças em suas características físico-químicas. Tais diferenças ou facilitaram a absorção do composto, ou possibilitaram uma ação mais rápida e em etapas mais fundamentais do processo metabólico dos organismos.

- A toxicidade aguda dos herbicidas para alga *S. capricornutum*, quando presentes em mistura, foi potencializada, pois tanto a toxicidade de diuron como a de atrazina foi aproximadamente 10 vezes maior do que quando presentes individualmente. A CE(I)50, 96h para *S. capricornutum* calculada, com intervalo de confiança de 95%, para atrazina foi 0,0084mg/L e para o diuron foi de 0,0012mg/L, quando presentes em mistura.
- A toxicidade de atrazina e diuron para o microcrustáceo *D. similis* se potencializou quando em mistura, ficando cerca de 50% superior, quando comparada às toxicidades individuais dos herbicidas estudados. Assim, quando presentes nas misturas testadas a CE(I)50, 48h de atrazina foi 12,51mg/L, enquanto para o diuron foi de 0,83mg/L.
- A alga verde *Selenastrum capricornutum* foi muito mais sensível quando comparada ao microcrutáceo *Daphnia similis* após exposição à mistura dos dois herbicidas, fato que pode ser explicado pelo fato dos dois compostos serem herbicidas inibidores de fotossíntese.
- Os resultados mostraram que há diferenças na toxicidade aguda de agrotóxicos em ambiente aquático quando empregados isoladamente ou em misturas, podendo ocorrer a potencialização dos efeitos, indicando que há necessidade de se considerar este aspecto no estudo da

toxicidade de agrotóxicos, seja para fins de monitoramento, diagnóstico ou de regulamentação.

- Há necessidade de se ampliar o conhecimento atual em Toxicologia Ambiental, principalmente para o meio aquático pois neste ambiente normalmente o cenário é de presença de variados compostos simultaneamente, que provavelmente altera suas toxicidades individuais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ficou evidenciado ao longo da realização deste trabalho, que a toxicidade de misturas de agrotóxicos é objeto de estudos dispersos e não sistematizados e há necessidade de se planejar ações que tornem estes estudos mais eficazes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade de misturas. Além disto, há necessidade de se desenvolver métodos para verificar até que ponto é possível usar dados de uma mistura para avaliar outra similar, ou ainda, desenvolver métodos quantitativos para incorporar dados de misturas na avaliação de risco.

O volume de casos de intoxicações não intencionais por agrotóxicos é alto, como já mencionado anteriormente, e os agrotóxicos estão se tornando cada vez mais problemáticos para a qualidade da água, pois a cada edição do Padrão de Potabilidade (Portaria nº 1469, de 29/12/00), mais compostos são incluídos. Assim, os desafios na área de toxicologia aquática são muitos e a toxicidade de misturas se coloca como mais uma área importante para pesquisa, sob a ótica da qualidade ambiental, da toxicologia ambiental/aquática, da saúde pública, química ambiental, dentre vários outros, pois trata-se de área multidisciplinar e se não houver a concordância dos variados setores do conhecimento o equacionamento desta questão ficará prejudicado.

No caso de agrotóxicos, a priorização dos compostos talvez seja possível, pois diferentemente de outros compostos químicos, os agrotóxicos têm seu registro autorizado para usos específicos, em culturas e épocas pré-

definidas, e com estes dados seria possível classificar e priorizar os compostos e determinadas misturas para se proceder estudos toxicológicos, verificando desta maneira se haveria maior ou menor risco para o ambiente e para o homem, oriundo deste tipo de exposição. Além disto, já se dispõe no País de banco de dados toxicológicos e ecotoxicológicos dos compostos individuais, que contribuiriam grandemente para iniciar esta priorização. As metodologias analíticas necessitariam ser testadas e adequadamente avaliadas, bem como os organismos-teste, para que se tentasse chegar a algum consenso no Brasil para estudos desta natureza.

O ponto principal, é que este tipo de investigação seja desenvolvido de maneira lúcida, seriamente direcionada e programada, para que os dados obtidos possam servir realmente para embasar a tomada de decisão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ROSA, A.V. **Agricultura e Meio Ambiente.** Ed. Atual, São Paulo, Capítulo 1 e 5. 1998.
- 2- VAN DER WERF, H. M. G. Assessing the Impact of Pesticides on the Environment. **Agric. Ecosyst. Environ.**, 1996, 60: 81 – 96.
- 3- RÜEGG, E.F. *et alii.* Impactos dos Agrotóxicos sobre o Ambiente e a Saúde. IN: MARTINE, G. & GARCIA, R.C. **Os impactos sociais da modernização agrícola.** Ed. Caetés, São Paulo, 1987, p. 171-207.
- 4- TOMITA, R.Y. & BEYRUTH, Z. Toxicologia de Agrotóxicos em Ambiente Aquático. **Biológico**, 2002, 64(2): 135-142.
- 5- ZAGATTO, P.A. **Aspects theoriques et pratiques inherents a L'homologation des pesticides.** Metz; 1989. (Tese de Doutorado – Centre dès Sciences de L'Environnement/ Universite de Metz)

