

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Biomagnificação do heptacloro num modelo de simulação**  
**em condições ex-situ**

**Lucineide Aparecida Maranhão**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ecologia de Agroecossistemas. Área de concentração:  
Ecologia de Agroecossistemas

**Piracicaba**  
**2006**

**Lucineide Aparecida Maranhão**  
**Bacharel e Licenciada em Biologia**

**Biomagnificação do heptacloro num modelo de simulação em condições ex-situ**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. VALDEMAR LUIZ TORNISIELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ecologia de Agroecossistemas. Área de concentração:  
Ecologia de Agroecossistemas

**Piracicaba**  
**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Maranho, Lucineide Aparecida

Biomagnificação do heptacloro num modelo de simulação em condições ex-situ /  
Lucineide Aparecida Maranho. - - Piracicaba, 2006.  
63 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Contaminação ambiental 2. Ecossistemas aquáticos 3. Inseticidas organoclorados  
4. Toxicidade I. Título

CDD 632.951

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Ao meu marido Edson, à minha filha Helena e aos meus pais Lucia e Alceu.

Dedico

## AGRADECIMENTO

Ao professor Dr. Valdemar Luiz Tornisielo a amizade, orientação e incentivos no transcorrer do curso.

Ao Dr. Lourival Costa Paraíba, a amizade, as sugestões e modelos matemáticos desenvolvidos para esta dissertação.

Ao meu marido Edson, às amigas Rosangela, Luciana e Nathália a dedicação no auxílio do trabalho, paciência e o grande carinho.

Ao Dr. Ruy Lopes Bessa e à prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Ann Veasey a amizade, paciência e sugestões para este.

À Secretária da PPGI-EA Regina Telles Freitas a dedicação, paciência e suas instruções.

À “irmã de Piracicaba” Josélia Sesso Perina a de troca de informações.

Ao amigo Carlos Dorelli, o auxílio no trabalho e troca de informações.

Ao pessoal da biblioteca do CENA Renata, Raquel e Celso a consideração e o coleguismo.

Aos amigos que sempre deram amparo: Mariana, Fabrício, Jussara, Regina, Carolina, Maria Valéria, Cidinha e Vlamir.

À CAPES a concessão da bolsa.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) a oportunidade de desenvolver os experimentos no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	08
ABSTRACT .....	09
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 Poluição do meio aquático .....	15
2.2 Contaminação ambiental por pesticidas organoclorados .....	15
2.3 Heptacloro .....	18
2.4 Biomagnificação em ambiente aquático .....	18
2.5 Depuração em ambiente aquático .....	21
2.6 Modelos matemáticos em ecotoxicologia .....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 Local de investigação .....	25
3.2 Substância teste .....	25
3.3 Bioética e descarte de resíduos .....	25
3.4 Organismos teste .....	27
3.4.1 Algas .....	27
3.4.1.1 Soluções estoque .....	27
3.4.1.2 Preparo e condições do meio de cultura .....	28
3.4.1.3 Determinação da densidade algal .....	28
3.4.2 Microcrustáceos .....	29
3.4.2.1 Sala de cultivo .....	29
3.4.2.2 Meio de cultivo .....	30
3.4.2.3 Soluções estoque .....	30
3.4.2.4 Preparo do meio de cultivo .....	31
3.4.2.5 Alimentação .....	31
3.4.2.6 Renovação da água de cultivo .....	32
3.4.3 Peixes .....	32

3.4.3.1 Tanque e água de cultivo .....	32
3.4.3.2 Alimentação e limpeza .....	33
3.5 Teste agudo com peixes 96 horas .....	33
3.6 Cultivo fase limpa .....	34
3.6.1 Cultivo limpo com algas 7 dias – primeira fase .....	34
3.6.2 Cultivo limpo com dáfnias 9 dias – segunda fase .....	35
3.7 Montagem do pré-teste .....	35
3.7.1 Pré-teste com algas 7 dias – primeira fase .....	35
3.7.2 Pré-teste com dáfnias 9 dias – segunda fase .....	36
3.7.3 Pré-teste com peixes 5 dias – terceira fase .....	36
3.7.4 Pré-teste com peixes 9 dias – quarta fase .....	37
3.8 Montagem do experimento .....	37
3.8.1 Preparo da solução de trabalho .....	37
3.8.2 Experimento com algas 7 dias – acumulação .....	37
3.8.3 Experimento com dáfnias 9 dias – acumulação .....	39
3.8.4 Experimento com peixes 5 dias – acumulação .....	40
3.8.5 Experimento com peixes 9 dias – depuração .....	41
3.9 Modelo toxicocinético .....	42
3.9.1 Modelagem da bioacumulação do inseticida heptacloro em peixes alimentados por dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro .....	42
3.9.2 Cálculo do fator de bioconcentração do heptacloro em algas .....	43
3.9.3 Cálculo do fator de bioacumulação do heptacloro em dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro .....	44
3.9.4 Cálculo do fator de bioacumulação do heptacloro em peixes alimentados com dáfnias contaminadas com heptacloro .....	45
3.9.5 Cálculo do fator de biomagnificação do heptacloro em peixes por meio da cadeia alimentar contaminada com heptacloro .....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1 Resultado do teste agudo com peixes .....	47
4.2 Concentração do heptacloro na água das algas, dáfnias e peixes .....	48
4.3 Avaliação da exposição das algas ao heptacloro .....	49

4.4 Avaliação da exposição das dáfnias alimentadas com algas contaminadas pelo heptacloro .....	51
4.5 Avaliação da exposição dos peixes alimentados com dáfnias contaminadas pelo heptacloro no período de acumulação .....	52
4.6 Avaliação da exposição dos peixes alimentados com dáfnias contaminadas pelo heptacloro no período de depuração .....	54
4.7 Avaliação do material de fundo dos aquários de dáfnias e peixes .....	54
4.8 Biomagnificação da cadeia alimentar .....	55
5 CONCLUSÕES .....	57
REFERÊNCIAS .....	59



## RESUMO

Os estudos realizados em diversas partes do mundo sobre a utilização de pesticidas e os impactos que estes podem causar ao ambiente são uma das ações prioritárias para o desenvolvimento da agricultura, principalmente para aqueles pesticidas que são persistentes ao meio biótico e abiótico, como o inseticida heptacloro, que apesar de seu uso restrito para tratamento de madeira, ainda é muito usado no Brasil clandestinamente para outros fins. A maioria dos estudos realizados até agora sobre biomagnificação envolve o meio terrestre e uma pequena porcentagem desses é direcionada para o meio aquático e tem sido realizada em modelos de campo. O objetivo deste projeto foi determinar a  $CL_{50}$  96 horas para peixes a acumulação, biomagnificação e depuração do heptacloro em um modelo de sistema aquático. Como não existe nenhuma norma que defina o efeito cumulativo através dos níveis tróficos, pretendeu-se com esta pesquisa estimar a biomagnificação e depuração do heptacloro. Este estudo foi realizado em laboratório, em um modelo dividido em compartimentos individualizados, no qual somente as algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) foram submetidas por um período de 7 dias ao heptacloro, obtendo-se uma concentração final de  $0,10 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  algas, as quais posteriormente serviram de alimento para os microcrustáceos (*Daphnia magna*) durante 9 dias, que ao final concentraram  $0,12 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  organismos. Por último, os peixes (*Danio rerio*) foram alimentados com microcrustáceos, no período de 5 dias, alcançando uma concentração final de  $0,62 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  organismos. Nos últimos 9 dias, durante o período de depuração, os peixes foram alimentados em dias intercalados com microcrustáceos e ração sem contaminação com o produto, atingindo uma concentração final de  $0,25 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  organismos. Nos testes realizados com esses três organismos, observou-se que a concentração ficou maior conforme o nível dentro do modelo proposto era mais alto, comprovando assim a hipótese do poder de bioacumulação, biomagnificação e depuração do heptacloro.

Palavras-chave: Biomagnificação; Acumulação; Depuração; Níveis tróficos.

## ABSTRACT

The studies carried out in different parts of the world about the pesticides use and the impacts that they can cause to the environment, are one of the priority actions for the agriculture development, mainly for those pesticides that are persistents in the biotic and abiotic environment, such as the heptachlor insecticide, which is still illegally used for others purposes in Brazil, although its use is limited for the wood treatment. The majority of the studies carried out until now about biomagnification involves the terrestrial environment and a small percentage of these studies are directed for the aquatic environment, and this small percentage has been carried out in field models. The aim of this project was to determine the  $LC_{50}$  96 hours for fish, accumulation, biomagnifications, and depuration of heptachlor in an aquatic system model and, as there isn't any norm that defines the cumulative effect through trophic levels, it was claimed with this research to esteem the heptachlor biomagnification and depuration. This study was carried out in a laboratory, in a model divided in single chambers, in which the algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) were submitted during 7 days to the heptachlor, getting a final concentration of  $0.10 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  heptachlor/ $\mu\text{g}$  algae, which was later served as food for the microcrustaceans (*Daphnia magna*) during 9 days, which concentrated  $0.12 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  heptachlor/ $\mu\text{g}$  organisms at the end and finally, the fish (*Danio rerio*) were fed with microcrustaceans, in the period of 5 days, reaching a final concentration of  $0.62 \times 10^{-8} \mu\text{g}$  heptachlor/ $\mu\text{g}$  organisms. In the last 9 days, during the period of depuration, the fish were fed in days intercalated with microcrustaceans and ration without contamination with the product, reaching a final concentration of  $0.25 \times 10^{-8} \mu\text{g}$  heptachlor/ $\mu\text{g}$  organisms. In tests carried out with these three organisms, it was observed that the concentration was bigger as higher the level inside of the considered model, thus proving the hypothesis of the bioaccumulation, biomagnification, and depuration power of heptachlor.

Keywords: Biomagnification; Accumulation; Depuration; Trophic levels.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Vista interior de um aquário e das concentrações do teste agudo .....	34
Figura 2 - Experimento com algas de acumulação .....	38
Figura 3 - Aquários com experimento das dáfnias e separação dos organismos com peneira .....	40
Figura 4 - Experimento com peixes de acumulação e depuração .....	41
Figura 5 - Evolução da concentração de heptacloro em algas mantidas em água contaminada (meio de cultivo L. C. Oligo) com heptacloro .....	50
Figura 6 - Evolução da concentração de heptacloro em dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro .....	52
Figura 7 - Evolução da concentração de heptacloro em peixe alimentados com dáfnias contaminadas com heptacloro .....	53
Figura 8 - Concentração final do produto nos níveis da cadeia alimentar estudada .....	56

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Valores encontrados de concentração máxima, fator de bioconcentração, fator de biomagnificação e tempo de meia vida para os organismos experimentais .	44
Tabela 2 - Concentrações e períodos em que foram expostos os organismos à substância teste e avaliação da mortalidade .....	48
Tabela 3 - Valores diários das concentrações de heptacloro na água de cultivo dos três organismos .....	49
Tabela 4 - Concentração do heptacloro em algas, massa e valores do crescimento celular	50
Tabela 5 - Concentração do heptacloro em dáfnias e valores da massa dos organismos ...	51
Tabela 6 - Concentração do heptacloro em peixes durante a acumulação e valores da massa dos organismos .....	53
Tabela 7 - Concentração do heptacloro em peixes durante a depuração e valores da massa dos organismos .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

Os inseticidas representam um grupo de praguicidas que tradicionalmente são utilizados em grande escala contra um elevado número de pragas. Muitos estudos específicos relacionados com a exposição de organismos aos pesticidas, em especial aos compostos organoclorados, são feitos visando avaliar os efeitos ecotoxicológicos. As atividades antrópicas, principalmente nas sociedades modernas, geram diversos tipos de poluentes que atingem principalmente os ambientes aquáticos. Com o advento da agricultura produtivista introduziu-se agressivamente o emprego de fertilizantes e agrotóxicos que resultaram no aumento da produtividade, mas também trouxeram conseqüências adversas, como resíduos no solo, água e ar, e nos tecidos vegetais e animais. Entretanto, é inegável a importância dos agroquímicos na economia mundial, tendo em vista o contínuo crescimento da população humana e por conseguinte a demanda por alimento. Muitos pesticidas não são particularmente efetivos apenas no controle de pragas e doenças que pretendam combater, mas também podem atingir as pessoas através dos alimentos e a vida selvagem; ou seja, atingem as populações consideradas não-alvo. Os pesticidas têm poluído seriamente as reservas superficial e subterrânea de água potável, em muitas áreas. Há algum tempo, um ramo da toxicologia conhecida como Ecotoxicologia vem estudando e monitorando o comportamento de pesticidas no ambiente, assim como seus efeitos sobre organismos terrestres e aquáticos. Essa ferramenta científica faz-se necessária no sistema de produção para fins de certificados, relatórios técnicos e análises que atestarão a melhor qualidade do produto agrícola (selo verde), bem como das práticas produtivas mais perenes e sustentadas, subsidiando desse modo o poder decisório de órgãos fiscalizadores como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA).

Em organismos aquáticos pode ocorrer a bioacumulação, ou seja, a transferência cumulativa de contaminantes do meio externo para o organismo, no qual as concentrações observadas são muito superiores que as do meio. Os pesticidas são assimilados por intermédio de diferentes rotas – ar, água, solo e sedimento – processos estes que dependem de fatores ambientais e fisiológicos (AZEVEDO; CHASIN, 2003; D'AMATO et al., 2002).

Em determinados ecossistemas aquáticos pode ocorrer a biomagnificação dos organoclorados que atingem de forma direta ou indireta os corpos receptores, que são absorvidos

pelos produtores e consumidores primários, passando para os consumidores secundários, e assim por diante. Como cada organismo de um nível trófico superior geralmente alimenta-se de diversos do nível inferior, o organoclorado tende a se concentrar nos níveis superiores.

Os riscos ocasionados pelos pesticidas à integridade do ambiente e a seus organismos dependem de muitos fatores: propriedades tóxicas, persistência e mobilidade no ambiente e de certas associações potencialmente perigosas com outros pesticidas ou fertilizantes (MELO; AZEVEDO, 1997).

É importante o monitoramento ambiental, pois organismos representativos são selecionados e fornecem informações a respeito dos ambientes degradados dando subsídios para comparações com estudos de habitats menos afetados, que podem ajudar a avaliar e identificar os danos causados no ambiente. Nesse contexto, pode-se verificar a grande preocupação do meio científico com os efeitos desses compostos químicos sobre o patrimônio genético das populações.

Apesar da prática agrícola perniciosa, no meio científico as preocupações pertinentes à qualidade ambiental foram se ampliando e passaram a despertar o interesse das pessoas, o que gerou a formação de uma consciência sensata evidenciando a necessidade de conservarmos o ambiente, isto é, utilizarmos os recursos naturais de acordo com a nossa necessidade, causando o mínimo de impacto possível.

O heptacloro é um inseticida organoclorado altamente persistente no meio e moderadamente tóxico (classe II) na classificação toxicológica da Environmental Protection Agency (EPA). Em 1988, todos os usos do heptacloro nos Estados Unidos foram cancelados por aquela agência. Essa fase começou em 1978, com um único uso comercial permitido, para o controle das formigas do fogo. O heptacloro ainda está disponível fora dos Estados Unidos, o qual produz efeitos altamente tóxicos em organismos de ambientes aquáticos, como vertebrados, invertebrados e algas (EXTOXNET, 1996). Banido no primeiro mundo, pertencente a um grupo chamado Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) causa sérios riscos à saúde e também apresenta forte impacto ambiental. No Brasil é permitido o uso restrito do heptacloro para preservação de madeiras, e estas devem possuir registro junto ao IBAMA.