- 6- YOUNES, M. & GALAL-GORCHEV, H. Pesticides in Drinkin Water – A Case Study. **Food and Chemical Toxicology**, 2000, 38: S87 – S90.
- 7- EDWARDS, C.A. **Persistent pesticides in the environment** CRC Press, 2nd Ed., U.S.A. 1973.
- 8- ALMEIDA, W.F. Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica. **O Biológico**, 1974, 40, (6): 171-183.
- 9- MACHADO, P.A.L. **Direito Ambiental Brasileiro**, 2^a ed., Editora Revista dos Tribunais, São Paulo, Cap. VIII, 1989, pgs. 313-328.
- 10- EDWIN, D.O. 1996. **Control of water pollution from agriculture**. FAO Irrigation and Drainage Paper 55, Roma, 101p.
- 11- KOTAKA, E.T. & ZAMBRONE, F.A.D. **Contribuições para a Construção de Diretrizes de Avaliação do Risco Toxicológico de Agrotóxicos**. International Life Sciences Institute do Brasil, Campinas, S.P., 2001, 160 p.

- 12- CETESB. **Relatório de Qualidade da Água para Consumo Humano no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1994.
- 13- NIMMO, D.R. Pesticides. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere, 1985, p. 335-373.
- 14- ROUQUARYOL, M.Z. Epidemiologia, História Natural e Prevenção de Doenças. **Epidemiologia & Saúde**. MEDSI 4^a Ed., 1994, p.07-22.
- 15- FUNASA – Vigilância Ambiental. <http://www.funasa.gov.br>
- 16- FILIZOLA, H.F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L.M.A.; GOMES, M.A.F. & FERREIRA, C.J.A. Monitoramento e Avaliação do Risco de Contaminação por Pesticidas em Água Superficial e Subterrânea na Região do Guairá. **Pesq. agropec. bras.**, 2002, 37(5): 659 – 667.
- 17- BARCELÓ, D.; CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; VALVERDE, A.; ALPENDURADA, M.F. Monitoring Pesticides and Metabolites in Surface Water and Groundwater in Spain. **American Chemical Society**, Capítulo 18, 1996, pg. 237-253.

- 18- BARCELÓ, D. Evaluación de la contaminación por plaguicidas en diversas zonas costeras de Europa In: **III Seminario Internacional sobre Residuos de Plaguicidas**, Editores Valverde-Garcia, A. & Fernández-Alba, A.B., 1994, p. 163-186.
- 19- DUPAS, S.; SCRIBE, P.; ETCHEBER, H. & SALIOT, A. Phenylurea and triazine herbicides in the Garonne River (France) during high flood and low water periods. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, 1995, Vol.58, p. 397-409.
- 20- MALLET, C. & MALLET, V. N. Conversion of a conventional packed-column gas chromatograph to accommodate megabore columns. Determination of organophosphorus pesticides in environmental waters. **J. Chromatogr.**, 1989, 481, pp. 37-44.
- 21- DURAND, G. & BARCELÓ, D. Liquid chromatographic analysis of chlorotriazine herbicides and its degradation products in water samples with photodiode array detection. I. Evaluation of two liquid-liquid extraction methods. **Toxicol. Environ. Chem.**, 1989, vol. 25, p. 1-11.
- 22- RODRIGUES, R. **Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 CE (Metolachlor) sobre a Comunidade Bentônica da Zona Litoral, no Sítio São José, Município Embu-**

Guaçu, Estado de São Paulo. São Paulo; 1993. [Dissertação de Mestrado] Depto. de Ecologia Geral, IB/USP.

23- TUNDISI, H.S.F. **Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 CE (Metolachlor) sobre a População de Copépodos Ciclopóides, no Açude do Sítio São José, Município Embu-Guaçu, Estado de São Paulo.** São Paulo; 1990. [Dissertação de Mestrado] Depto. de Ecologia Geral, IB/USP.

24- SPACIE, A. & HAMELINK, J.L. Bioaccumulation. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere , 1985, p. 495-525.

25- METCALF,. R.L. A Laboratory Model Ecosystem to Evaluate Compounds Producing Biological Magnification. **Essays Toxicol.**, 1974, 5:17-38.

26- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere , 1985, p. 1-28.