A presença dos organoclorados no ambiente indica a utilização desses até os dias atuais, uma vez que não podemos descartar a possibilidade da venda clandestina de alguns desses produtos, cuja eficácia no combate às pragas é inegável. Por outro lado, o uso persistente desses agentes químicos ao longo do tempo pode com certeza tornar-se um risco, sendo necessária a

monitoração e vigilância constantes desses produtos, principalmente em águas e sedimentos. Existe uma ampla variedade de testes de toxicidade estabelecidos, sendo que alguns se encontram padronizados em níveis nacional e internacional por associações ou organizações de normalização. Até o momento não existe nenhum protocolo nacional ou internacional que possa estudar o efeito de uma substância cumulativa através da cadeia trófica. Entretanto, esse instrumento de monitoramento da saúde ambiental das áreas no entorno dos sistemas de produção agrícolas não se encontra ainda disponibilizado em nosso país.

A ANVISA determina limites máximos de resíduos (LMR) em água dependendo do seu destino. Segundo Dores e Freire (2001), não há nível permissível para pesticidas em água, quando pode ocorrer a biomagnificação, sendo que, dentre estes estão alguns pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos.

O cenário esperado foi evidenciar a passagem do pesticida pelos organismos de forma direta e indireta; portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a  $CL_{50}$  96 horas (concentração letal que mata 50% dos organismos) para peixes, analisar a ocorrência da acumulação, biomagnificação e o poder de eliminação por peixes do heptacloro em ambiente aquático. Para isso, foram realizados ensaios específicos de laboratório em compartimentos individualizados, com três organismos representativos da cadeia alimentar aquática, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o microcrustáceo *Daphnia magna* (dáfínia), e o peixe *Danio rerio* (paulistinha).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Poluição do meio aquático**

A contaminação dos recursos hídricos com resíduos de pesticidas pode colocar em risco não apenas os seres humanos, mas também a biodiversidade aquática. A utilização dos agrotóxicos no Brasil, do ponto de vista ambiental e principalmente de saúde pública, tem determinado um forte impacto negativo, com a possibilidade de contaminação de vários ambientes.

Os praguicidas podem entrar no meio aquático de forma direta e indireta; as principais fontes são, provavelmente, o uso na agropecuária, o esgoto industrial e municipal e o controle de ervas aquáticas e insetos. Podem contaminar de forma acidental, por ocorrência de acidentes em depósitos ou durante o transporte de pesticidas, ou ainda por descarte inadequado de embalagens usadas (DORES et al., 1999; SOUZA et al., 1988; LENARDÓN et al., 1998; ESPÍNDOLA et al., 2000; MATSUI, 2002; ELLGEHAUSEN et al., 1979).

A biota aquática é um importante meio para metabolizar organoclorados. É muito documentado o processo de biomagnificação, a presença destes pode aumentar a concentração no nível trófico mais elevado da cadeia, como os peixes que apresentam altas concentrações, chegando à espécie humana. O acúmulo desses pesticidas pode acarretar desequilíbrio nas comunidades causando danos irrecuperáveis (D'AMATO et al., 2002).

Existe uma preocupação por parte do Canadá e dos Estados Unidos pela prevenção da poluição nos Grandes Lagos, que se tornaram um dos corpos hídricos mais estudados do mundo, quanto às origens, transporte e destino dos pesticidas orgânicos (MATSUI, 2002).

Muito considerado é no meio científico o conhecimento da qualidade dos recursos hídricos, sendo também preocupante a redução na disponibilidade de água com qualidade e características que suportem as necessidades do ser humano, da fauna e flora.

### **2.2 Contaminação ambiental por pesticidas organoclorados**

As bifenilas policloradas (PCBs) é o nome genérico dado à classe dos organoclorados resultante da reação do grupo bifenila com cloro anidro na presença de catalisador. Foram



sintetizados inicialmente por volta de 1800 na Alemanha, porém sua produção em escala industrial foi iniciada a partir de 1922 (PENTEADO; VAZ, 2001).

Vários inseticidas organoclorados foram utilizados de forma indiscriminada na década de 60 em razão da eficiência destes no controle de pragas. Esses inseticidas são bastante persistentes e bioacumulativos, de forma que, mesmo tendo sido seu uso proibido pela legislação brasileira há vários anos, em diferentes localidades, ainda hoje se constata níveis elevados de contaminação (CHAGAS et al., 1999; ROBINSON et al., 1967).

Em 1985 proibiu-se em todo o território nacional a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária. Mas os inseticidas organoclorados continuaram sendo permitidos em campanhas de saúde pública no combate de vetores de agentes transmissores de doenças (malária e leishmaniose), bem como em uso emergencial na agricultura, a critério do Ministério da Agricultura (D'AMATO et al., 2002).

Os principais efeitos das possíveis fontes de contaminação no ambiente aquático pelos pesticidas organoclorados são observados quando estes compostos químicos são aplicados no controle de pragas na agricultura e que causam problemas à saúde pública. A contaminação das águas pode ocorrer de forma direta pelos pesticidas em superfícies de córregos, lagos e rios, mas de forma indireta quando carregados a partir de solos contaminados pela aplicação destes agrotóxicos no combate às pragas (DORES et al., 1999; MATSUI, 2002; SOUZA et al., 1988).

Um exemplo da distribuição dos resíduos de pesticidas nos ecossistemas é a detecção de resíduos de pesticidas organoclorados no Ártico. Embora esses produtos tenham sido usados em maior parte em regiões mais próximas do Equador, praticamente todos os organoclorados detectados em latitudes mais baixas foram também detectados no ambiente Ártico, ainda que em pequenas concentrações (AYOTTE, 1995). Outro exemplo mais próximo é o estudo realizado por Silva (2000), quando avaliou compostos organoclorados na Bacia do Rio Piracicaba, devido ao elevado índice de crescimento da região e intensa utilização dos recursos hídricos. Em sua pesquisa, Silva (2000) observou que as concentrações encontradas em bivalves foram maiores que no sedimento.

A passagem de um composto por vários elos da cadeia alimentar recebe o nome de biomagnificação. Assim, a concentração do composto que existia na água, mesmo que pequena, tornar-se-á maior conforme se avançar na cadeia alimentar. Devemos, no entanto, considerar que os diversos animais que compõem uma cadeia alimentar podem também participar de outras,

formando-se, dessa forma, uma rede complexa que torna o fato ainda mais grave. Os organoclorados, objetivo do presente estudo, são muito pouco biodegradáveis, tornando-se, portanto, contaminantes encontrados em ambientes terrestres e aquáticos por muitos anos (ALY, 1984; GORBA et al., 2001; HANAZATO, 2001; MATSUI, 2002). O potencial de biomagnificação de uma cadeia trófica é determinado entre outras características pela lipofilicidade da molécula do organoclorado e pela estrutura e dinâmica de cada organismo receptor (PENTEADO; VAZ, 2001). Essas moléculas, quando absorvidas pelo homem direta ou indiretamente persistem, em geral, por muitas décadas e podem apresentar altos índices no organismo (DAVIS; BRADLOW, 1996); acumulam-se no tecido adiposo e são lentamente eliminados pelas fezes e urina. Nas mulheres, a lactação é a principal via de excreção (ADAMI et al., 1995). Freguglia (2003), em seu estudo sobre a detecção de organoclorados em leite, avalia que diante dos níveis de contaminação e das vantagens associadas ao aleitamento materno fica um alerta às autoridades sobre a presença de contaminantes que, apesar de dentro dos limites, não poderiam estar presentes no leite humano.

Os compostos organoclorados caracterizam-se por apresentarem baixa degradabilidade biótica e abiótica. Eles têm em comum alta estabilidade química, baixa solubilidade em água, mas são solúveis em compostos orgânicos. Esses produtos são relativamente inertes frente a ácidos e bases, e sob a luz solar podem formar compostos com estabilidade similar ou maior que o composto original. A distribuição dos organoclorados para o meio aquático depende do ecossistema, do coeficiente de partição do pesticida, do tipo de sedimento, das propriedades físico-químicas do pesticida e da pressão de vapor (GORBA et al., 2001; MATSUI, 2002; PENTEADO; VAZ, 2001; RUSAFSA et al., 2000; SILVA, 2000).

A despeito do grande número de trabalhos realizados em regiões de clima temperado sobre contaminação aquática por agrotóxicos, em regiões tropicais tais estudos têm sido negligenciados. No Brasil, muito pouco tem sido feito nesse campo; porém, parece estar havendo recentemente uma maior preocupação devido ao avanço das pesquisas nesta área, abrangendo grande parte do território brasileiro (SOUZA et al., 1988).

### 2.3 Heptacloro

Dos pesticidas, os que acarretam maior risco em termos de impactos sobre os ecossistemas aquáticos foram e continuam sendo os produtos orgânicos que contém cloro. Os principais motivos são sua toxicidade e as propriedades químicas que os tornam persistentes no ambiente aquático por longo tempo. Essa persistência provoca seu acúmulo na cadeia alimentar, devido à bioacumulação em tais níveis que podem causar efeitos nocivos. O destino dos pesticidas organoclorados nos ecossistemas aquáticos tem importância crítica em seus impactos potenciais sobre a biota, inclusive em seres humanos (MATSUI, 2002).

O heptacloro puro é um sólido branco cristalino, praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, com leve odor de cedro, sendo usado quase que exclusivamente como formicida e cupinicida. É altamente persistente no meio, sendo oxidado a epóxido e/ou epoxiheptacloro. Foi isolado do clordane técnico em 1946 (EXTOXNET, 1996; MARICONI, 1963; MONTGOMERY, 1997; ROBERTS; HUTSON, 1990). Atualmente, o uso do heptacloro no Brasil é proibido, sendo permitido o uso limitado para usinas de tratamento de madeiras e usuários de preservativos de madeira cadastrados junto ao IBAMA (ANVISA, 2002).

Muitas espécies de peixes foram testadas e o produto foi considerado altamente tóxico para a maioria, pois a  $CL_{50}$  96 horas ficou em torno de 5,3 a 23,0  $\mu\text{g/L}$ . O heptacloro é considerado altamente tóxico aos invertebrados aquáticos (EXTOXNET, 1996).

Em um modelo de ecossistema contendo plâncton, microcrustáceos (*Daphnia magna*), larvas de mosquito (*Culex pipiens quinquefasciatus*), peixes (*Cambusia affinis*), algas (*Oedogonium cardiacum*), e caracol (*Physa* sp.), foi observado por um período de 4 a 7 dias que o heptacloro (5 a 10  $\text{mg/L}$ ) apresentou-se persistente para degradação, pois se instala como resíduo na água (MONTGOMERY, 1997).

### 2.4 Biomagnificação em ambiente aquático

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos por pesticidas tem crescido no meio científico. Uma delas é a bioacumulação, que é o processo com o qual substâncias químicas são absorvidas e retiradas pelos organismos, diretamente da água ou através da ingestão de alimentos. Segundo Jonsson et al. (2001), a bioacumulação de pesticidas em ambiente aquático

ocorre se a taxa de assimilação da substância química exceder a taxa de eliminação. Portanto, a bioacumulação pode levar à biomagnificação, que é o processo pelo qual uma substância é absorvida por um organismo aquático por intermédio da cadeia alimentar e apresenta concentrações cada vez maiores nos diversos organismos, de acordo com seu nível trófico. (BORGA et al., 2001; EXTTOXNET, 1996; MATSUI, 2002; MURTY, 1986; ROBERTS; HUTSON, 1990; RUSAFSA et al., 2000). Portanto, o conceito de biomagnificação só pode ser aplicado aos organismos aquáticos quando estes obtêm os compostos xenobióticos através dos resíduos presentes na alimentação (AZEVEDO; CHASIN, 2003; MELO; AZEVEDO, 1997).

O composto poluente é absorvido pelo organismo através do meio biótico e abiótico, e a concentração pode ou não exceder a fonte. Na acumulação e possível transformação do agente toxicante dentro de um compartimento biológico, para a transferência na cadeia alimentar, este pode apresentar um efeito significativo em termos de impacto ambiental (D'AMATO et al., 2002; MCINTYRE; MILLS, 1974). Vários fatores influenciam a bioacumulação dos xenobióticos, como processos biológicos (ecologia alimentar, hábitos, fisiologia e bioquímica das espécies) e composição quali-quantitativa de compostos químicos no ambiente (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Quando um agente tóxico que não se degrada é colocado em um ecossistema pode permanecer ali ou seguir vários caminhos. O pesticida pode ser transportado pelas águas das chuvas até um lago ou manancial e ser absorvido por bactérias, algas e outras pequenas plantas que irão servir de alimento para moluscos, crustáceos e larvas, que por sua vez, serão consumidas por répteis e diferentes peixes que também servirão de alimento às aves e mamíferos, dentre os quais até o próprio homem. Por outro lado, bovinos que se alimentarem em uma pastagem absorverão e acumularão diretamente esses agrotóxicos. Desta forma, ao se alimentar com a carne ou com o leite desses animais, o homem estará ingerindo juntamente aquele toxicante presente na pastagem que pode causar efeitos adversos à saúde humana e levar a intoxicações sérias ou até mesmo à morte (CASTRO; PALERMO-NETO, 1987).

A primeira evidência de biomagnificação na vida selvagem foi introduzida por Rachel Carson em seu livro "Silent Spring", indicando que a mortalidade de andorinhas americanas estava relacionada à presença de DDT em minhocas. No combate a mosquitos do lago Clear (EUA), em 1954, foi administrada uma dose de um litro de inseticida para 50.000 metros cúbicos de água; meses depois, aves (mergulhões) que apareciam no inverno por causa da grande

quantidade de peixes do lago, começaram a morrer. Examinadas as partes graxas de várias aves mortas, havia nelas DDD na fantástica proporção de 1.600 ppm, levando em consideração que a concentração máxima que existiu na água foi de 0,02 ppm. Verificou-se também que o plâncton continha perto de 5 ppm, 25 vezes o máximo de concentração conseguida na água. Guiados pelo fato de os mergulhões se alimentarem de peixes, foram examinados peixes herbívoros que tinham armazenado concentrações de 40 ppm a 300 ppm; os carnívoros guardavam muito mais, 2.500 ppm, como aconteceu com um peixe da família dos bagres. Concluiu-se que o DDD foi transportado pelo plâncton, que passou para os peixes e em seguida para as aves, acumulando-se cada vez em maior quantidade, e que o fato de ter sido aplicado à água em concentrações muito baixas não impediu aquela imprevisível explosão que teve lugar na extremidade da cadeia biológica. A biomagnificação depende muito da cinética dos pesticidas, representada pela taxa metabólica e de excreção dessas substâncias tóxicas pelos organismos (CARVALHO, 1975; MATSUI, 2002).

O acúmulo de um pesticida no organismo começou a despertar interesse nos anos 60, quando esse fenômeno tornou-se evidente. Cientistas de várias partes do mundo encontraram em espécies do topo da cadeia níveis de intoxicação bem maiores que em suas presas. Esse acúmulo foi constatado nos tecidos gordurosos de animais e do homem, porque são solúveis em gorduras e não são facilmente degradados pelos organismos. Baixos níveis de um pesticida persistente podem levar a altos níveis de contaminação (COSTA, 1998/99; MELO; AZEVEDO, 1997; ROBINSON et al., 1967).