- 27- SPRAGUE, J.B. Factors that Modify Toxicity. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere , 1985, p.124-163.
- 28- TEKEL, J. & KOVACICOVÁ, J. Chromatographic methods in the determination of herbicide residues in crops, food and environmental samples. **J. Chromatogr.**, 1993, 643: 291-303.
- 29- BALINOVA, A. Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. **J. Chromatogr.**, 1993, 643: 203-207.
- 30- BRAMBILLA, A.; RINDONE, B.; POLESELLO, S.; GALASSI, S. & BALESTRINI, R. The fate of triazine pesticides in River Po Water. **The Sci. Total Environ.**, 1993, 132: 339-348.
- 31- ZAHRADNÍCKOVÁ, H.; SIMEK, P.; HORICOVÁ, P. & TRÍSKA, J. Determination of atrazine and simazine in drinking and surface waters by solid-phase extraction and high performance thin layer chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1994, 688:383-389.

- 32- PEREIRA, W.E.; DOMAGALSKI, J.L.; HOSTETTLER, F.D.; BROWN, L.R. & RAPP, J.B. Occurrence and accumulation of pesticides and organic contaminants in river sediment, water and clam tissues from the San Joaquin River and tributaries, California. **Environ. Toxicol. Chem.**, 1996, 15(2): 172-180.
- 33- AMARANENI, S.R. & PILLALA R.R. Concentrations of Pesticide Residues in Tissues of Fish from Kolleru Lake in India. **Environ. Toxicol.**, 2001, 16(6): 550-556.
- 34- MARKING, L.L. Toxicity of Chemical Mixtures. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere , 1985, p.164-176.
- 35- STRANDBERG, M.T. & SCOTT-FORDSMAND, J.J. Field Effects of Simazine at Lower Trophic Levels – A Review. **Sci. Total Environ.**, 2002, 296: 117-137.
- 36- ARAÚJO, A.C.P.; NOGUEIRA, D.P. & AUGUSTO, L.G.S. Impacto dos Praguicidas na Saúde: Estudo da Cultura de Tomate. **Rev. Saúde Pública**, 2000, 34(3): 309-313.
- 37- IBAMA – <http://www.ibama.gov.br>

- 38- ALMEIDA ARAÚJO, R.P. **Toxicologia Aquática: Metodologias e Aplicação.** São Paulo; 2000. [Apostila da disciplina Diagnóstico de Ecossistemas Aquáticos do Depto. de Saúde Ambiental, Faculdade de Saúde Pública/USP].
- 39- BURNS, L.A. & BAUGHMAN, L. Fate Modeling. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere , 1985, p. 558-584.
- 40- MAKI, A.W. & BISHOP, W.E. Chemical Safety Evaluation. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere , 1985, p. 619-635.
- 41- CONNELL, D.W. Bioaccumulation Behavior of Persistent Organic Chemicals wit Aquatic Organisms. **Rev. Environm. Contamin. Toxicol.**, 1988, 101: 117-154.
- 42- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG - <http://www.sindag.com.br>
- 43- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL – ANDEF - <http://www.andef.com.br>

- 44- TOMLIN, C.D.S. **The e-Pesticide Manual: A World Compendium.**
[programa de computador]. Versão 2.0, Grã-Bretanha, The British
Crop Protection Council, 2000 .
- 45- INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE. **Monografias de Uso
Agropecuário e Domissanitário** [programa de computador], 2^a
ed., São Paulo, 2001.
- 46- PARRISH, P.R. Acute Toxicity Tests. In: RAND, G.M. &
PETROCELLI, S.R., editors. **Fundamentals of Aquatic
Toxicology: Methods and Applications**, New York, Hemisphere ,
1985, p. 31-57.
- 47- Disponível em <http://www.ife.ac.uk>
- 48- EIJAY, A. Effects of Organic Solvents and Solvent-Atrazine
Interactions on Two Algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum
capricornutum*. **Arch. Environ. Contam. Tox.**, 1996, 31(1):84-90.
- 49- SCHNEIDER, J; MORIN, A. & PICK F.R. The Response of Biota in
Experimental Stream Channels to a 24-Hour Exposure to the
Herbicide Velpar L (R). **Environ. Tox. Chem.**, 1995, 14(9):1607-
1613.

- 50- HALL, N.E.; FAIRCHILD, J.F.; LAPOINT, T.W.; HEINE, P.R.; RUESSLER, D.S. & INGERSOLL, C.G. Problems and Recommendations in Using Algal Toxicity Testing to Evaluate Contaminated Sediments. **J. Great Lakes Res.**, 1996, 22(3):545-556.
- 51- HERBERT, P.D.N. & FINTON T.L. A Taxonomic Reevaluation of North-American *Daphnia* (Crustacea, Cladocera). 1. The *D. Similis* Complex. **Can. J. Zool.**, 1993, 71(5):908-925.
- 52- HUDEC, I. A Comparison of Population from the *Daphnia similis* Group (Cladocera, Daphniidae). **Hydrobiologia**, 1991, 225:9-22.
- 53- LIU, M.C.; CHEN, C.M.; CHENG, H.Y.; CHEN, H.Y.; SU, Y.C. & HUNG, T.Y. Toxicity of Different Industrial Effluents in Taiwan: A Comparison of the Sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox (R). **Environ. Tox.**, 2002, 17(2):93-97.
- 54- BRANDELLI, A.; BALDASSO, M.L. & GOETTEMES, E.P. Toxicity Identification and Reduction Evaluation in Petrochemical Effluents – Site Case. **Water Sci. Technol.**, 1992, 25(3): 73-84.

- 55- UTZ, L.R.P. & BOHRER M.B.C. Acute and Chronic Toxicity of Potassium Chloride (KCl) and Potassium Acetate ($KC_2H_3O_2$) to *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea; Cladocera). **B. Environ. Contam. Tox.**, 2001, 66(3):379-385.
- 56- DE CARVALHO, P.S.M.; ZANARDI, E.; BURATINI, S.V.; LAMPARELLI, M.C. & MARTINS, M.C. Oxidizing Effect on Metal Remobilization and *Daphnia similis* Toxicity from a Brazilian Reservoir Sediment Suspension. **Water Res.**, 1998, 32(1)193-199.
- 57- ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. Englewood Cliffs, 4a. ed., Prentice-Hall, Inc., 1999.
- 58- HAMILTON, M.A. ; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal concentrations in Toxicity Bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, 1977, 11: 714-719.
- 59- FORATTINI, O.P. Pesquisa em Saúde Pública [Artigo Especial]. **Rev. Saúde Pública**, 1995, 29(2): 81-88.
- 60- CAIRNS, J.J. The Genesis of Ecotoxicology. IN: CAIRNS, J.J. & NIEDERLEHNER, B.R., editors. **Ecological Toxicity Testing – Scale, Complexity and Relevance**, CRC Press Inc., 1995, p. 1-10.

- 61- ZAGATTO, P.A. Sensibilidade de *Daphnia similis*: Controle de Qualidade de Culturas. **Ambiente**, 1988, 2(2): 79-83.
- 62- GOLDSTEIN, E.G.; ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.; ARAÚJO, R.P.A.; MARTINS, M.H.R.B. & LOMBARDI, C.C. Estimativa de Carga Poluidora de Efluentes Industriais da Região de Cubatão Através de Ensaio Biológicos com Microcrustáceos e Peixes. In: **Anais do 3º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária**; 1985 , agosto 18-23; Maceió; Alagoas, p. 1-10.
- 63- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E.G. & SOUZA, H.B. Avaliação de Toxicidade em Sistema de Tratamento Biológico de Afluentes Líquidos. **Revista DAE**, 1992, 52(166): 1-6.
- 64- CETESB. **Estudo Ecotoxicológico no Rio Atibaia**. São Paulo, 1992. (Relatório Técnico).
- 65- ZAGATTO, P.A. & GOLDSTEIN, E.G. Toxicidade em Águas do Estado de São Paulo. **Ambiente**, 1991, 5(1): 13-20.
- 66- GOLDSTEIN, E.G. Testes de Toxicidade de Efluentes Industriais. **Ambiente**, 1988, 2(1): 33-38.

- 67- GOLDSTEIN, E.G.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A. & BERTOLETTI, E. Avaliação da Toxicidade dos Principais Despejos Industriais da Região da ERQ-Suzano, Através de Ensaio Biológicos. **Revista DAE**, 1983, 132: 42-48.
- 68- BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E.G. & NIPPER, M.G. Toxicidade de Efluentes Industriais na Grande São Paulo. **Revista DAE**, 1989, 49(155): 63-70.
- 69- SABATER, C. & CARRASCO, J.M. Effects of the Organophosphorus Insecticide Fenitrothion on Growth in Five Freshwater Species of Phytoplankton. **Environ. Toxicol.**, 2001, 16(4): 314-329.
- 70- STAPLES, C.A.; ADAMS, W.J.; PARKERTON, T.F.; GORSUCH, J.W.; BIDDINGER, G.R. & REINERT, K.H. Aquatic Toxicity of Eighteen Phthalate Esters. **Environ. Toxicol. Chem.**, 1996, 16(5): 875-891.
- 71- DEWEZ, D.; MARCHAND, M.; EULLAFROY, P. & POPOVIC, R. Evaluation of the Effects of Diuron and Its Derivatives on *Lemna gibba* Using a Fluorescence Toxicity Index. **Environ. Toxicol.**, 2002, 17(5): 493-501.