Segundo D'Amato et al. (2002), o processo de biomagnificação através da cadeia alimentar apresenta altas concentrações nos organismos de nível trófico mais elevado, como os peixes carnívoros. Assim, além dos efeitos tóxicos dos pesticidas organoclorados a humanos, a possibilidade de espécies de níveis tróficos mais elevados serem afetadas pode acarretar desequilíbrio na estrutura das comunidades.

Os pesticidas provocam sérios danos sobre o ambiente e ocasionam múltiplos impactos, incluindo-se moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (HANAZATO, 2001; MOZETO, 2001). O zooplâncton é muito utilizado como fonte de alimento e ocupa um lugar central na cadeia alimentar. Esse grupo apresenta muita sensibilidade a produtos químicos, e a resposta a testes de toxicidade com esses organismos é muito representativa. Segundo

Hanazato (2001), o zooplâncton conduz a toxicidade de pesticidas para diferentes níveis de organização e para vários indivíduos de uma comunidade.

Em peixes e macroinvertebrados bentônicos o pesticida prossegue com sua taxa normal, isto é, o impacto é conduzido pelos outros biotransformadores. Para saber se um determinado pesticida bioacumula ou não, trabalhar com um experimento de laboratório é mais confiável, pois a temperatura, luminosidade e outros parâmetros físico-químicos de exposição são fáceis de serem controlados e de se estimar o efeito do produto em estudo. Já em estudos de campo, as variáveis não podem ser controladas, como temperatura, pH, disponibilidade de alimento, e a perda de organismos. Nestes as variantes são bem mais difíceis de serem interpretadas e o custo é muito elevado (ROBERTS; HUTSON, 1990; USEPA, 1992).

Há uma gama enorme de discussões e modelos propostos para biomagnificação, entretanto, tais estudos revelam que esse não é um fenômeno de ocorrência universal. Existem poucos exemplos até agora na natureza, fatores assim surgem quando há uma exposição direta do produto aos organismos aquáticos, quando ocorre a transferência para os níveis tróficos superiores. Portanto, parece aconselhável abster-se de usar o termo biomagnificação, exceto num exemplo que prove essa ocorrência (MURTY, 1986).

Existem poucos estudos realizados em condições controladas de laboratório, a maior parte dos trabalhos referentes a biomagnificação são realizados de acordo com a pesquisa bibliográfica listada, em ambientes abertos, ou seja, no campo.

## **2.5 Depuração em ambiente aquático**

Além dos experimentos realizados de bioacumulação e biomagnificação são executados testes para se avaliar a cinética de eliminação do produto assimilado. Nesse processo em que são submetidos certos organismos, a fim de que eliminem partículas indesejáveis, é denominada depuração (ACIESP, 1997).

Na primeira fase a maioria dos compostos é armazenada nos organismos e no ambiente. A função dos sistemas metabólicos presentes na maioria dos seres vivos é a de protegê-los contra substâncias estranhas, denominadas xenobióticos, provenientes do meio ou dos alimentos (DORES et al., 1999).

Numa segunda fase, transferem-se os organismos contaminados para um recipiente com água (ou meio de cultivo) limpa e avalia-se durante um período de tempo a eliminação do produto. Durante as fases de assimilação e depuração são realizadas análises químicas para determinação da concentração analítica do produto na água e nos tecidos dos animais (EPA, 1996; MURTY, 1986; OECD, 1996; SÁFADI, 1995).

A eliminação de resíduos de pesticidas depende dos grupos atômicos substituintes. Aqueles com poucos átomos de cloro e baixo valor de Kow são mais rapidamente excretados, enquanto que aqueles com grande quantidade de átomos de cloro na molécula são excretados mais lentamente. A assimilação de resíduos de pesticidas em peixes ocorre rapidamente; no entanto, levam um tempo maior para serem eliminados do organismo (MURTY, 1986; PENTEADO; VAZ, 2001). Dentre os parâmetros que afetam esse processo incluem-se lipofilicidade, solubilidade em água, grau de ionização, estabilidade química e tamanho molecular (SERRANO et al., 1997).

## **2.6 Modelos matemáticos em ecotoxicologia**

É muito importante o entendimento de novas metodologias para reparar os efeitos dos pesticidas com relação ao ambiente. Modelos distintos são elaborados para descrever e prever o grau de bioacumulação. Cada tipo de bioacumulação é avaliado diferentemente, dependendo da espécie selecionada e do xenobiótico estudado (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Os modelos matemáticos são utilizados principalmente para indicar o efeito das substâncias em nível de populações e inclui a transformação de uma concentração em um efeito. Para isso, é necessário obterem-se informações sobre a substância tóxica, buscar na literatura os parâmetros sobre o efeito no ambiente, estimar e comparar os resultados (MATSUI, 2002). O modelo experimental procura simular concretamente as características e a composição dos sistemas ambientais. Permitem representar as alternativas propostas e simular cenários reais que poderiam ocorrer (CHRISTOFOLETTI, 1999). No entanto, a utilização de um modelo nem sempre dispensa conhecimentos maiores a respeito dos processos e eventos que estão sendo simulados e, não obstante, sua intervenção para que a simulação seja a mais próxima possível da realidade (JAMES; HUNTLEY, 1990).

O objetivo principal da modelagem não é produzir uma cópia exata do ecossistema, mas sim tentar reproduzir as características relevantes para o tratamento de uma determinada questão, podendo o ecossistema ser modelado de diferentes maneiras, de acordo com as informações disponíveis e o propósito do estudo (SILVA, 2003).



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de investigação**

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, localizado em Piracicaba – São Paulo.

#### **3.2 Substância teste**

Para a execução dos ensaios foi utilizado como substância teste o heptacloro, conforme estabelecidas por EXTOXNET (1996); Roberts e Hutson (1999) e Tomlin (2000 - 2001). Nome comum: heptacloro. Nome químico: 1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoindene. Número do CAS: 76-44-8. Peso molecular: 373,3. Log  $K_{ow}$ : 5,44. Fórmula molecular:  $C_{10}H_5Cl_7$ . Solubilidade em água: 0,056 mg/L (25 a 29°C). Persistência: 7 a 12 anos (DONALD, 1998). Estável a luz do dia, ar, umidade e temperatura moderada. Informações segundo o Institute of Isotops C.O. Ltd (IZOTOP) do heptacloro radiomarcado. Atividade: 1,58 MBq/mg. Pureza radioquímica: 95%.

#### **3.3 Bioética e descarte de resíduos**

Todos os rejeitos radioativos gerados no projeto de pesquisa no Laboratório de Ecotoxicologia foram armazenados numa sala de depósito adequada para esse fim, suficientemente afastada da área de trabalho. O local é rigorosamente controlado pelo técnico responsável, ou seu substituto. O acesso é limitado ao pessoal com permissão de manuseio de material radioativo.

Os resíduos sólidos foram colocados em recipientes plásticos com tampa de rosca e devidamente etiquetados. Os resíduos secos (sólidos) foram colocados em sacos plásticos separados, devidamente fechados e etiquetados. Os resíduos líquidos, geralmente de baixa atividade (menos de 0,1  $\mu$ Ci/litro solução) foram armazenados em frascos de boca larga devidamente rotulados. A solução aquosa foi analisada quanto à radioatividade (dpm) e descartada no esgoto comum. Essa solução só era descartada se o valor encontrado fosse

estatisticamente igual ao controle BG (back ground). Papel absorvente, luvas e demais materiais utilizados nos experimentos foram armazenados em sacos plásticos duplos e fechados.

Solução cintiladora: A atividade de trabalho deste projeto de pesquisa ficou abaixo do limite de descarte proposto pela Comissão Nacional de Energia Nuclear ( $20 \text{ } \eta\text{Ci/mL}$ ), mas o solvente orgânico (tolueno) contido na solução cintiladora é tóxico. Assim, para evitar o descarte direto na rede de esgoto, a solução cintiladora foi transferida do “vial” de cintilação para frascos de 4 ou 10 litros para futura destilação e recuperação do tolueno.

Solução de trabalho: Os restos das soluções de trabalho (solução estoque) foram de pequenos volumes, por isso colocados em frascos de vidro de 10 mL, rotulados e armazenados no freezer e geladeira, dentro do laboratório, pois podem ser reutilizados em trabalhos posteriores, caso seja necessário.

Resíduos contaminados: Consideramos todos e quaisquer rejeitos como contaminados a partir do momento que entram em contato direto com a solução radioativa (papel absorvente, parafilmes e ponteiras). Esse material é coletado no lixo destinado ao material radioativo e o armazenamento feito em sacos plásticos duplos pretos devidamente etiquetados.

Resíduos possivelmente contaminados: A atividade dos materiais utilizados na manipulação das soluções radioativas foi monitorada com o Geiger-Müller de janela larga e, dependendo da atividade, foram descartados ou armazenados adequadamente (em sacos plásticos e etiquetados).

O local de armazenamento de rejeitos radioativos se localiza próximo ao Laboratório de Ecotoxicologia, porém suficientemente afastado das áreas de trabalho para evitar exposição desnecessária do trabalhador, com acesso apenas pelo lado externo do prédio. Apresenta uma área de  $12 \text{ m}^2$  com sistema de exaustão para eventuais acidentes que possam gerar gazes e vapores.

O recebimento, estocagem e controle de todo material radioativo foram registrados em formulário próprio preparado para essa finalidade, assim como as medidas de proteção são controladas por um responsável designado pelo Diretor do CENA.

### 3.4 Organismos teste

Para a execução deste estudo foram utilizadas três espécies distintas da cadeia alimentar aquática, algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), microcrustáceos (*Daphnia magna*) e peixes (*Danio rerio*).

#### 3.4.1 Algas

As microalgas são muito utilizadas em testes de toxicidade devido à sua importância ecológica, uma vez que formam a base da cadeia alimentar, transformando a matéria inorgânica em orgânica. Esses organismos possuem sensibilidade a substâncias tóxicas e relativa facilidade de cultivo em laboratório. Uma das espécies mais utilizadas em testes de toxicidade é a *Pseudokirchneriella subcapitata*, pois apresenta sensibilidade às mudanças ambientais e seu crescimento pode ser inibido ou mesmo estimulado pela presença de contaminantes químicos (CETESB, 1990a). Atualmente a produção de algas tem objetivos bastante variados, como tratamentos de esgoto e efluentes orgânicos, produção química comercial, aquíicultura, bioconservação da energia solar, dentre outros (TAVARES; ROCHA, 2003).

O meio de cultivo L. C. Oligo CETESB, (1989) e AFNOR, (1980) foi utilizado para a manutenção do cultivo e execução do experimento com algas. Também as algas cultivadas foram usadas para alimentação do cultivo dos microcrustáceos.

Segue abaixo o método de preparo das soluções estoque e do meio de cultivo que se procedeu conforme normas citadas no parágrafo anterior.

##### 3.4.1.1 Soluções estoque

Solução 1 - 4 g de  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}] + 100 \text{ mL}$  água desionizada

Solução 2 - 10 g de  $\text{KNO}_3 + 100 \text{ mL}$  água desionizada

Solução 3 - 4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} + 100 \text{ mL}$  água desionizada

Solução 4 - 4 g de  $K_2HPO_4$  + 100 mL água desionizada

Solução 5 - 30 mg de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  + 60 mg de  $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$  + 60 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  + 60 mg de  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$  + 60 mg de  $Mn (NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$  + 60 mg de  $(H_3 C_6H_5O_7 \cdot H_2O)$  + 60 mg de  $H_3BO_3$  + 100 mL água desionizada

Solução 6 - 1,625 g de  $(C_6H_5FeO_7 \cdot 5 H_2O)$  + 0,625 g de  $(FeSO_4 \cdot 7 H_2O)$  + 0,625 g de  $(FeCl_3 \cdot 6 H_2O)$  + 100 mL água desionizada

Solução 7 - 15 de  $(NaHCO_3)$  + 100 mL água desionizada

### **3.4.1.2 Preparo e condições do meio de cultura**

Em 994 mL de água desionizada foram adicionados 1 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 7 e das soluções 5 e 6 foram adicionados 0,5 mL. Todas as soluções foram pipetadas sob agitação. Quando necessário, o pH foi ajustado com solução de HCl ou NaOH 1N para  $7,1 \pm 0,1$ . O cultivo foi realizado sob luz fria contínua (ambiente de laboratório), com temperatura variando de 24 a 26°C.

### **3.4.1.3 Determinação da densidade algal**

Na determinação da densidade algal foi utilizada a Câmara de Neubauer, para precisar a quantidade de células que foi usada no experimento com algas e alimentação dos microcrustáceos.

Foram utilizadas uma câmara e uma lamínula, e esta foi colocada na área central. Usando uma pipeta Pasteur, foi adicionada uma gota da amostra homogeneizada (agitação) na parte em “V” da superfície central da lâmina. Enchidas ambas as câmaras observou-se a igualdade de distribuição das células no microscópio e deixou-se as células sedimentarem por 3 a 5 minutos antes de ser realizada a contagem (TAVARES; ROCHA, 2003).

As células foram quantificadas no sub-retículo central 5/25, dos dois retículos da câmara. A leitura foi efetuada em microscópio óptico com aumento de 160 a 200 vezes (CETESB, 1999). Foi calculada a média e utilizada a seguinte fórmula, segundo Tavares e Rocha (2003):

$$D \text{ (células/mL)} = \frac{\text{número de células contadas}}{10 \times 4 \times 10^{-6}}$$

Em que:

10 = dez quadrados de duas câmaras

$4 \times 10^{-6}$  = volume de amostras sobre a área dos pequenos quadrados, a qual equivale a  $0,004 \text{ mm}^3$ . A densidade final é expressa em  $\text{cm}^3$  (mL).

A partir desses resultados foi calculado o volume (número de células) adicionado no experimento ou alimentação dos microcrustáceos.

### 3.4.2 Microcrustáceos

Os microcrustáceos têm um importante papel na cadeia trófica aquática, como consumidores de algas; também são uma importante fonte de alimento para consumidores secundários, invertebrados e vertebrados. Se ocorrer alguma mudança na população e no comportamento desses organismos podem interferir significativamente nos outros níveis tróficos do ecossistema aquático. São mundialmente utilizados em testes ecotoxicológicos. A *Daphnia magna* é uma das espécies oficialmente aceitas para o monitoramento de efluentes, registro de pesticidas e novas formulações químicas. Reproduz partenogeneticamente, com período de vida e reprodução relativamente curtos; entre os daphnideos é o de mais fácil manuseio e cultivo em laboratório (LORENZETTI; ARAÚJO, 1999; MARANHO; NIEWEGLOWSKI, 1995).

#### 3.4.2.1 Sala de cultivo

A sala isenta de contaminantes e climatizada ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), foi controlada diariamente. O fotoperíodo foi regulado para 16 horas luz e 8 horas escuro.