- 72- POLLEHNE, F.; JOST, G.; KERSTAN, E.; MEYER-HARMS, B.; RECKERMAN, M.; NAUSCH, M. & WODARG, D. Triazine Herbicides and Primary Pelagic Interactions in a Estuarine Summer Situation. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 1999, 238: 243-257.
- 73- BERTOLETTI, E.; NIPPER, M.G. & MAGALHÃES, N.P. a Precisão de Testes de Toxicidade com *Daphnia*. **Ambiente**, 1992, 6(1): 55-59.
- 74- SCHÄFER, H.; HETTLER, H.; FRITSCH, U.; PITZEN, G.; RÖDERER, G. & WENZEL, A. Biotests Using Unicellular Algae and Ciliates for Predicting Long-Term Effects of Toxicants. **Ecotox. Environ. Safety**, 1994, 27:64-81.
- 75- PAPE-LINDSTROM, P.A. & LYDY, M.J. Synergistic Toxicity of Atrazine and Organophosphate Insecticides Contravenes the Response Addition Mixture Model. **Environ. Toxicol. Chem.**, 1997, 16(11): 2415-2420.
- 76- BAILEY, H.C.; ELPHICK, J.R.; KRASSOI, R. & LOVELL, A. Joint Acute Toxicity of diazinon and Ammonia to *Ceriodaphnia dubia*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2001, 20(12): 2877-2882.

- 77- JIN-CLARK, Y.; LYDY, M.J. & ZHU, K.Y. Effects of Atrazine and Cyanazine on Chlorpyrifos Toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Environ. Toxicol. Chem.**, 2002, 21(3): 598 - 603.
- 78- ANDERSON, T.D. & LYDY, M.J. Increased toxicity to Invertebrates Associated with a Mixture of Atrazine and Organophosphate Insecticides. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2002, 21(7): 1507-1514.
- 79- BANKS, K.E.; WOOD, S.H.; MATTHEWS, C. & THUESEN, K.A. Joint Acute Toxicity of Diazinon and Copper to *Ceriodaphnia dubia*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2003, 22(7): 1562-1567.
- 80- ALTERNBURGER, R.; NENDZA, M. & SCHÜÜRMAN, G. Mixture Toxicity and Its Modeling by Quantitative Structure-Activity Relationships. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2003, 22(8): 1900-1915.
- 81- CETESB. **Avaliação da Toxicidade das Águas Sedimentos dos Rios e Efluentes Industriais da Região de Cubatão – Vol. I.** São Paulo, 1986. (Relatório Técnico).

- 82- PARKHURST, B.R. Are Single Species Toxicity Test Results Valid Indicators of Effects to Aquatic Communities? IN: CAIRNS, J.J. & NIEDERLEHNER, B.R., editors. **Ecological Toxicity Testing – Scale, Complexity and Relevance**, CRC Press Inc., 1995, p. 105-121.
- 83- VARIN, L.L. Monitoramento Biológico e Epidemiologia Ambiental. **Ambiente**, 1988, 2(1): 29-32.
- 84- SIMMONS, J.E. Chemical Mixtures: Challenge for toxicology and Risk Assessment. **Toxicology**, 1995, 105: 111-119.
- 85- VILLA, S.; VIGHI, M.; CASINI, S. & FOCARDI, S. Pesticide Risk Assessment in a Lagoon Ecosystem. Part II: Effect Assessment and Risk Characterization. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2003, 22(4): 936-942.

DIPLOMAS LEGAIS CITADOS

- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio. Decreto Federal nº 15.198, de 21/12/21 – Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal.
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio. Decreto Federal nº 24.114, de 12/04/34 – Novo Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal.
- ▶ Brasil. Decreto Federal nº 24.643, de 10/07/34 – Código de Águas
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura. Decreto-Lei nº 917, de 07/10/69 - dispõe sobre o emprego da aviação agrícola no País.
- ▶ Brasil. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal. Portaria nº 357, de 14/10/71 - proibiu o uso de organoclorados em pastagens.
- ▶ Brasil. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal. Portaria nº 393, de 05/10/72 – proibiu o uso de organoclorados na cultura do fumo.
- ▶ Brasil. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal. Portaria nº 326, de 16/08/74 - proibiu o uso de 2,4,5 T (triclorofenoxiacético) em florestas e nas margens de rios, lagos, açudes, poços e mananciais.
- ▶ Brasil. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal. Portaria nº 002, de 06/01/75 – proibiu defensivos agrícolas com compostos de metil-mercúrio, etil-mercúrio e outros alquil-mercúrio.
- ▶ Brasil. Decreto Federal nº 67.112/70 - estabeleceu obrigatoriedade de licença do Ministério da Saúde ou do Ministério da Agricultura para indústrias de produtos domissanitários ou produtos fitossaneantes ou zoossaneantes, respectivamente.

- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 429, de 14/10/74 – disciplinou a prestação de serviços fitossanitários por empresas especializadas, no território nacional.
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura e Ministério da Saúde. Portaria nº 220, de 14/03/79 - disciplinou a rotulagem dos agrotóxicos.
- ▶ Brasil. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Produtos Saneantes Domissanitários. Portarias nº 04 e 05, de 1980 - determinam as normas e critérios para se proceder a classificação toxicológica e quanto aos efeitos sobre o meio ambiente de agrotóxicos, respectivamente.
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 007/81 - implantou o Receituário Agrônomo.
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 01, de 23/01/81 - instituiu o cadastro obrigatório dos varejistas, revendedores, distribuidores, cooperativas e outras entidades que transacionassem defensivos agrícolas diretamente com usuários.
- ▶ São Paulo. Lei nº 4.002 de 05/01/84 - dispôs sobre a distribuição e comercialização de produtos agrotóxicos e outros biocidas no território estadual e proibiu também a utilização, comercialização e distribuição de agrotóxicos organoclorados no território do Estado.
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 429, de 02/09/85 - baniu o uso, a comercialização e a distribuição de compostos organoclorados no território nacional.
- ▶ Brasil. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988.

- ▶ Brasil. Lei 7802 de 11/07/89 – dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, além da propaganda comercial, utilização, importação e exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins.
- ▶ Brasil. Decreto Federal nº 98.816 de 11/01/90 - regulamentou a Lei 7.802/89.
- ▶ Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 03/92 - definiu as “Diretrizes e Exigências do Ministério da Saúde, Referentes à Autorização de Registro, Renovação de Registro e Extensão de Uso de Agrotóxicos e Afins”.
- ▶ Brasil. IBAMA. Portaria Normativa nº 84, de 15/10/96 – estabeleceu os procedimentos e exigências para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins.
- ▶ Brasil. Ministério da Agricultura. Lei 9.974, de 06/06/00 - sobre a destinação final dos resíduos e embalagens de agrotóxicos.
- ▶ Brasil. Decreto nº 3.550, de 27/07/00 - regulamentou a Lei 9.974/00.
- ▶ Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469, de 29/12/00 – Padrão de Potabilidade de Água Destinada ao Consumo Humano.

METODOLOGIAS CITADAS

- ▶ Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12648. Água – Ensaio de Toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae)**, Rio de Janeiro, 1992.
- ▶ Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12713. Água- Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)**, Rio de Janeiro, 1993
- ▶ CETESB. **Norma Técnica L5.017. Análise Estatística de Resultados de Testes de Toxicidade Aguda. Procedimento**, São Paulo, 1990
- ▶ OECD. **Guideline for Testing Chemicals 201 – Alga, Growth Inhibition Test**, 1984.
- ▶ OECD. **Guidelines for Testing Chemicals 211 – *Daphnia magna* Reproduction Test**, 1998.
- ▶ IBAMA. **Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos**, Brasília, 1988.

ANEXO 1

PREPARO DO MEIO DE CULTURA LÍQUIDO L.C. OLIGO

1. SOLUÇÕES

O preparo deste meio de cultura é de acordo com ABNT (1992). Preparar as soluções (Tabela A-1) com reagentes de boa qualidade (P.A.) e com água desionizada estéril. Armazenar na geladeira em frascos âmbar.

Tabela A-1 – Soluções-estoque para preparo do meio de cultura líquido L.C.Oligo, empregado no cultivo de *Selenastrum capricornutum*.

Nº da solução	Reagente	Massa (g)	Volume (mL)
1	Nitrato de cálcio - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4	100
2	Nitrato de potássio - KNO_3	10	100
3	Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3	100
4	Fosfato dibásico de potássio - K_2HPO_4	4	100
5	Sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,030	1000
	Molibdato de amônia - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,060	
	Sulfato de zinco - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060	
	Cloreto de cobalto - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,060	
	Nitrato de Manganês - $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,060	
	Ácido nítrico - HNO_3	0,060	
	Ácido bórico H_3BO_3	0,060	
6	Citrato de Ferro - $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,625	1000
	Sulfato de ferro - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,625	
	Cloreto férrico - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,625	
7	Bicarbonato de Sódio - NaHCO_3	15	1000

2. PREPARO DO MEIO

Em balão volumétrico de 1000mL, colocar 500mL de água desionizada e adicionar as alíquotas de cada solução. Em seguida completa-se o volume para 1 L com água desionizada e homogeneiza-se.

- a) 1,0mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 7;
- b) 0,5mL das soluções 5 e 6.

O pH do meio deve estar na faixa de $7,1 \pm 0,1$. Se necessário, ajustar o pH com soluções de NaOH ou HCl 1N. Colocar o meio em recipiente apropriado e autoclavar a 121°C por 15 minutos. O meio líquido autoclavado pode ser armazenado sob refrigeração e ser utilizado por 2 semanas.

ANEXO 2

MANUTENÇÃO DE CULTURA DE ALGA *Selenastrum capricornutum*

1. Preservação da cultura de alga em meio sólido

A cultura de alga é preservada em meio sólido de ágar inclinado, contendo peptona protease e preparado de acordo com o seguinte procedimento:

- a) adiciona-se 15g de agar em 1000mL de água desionizada, deixando hidratar por 30 minutos;
- b) Após a dissolução total do agar adicionar : 0,2g de nitrato de potássio (KNO_3); 0,02g de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4); e 0,02g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- c) Quando o agar estiver quase frio adicionar 1,0g de peptona protease.

O meio deve ser colocado em tubo de ensaio ou similar, em quantidade suficiente para preparar os meios inclinados, deixar esfriar sem tampar. Em seguida, os tubos são tampados e autoclavados por 15 minutos a 121°C em posição de 45° para obter-se o meio inclinado. Preferencialmente, o meio sólido deve ser preparado no momento da utilização.

A cultura de algas em meio sólido deve ser repicada de um frasco para outro, a cada 6 meses. As culturas novas são incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com luminosidade constante (± 1700 lux) até que seja obtido bom crescimento

(aproximadamente 10 dias). Após o completo estabelecimento da cultura, manter os frascos sob temperatura variando de 4 a 10 °C, no escuro.

2. Manutenção da cultura de algas em meio líquido L.C. Oligo

A cultura de alga é mantida em erlenmeyer de 2L (fermentador de algas) contendo 400mL de meio de cultura líquido L.C. Oligo estéril (ANEXO 1), onde a cultura preservada em meio sólido é repicada com auxílio de alça de platina, em câmara de fluxo laminar. A partir desta cultura mantida no meio líquido prepara-se o inóculo de alga para os testes de toxicidade. O frasco é mantido vedado com rolha de borracha e com aeração feita através de bomba de aquário ligado a um filtro de 0,88µm, que garante a esterilidade do ar que entra no frasco, impedindo desta maneira, que o ar externo contamine o meio. O fermentador é mantido em mesa agitadora (100 a 175rpm), com iluminação contínua variando de 1.100 a 3.550 lux e temperatura controlada de 25 ± 2 °C. Após 3 a 4 dias, a nova cultura deve estar na fase exponencial de crescimento e adiciona-se ± 1.400 mL de meio estéril e mantém por cerca de 7 dias, estando adequada para seu uso em testes de toxicidade.

3. Preparo de suspensão algácea para alimentar *D. similis*

Suspensão algácea é utilizada para alimentar a cultura de *Daphnia similis*. Volume adequado da cultura de alga é retirado do fermentador e a mesma quantidade de meio estéril é repostada. Este volume é centrifugado (3500rpm) por 5 minutos em tubos autoclavados.

O material sedimentado é ressuspenso em água desionizada estéril e a densidade algácea é quantificada em espectrofotômetro (ANEXO 3). Em cada cuba de cultivo de *Daphnia similis* contendo aproximadamente 40 organismos, deve-se adicionar no mínimo 2mL de suspensão algácea por dia.

ANEXO 3

QUANTIFICAÇÃO DE DENSIDADE ALGÁCEA

A densidade de algas foi quantificada em espectrofotômetro devidamente calibrado, onde foi inserida “Curva de densidade celular x Absorvância”, de tal maneira que as determinações obtidas em absorvância foram diretamente convertidas em n^o de células/mL. A curva foi obtida através da quantificação de amostras de diferentes densidades de alga em absorvância no espectrofotômetro (comprimento de onda 750nm) que tiveram suas densidades quantificadas em microscópio. De tal maneira que se obteve a correspondência entre absorvância e número de células/mL.

No início do teste de toxicidade, antes de se adicionar o inóculo de algas, alíquota de cada solução-teste foi retirada para ser usada como “branco”, isto é, para zerar o espectrofotômetro no momento da quantificação de cada concentração testada. Para as amostras controle do teste, utilizou-se o meio de cultura como branco.

Para cada leitura, retirou-se cerca de 2 mL de cada amostra em câmara de fluxo laminar, transferindo diretamente para um tubo de ensaio. No momento da quantificação, amostras e brancos eram homogenizados em agitador de tubos (Vórtex), transferidos para a cubeta do espectrofotômetro e quantificados. Para a quantificação de cada concentração primeiro o equipamento era zerado com seu branco correspondente, e em seguida as amostras em triplicata. Os resultados eram anotados nas fichas do teste

em absorbância e em número de células/ml, pois como já mencionado, o equipamento já tinha inserido a “Curva de densidade celular x Absorvância”, permitindo a conversão direta dos valores obtidos de absorbância em número de células/ml.

As cubetas foram sempre lavadas com água desionizada após a quantificação de amostras de diferentes concentrações e as amostras quantificadas descartadas.