### 3.4.2.2. Meio de cultivo

Foi utilizada água reconstituída de boa qualidade com condutividade menor que  $10 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$  (Meio M4) desenvolvida por Elendt e Bias (1990), preparada a partir de água “Milli-Q” acrescida de sais, com dureza total de  $250 \pm 25 \text{ mg/L CaCO}_3$  e pH de 7 a 8 (Água preconizada pela OECD, 1998) e condutividade de  $300 \pm 25 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4.2.3 Soluções estoque

Solução 1 - 73,52 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 1000 mL de água bidestilada

Solução 2 - 123,3 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  + 1000 mL de água bidestilada

Solução 3 - 5,8 g de  $\text{KCl}$  + 1000 mL de água bidestilada

Solução 4 - 64,8 g de  $\text{NaHCO}_3$  + 1000 mL de água bidestilada

Solução 5 - 7210 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  + 6120 mg de  $\text{LiCl}$  + 1420 mg de  $\text{RbCl}$  + 3040 mg de  $\text{SrCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 335 mg de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 260 mg de  $\text{ZnCl}_2$  + 200 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 1000 mL de água bidestilada

Solução 6 - 5719 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 32 mg de  $\text{NaBr}$  + 126 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 6,5 mg de  $\text{KI}$  + 4,38 mg de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  + 1,15 mg de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  + 548 mg de  $\text{NaNO}_3$  + 1000 mL de água bidestilada

Solução 7 - 21,465 mg de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  + 1000 mL de água bidestilada, deixado em agitação até o clareamento da solução.

Solução 8 - 500 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 199,1 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Foram preparadas as soluções separadamente, cada uma com 500 mL de água bidestilada. Logo após

foram misturadas as duas soluções e levadas imediatamente para autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Solução 9 - 286 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 368 mg de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 1000 mL de água bidestilada.

Solução 10 - 750 mg de Thiamina + 10 mg de  $\text{B}_{12}$  (Cianocobalamina) + 7,5 mg de Biotina + 1000 mL de água bidestilada. Estocada em freezer em pequenas porções que foram descongeladas na hora do preparo do meio de cultivo.

#### 3.4.2.4 Preparo do meio de cultivo

Solução estoque 1: 4 mL/L	Solução estoque 6: 0,5 mL/L
Solução estoque 2: 1 mL/L	Solução estoque 7: 0,2 mL/L
Solução estoque 3: 1 mL/L	Solução estoque 8: 5 mL/L
Solução estoque 4: 1 mL/L	Solução estoque 9: 0,5 mL/L
Solução estoque 5: 0,1 mL/L	Solução estoque 0: 0,1 mL/L

As soluções acima foram adicionadas para o volume de um litro de água bidestilada e misturadas em ordem crescente, uma a uma. O meio foi utilizado somente após ficar por um período mínimo de 24 horas em aeração.

As soluções estoque de 1 a 9 foram conservadas em geladeira com temperatura de  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ . E a solução estoque número 10 foi armazenada em freezer com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 3.4.2.5 Alimentação

A partir do meio de cultivo L. C. Oligo foram cultivadas as algas para alimentação dos microcrustáceos. Após o cultivo atingir o ponto ideal de crescimento o conteúdo dos frascos foi levado à centrifugação, durante 5 minutos a 4000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e a massa de algas foi adicionada no meio de cultivo M4 (MARANHO; NIEWEGLOWSKI, 1995). A contagem das células foi realizada e as algas foram mantidas em geladeira numa temperatura  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ .

As culturas foram alimentadas diariamente com um volume algal de  $1 \times 10^7$  células de algas/organismo.

#### **3.4.2.6 Renovação da água de cultivo**

As trocas da água de cultivo foram realizadas a cada segunda e sexta-feira, a qual foi filtrada em algodão para evitar possíveis contaminações.

#### **3.4.3 Peixes**

Dentre as diferentes espécies de peixes utilizados como organismo teste o *Danio rerio* é de pequeno porte e de fácil manuseio. Os adultos atingem um comprimento médio de 4,5 cm, são ovíparos e apresentam listas abdominais (CETESB, 1999). Essa espécie tem sido estudada desde os anos 30 devido à sua facilidade de obtenção, baixo custo e fácil manutenção em laboratório. Esses peixes são de grande interesse nos estudos ecotoxicológicos, pois são consumidores secundários da cadeia alimentar. Esses testes são indispensáveis no monitoramento da poluição hídrica, pois se fundamentam na utilização de organismos vivos que são diretamente afetados pelos pesticidas (VIANA; MARTINS, 1995).

##### **3.4.3.1 Tanque e água de cultivo**

Os organismos foram mantidos em tanques de  $1 \text{ m}^3$ , com volume útil de  $0,8 \text{ m}^3$ . A água utilizada para conservação e no período de teste dos peixes foi de manancial de boa qualidade (nascente), procedente do biotério do Laboratório de Ecotoxicologia. A dureza foi entre 800 e 1000 mg/L  $\text{CaCO}_3$ . A temperatura foi mantida a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . O pH foi na faixa de 7 a 7,5. Condutividade 1000 a  $1300 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ . O tanque foi mantido com permanente aeração.



### 3.4.3.2 Alimentação e limpeza

Os peixes receberam alimentação duas vezes ao dia, de segunda a sexta feira e uma nos finais de semana. Foi fornecida uma quantidade de ração que possibilitou um eficiente e rápido consumo pelos peixes.

O material de fundo foi sifonado uma vez ao dia. Foi mantido um pequeno fluxo de água que garantiu a sua renovação e circulação.

### 3.5 Teste agudo com peixes 96 horas

Esse teste foi feito com o objetivo de se estabelecer a concentração do heptacloro que foi observada no experimento com algas. Para a condução do teste foi utilizada a norma CETESB (1990b) e OECD (1992).

Nos testes agudo preliminar e definitivo foi utilizado o produto técnico com 5 concentrações preparadas a partir de uma solução estoque. Para o preparo das soluções e de todas as etapas do teste foram realizados em ambiente isento de vapores, poeiras tóxicas e em temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Baseadas no resultado do teste preliminar foram determinadas as concentrações utilizadas no teste definitivo, as quais foram: 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 mg/L; controle e controle solvente (Figura 1). A solução estoque do heptacloro foi preparada em balão volumétrico, com 40 mg da substância teste, 5 mL de solvente e completado para um volume de 1000 mL de água de cultivo, obtendo-se assim uma solução estoque de 40 mg/L. Em seguida foram pipetadas as concentrações teste e adicionadas ao volume de quatro litros para aquários com capacidade de 20 litros. Foram colocados no teste peixes que passaram por uma semana de aclimatação, livres de contaminantes e que 24 horas antes do início do estudo não tinham sido alimentados. O teste foi conduzido com duas réplicas por concentração e controles, com 5 peixes em cada. Durante o período do teste o pH foi verificado nos tempos zero, 48 e 96 horas, que ficou com valor médio de 7,7. A condutividade média foi de  $635 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ . A temperatura no meio líquido foi registrada diariamente, e ficou na média de  $24,5^\circ\text{C}$ . Durante o período do teste as concentrações permaneceram em constante aeração. O teste foi avaliado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas para se determinar o valor da concentração que foi usada no experimento.

Foi obtida uma  $CL_{50}$  96 horas igual a 0,89 mg/L para *Danio rerio*; e esse valor foi dividido por dois, desse modo, a concentração de exposição das algas ao heptacloro foi de 0,45 mg/L. Esse valor foi usado para que o pesticida não causasse mortalidades.



Figura 1 - Vista do interior de um aquário e das concentrações do teste agudo

### 3.6 Cultivo fase limpa

Essa fase compreendeu 2 etapas: a primeira com algas, a segunda com microcrustáceos. Esse cultivo foi utilizado como alimento para os peixes no último período do experimento, compreendido como depuração. Essa etapa foi realizada antes da fase contaminada para evitar possíveis contaminações com o produto utilizado. Os organismos foram armazenados em freezer até a utilização dos mesmos no experimento.