ANEXO 4

MANUTENÇÃO DE CULTURA DE *Daphnia similis*

O cultivo e manutenção de *Daphnia similis* são feitos em cubas de vidro de 3L, que permanecem em incubadora com temperatura de 20 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas de escuro e 8 horas de luz, as cubas são mantidas fechadas para evitar contaminações pelo ar.

A água utilizada é natural de boa qualidade, coletada periodicamente em uma represa do município de São Paulo. A água de represa é filtrada e autoclavada e possui as seguintes características: dureza total ajustada variando de 40 a 48 mg CaCO₃/L; pH de 7,2 a 7,6 e condutividade variando de 135 e 200 µS/cm.

Semanalmente, uma nova cultura é iniciada com 40 jovens recém-nascidos, selecionados a partir de culturas adultas e produtivas com 14 dias de idade. No 14^o dia desta cultura, outros 40 jovens são selecionados para iniciar uma nova cultura e todos os animais são descartados após 21 dias. Semanalmente também são substituídas as cubas de manutenção para limpeza, transferindo-se os organismos para uma nova cuba contendo 2L de água de manutenção, devidamente aclimatada na mesma temperatura.

Diariamente as culturas de fêmeas ovígeras são isoladas removendo-se os animais jovens. O horário de isolamento sempre é anotado e os jovens obtidos podem ser utilizados nos testes de toxicidade, desde que tenham de 6 a 24 horas de idade. Diariamente cada cultura recebe 2mL de suspensão algácea (ANEXO 2) e 1mL de alimento composto (ANEXO 6).

ANEXO 5

PREPARO DE ÁGUA MOLE RECONSTITUÍDA

Para o preparo de água reconstituída de baixa dureza (água mole) (ABNT NBR 12715, 1993), utilizada nos testes de toxicidade de *Daphnia similis*, preparou-se as seguintes soluções com reagentes grau analítico:

- a) Solução 1: 1000mL de água desionizada acrescidos de 1,5g de sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- b) Solução 2: 1000mL de água desionizada acrescidos de 0,2g de cloreto de potássio (KCl); 4,8g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3); 6,1g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Para cada litro de água mole adicionar aos 970mL de água desionizada, 20mL da Solução 1 e 10mL da Solução 2. A água recém-preparada deve permanecer sob aeração por 24 horas, no mínimo, para homogeneização dos sais e saturação de oxigênio dissolvido.

Após o período de 24 horas deve-se medir os parâmetros descritos na tabela A-2 que devem situar-se nas faixas adequadas. Se necessário ajustar o pH utilizando soluções de HCl ou NaOH 1N.

Tabela A-2 – Características físico-químicas da água mole reconstituída.

Característica	Faixa adequada
pH	7,2 – 7,6
Dureza total	40 - 48 mgCaCO ₃ /L
Condutividade	140 – 200 µS/cm
Oxigênio dissolvido	≥ 6,0 mg O ₂ /L

ANEXO 6

PREPARO DE ALIMENTO COMPOSTO (RL)

Para o preparo do alimento composto deve-se misturar partes iguais de ração de peixe digerida e fermento biológico. Para tanto, é necessário dissolver a ração e o fermento biológico em água desionizada, como segue.

O preparo de ração de peixe digerida deve ser feito pesando-se a ração e dissolvendo-a em água desionizada, seguindo a proporção de 5,0g para 1000mL; ou 2,5g para 500mL; ou 1,0g para 200mL; ou 0,5g para 100mL. Em seguida a mistura deve ser colocada em funil de separação e mantida sob aeração por uma semana. Deixar decantar por 1 hora e filtrar o sobrenadante. Pode-se congelar pequenos volumes (10, 20 ou 30mL) em frascos e descongelar quando necessário, sendo que não se deve armazenar por mais de 6 meses.

O fermento biológico seco (tipo Fleischmann ou similar) deve ser dissolvido em água desionizada na proporção de 1,00g para 200mL; ou 0,25g para 50mL; ou 0,15g para 30mL; ou 0,10g para 20mL; ou 0,05g para 10mL. Deixar sob agitação por 5 minutos e utilizar imediatamente, pois não pode ser armazenado.

Após a mistura da ração digerida e do fermento biológico, filtrar em rede com abertura de malha de 45µm.

Para cada 20mL de ração + 20mL de fermento, adicionar 30mL de água desionizada. Esta proporção deve ser mantida para qualquer volume de alimento

composto a ser preparado. Esta mistura pode ser utilizada durante até 3 semanas, conservando-a em geladeira.

O volume de alimento a ser adicionado às cubas de *Daphnia similis* deve ser inferior a 2,0mL, para evitar a proliferação excessiva de fungos, que dificulta a manutenção da cultura e pode comprometer a qualidade da água nas cubas.