#### 3.6.1 Cultivo limpo com algas 7 dias - primeira fase

Em um balão com capacidade de 6 litros foram adicionados 5,5 litros do meio de cultivo para algas (L. C. Oligo) com número aproximado de  $2,5 \times 10^5$  células de algas/litro. O cultivo foi mantido por sete dias, período em que os componentes do meio foram consumidos e quando ocorre o início da fase de declínio da cultura e sob luz fria e vigorosa agitação com aeradores. O pH inicial foi de 7,2 e a temperatura do meio nos dias de experimento variou de 24,5 a 26°C. No final, foram suprimidas a aeração e luminosidade, em seguida, centrifugado a 4000 rpm. Para o

preparo da suspensão algácea para os microcrustáceos as células foram adicionadas ao meio de cultivo para as dáfnias (meio M4). O número de células de algas por mL foi determinado em câmara de contagem de Newbauer. Todo o conteúdo foi dividido em porções e estocado em freezer a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ , os quais foram fornecidas diariamente as dáfnias.

### **3.6.2 Cultivo limpo com dáfnias 9 dias – segunda fase**

Em um aquário com capacidade de 70 litros foram adicionados 65 litros de meio de cultivo para os microcrustáceos. Na seqüência, foram colocados cerca de 1300 dáfnias jovens com idade menor ou igual há 24 horas, que foram coletadas de uma cultura aclimatada. Diariamente os organismos foram alimentados com as algas armazenadas em congelador da primeira fase (cultivo limpo), descongeladas e fornecidas aos microcrustáceos quando atingiram a temperatura ambiente. Foi fornecido o número aproximado de  $1 \times 10^7$  células de algas/dáfnia. O cultivo foi mantido por 9 dias sem agitação e aeração. O período de luminosidade foi de 16 horas luz e 8 escuro. Os organismos foram quantificados e separados em porções que ficaram estocados em freezer a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  e somente foram fornecidos aos peixes no período de depuração.

## **3.7 Montagem do pré-teste**

Baseado na conclusão do teste agudo com peixes foi realizado um pré-teste com o heptacloro técnico, que foi conduzido em três fases. Este permitiu verificar-se que a concentração de 0,45 mg/L inicialmente a que as algas foram expostas não causou mortalidade nos três níveis tróficos trabalhados.

### **3.7.1 Pré-teste com algas 7 dias – primeira fase**

Em um balão com capacidade de 2 litros foram adicionados 0,90 mg do produto, 600  $\mu\text{l}$  de acetona e completado o volume com o meio de cultivo para algas com número aproximado de  $2,5 \times 10^5$  células de algas/litro. A solução foi dividida em dois balões com capacidade de dois litros para que não transbordasse durante a aeração. O cultivo foi mantido por sete dias sob

luminosidade fria e vigorosa agitação com aeradores. O pH inicial foi de 7,1 e a temperatura do meio de cultivo nos dias de experimento variou de 24 a 25,5°C. No final, foram suprimidas a aeração e luminosidade, em seguida centrifugado a 4000 rpm. Para o preparo da suspensão algácea para os microcrustáceos, as células foram adicionadas ao meio de cultivo para as dáfnias (meio M4). O número de células de algas por mL foi quantificado em câmara de contagem de Newbauer. A concentração de 0,45 mg/L não afetou o crescimento das algas; portanto, todo o conteúdo foi dividido em porções e estocado em freezer a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ , e fornecidas diariamente as dáfnias no pré-teste.

### **3.7.2 Pré-teste com dáfnias 9 dias – segunda fase**

Em dois béqueres com capacidade de 4 litros adicionou-se o meio de cultivo para os microcrustáceos. Em seguida, foram colocadas aproximadamente 45 dáfnias jovens em cada um, com idade menor ou igual há 24 horas. Durante os dias de experimento os organismos receberam como alimentação as algas armazenadas em congelador e fornecidas aos microcrustáceos quando atingiram a temperatura ambiente. O número aproximado de algas fornecido diariamente foi de  $1 \times 10^7$  células de algas/dáfnia. O experimento foi mantido sem agitação e aeração por 9 dias. O período de luminosidade foi de 16 horas luz e 8 escuro. Nessa fase não houve mortes ou imobilidade até o último dia.

### **3.7.3 Pré-teste com peixes 5 dias – terceira fase**

Em um béquer de 30 mL foram colocados 0,45 mg de heptacloro técnico com 300 µL de acetona. Essa solução foi adicionada a outro béquer de 40 mL de capacidade, que continha 233 mg de ração. Essa mistura permitiu que toda ração fosse encharcada pelo produto. Esse preparado permaneceu durante 24 horas em recipiente aberto, em sala com temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , para evaporação da acetona. Logo após, a massa de ração foi dividida e embalada em 10 porções de 23,3 mg. Em dois aquários com capacidade de 20 litros foram adicionados 12 litros de água de cultivo dos peixes, e colocados 14 organismos em cada um, aclimatados e alimentados com a ração mais heptacloro. O experimento foi mantido com aeração. O período de luminosidade foi

de 16 horas luz e 8 escuro. Durante os 5 dias não ocorreu nenhuma mortalidade dos organismos expostos.

#### **3.7.4 Pré-teste com peixes 9 dias – quarta fase**

Os nove organismos que restaram de cada aquário da terceira fase foram mantidos nas mesmas condições da fase anterior. Do sexto dia em diante foram alimentados com ração não contaminada. Não houve nenhuma mortalidade ou comportamento atípico dos peixes nesse período.

### **3.8 Montagem do experimento**

Fundamentado nos resultados do teste agudo com peixes e do pré-teste, o experimento foi conduzido em três fases, o que permitiu determinar-se com maior precisão a ocorrência de bioacumulação, biomagnificação e depuração.

#### **3.8.1 Preparo da solução de trabalho**

A solução de trabalho do heptacloro para a contaminação das algas foi de 0,45 mg/L distribuídos em três balões de 6000 mL. O produto técnico usado apresentou 87% de pureza. Foi pesado 9,24 mg e adicionado a 2100 µL de acetona. Em seguida o produto radioativo foi seco em nitrogênio e suspenso em 10.000 µL de acetona, do qual foram pipetados 1000 µL e somados à solução do produto técnico 2100 µL, totalizando assim 3100 µL de solução de trabalho. No aparelho cintilador líquido foi realizada a leitura de três amostras de 1 µL da solução de trabalho mais 10 mL da solução cintiladora, com resultado médio obtido de 535,05 Bq. A atividade específica da solução de trabalho foi de 439,0 Bq/mg.

#### **3.8.2 Experimento com algas 7 dias – acumulação**

Em três balões com capacidade de 6 litros, foram adicionados o meio de cultivo (L. C. Oligo),  $2,5 \times 10^5$  células de algas/litro aproximadamente e 1000 µL da solução de trabalho.

Trabalhou-se com uma concentração e três repetições (Figura 2). O cultivo foi mantido por sete dias, período no qual os componentes do meio foram consumidos e quando se dá início a fase de declínio da cultura. O teste foi mantido sob luz fria e vigorosa agitação e com aeradores. A partir do terceiro dia (72 horas) do início do experimento, foram recolhidas diariamente três amostras de 1000  $\mu\text{L}$  de cada balão e filtradas em papel filtro Whatman 42. As algas e o papel de filtro foram queimadas no aparelho oxidador biológico e analisadas em cintilador líquido. Três amostras de 400  $\mu\text{L}$  foram coletadas de cada balão e analisadas em cintilador líquido. O pH médio ficou em torno de 7,1 e a temperatura verificada diariamente apresentou uma média de 25°C. Ao final do teste foram retiradas a aeração e luminosidade, e em seguida centrifugado a 4000 rpm. Para o preparo da suspensão algácea para os microcrustáceos, as células foram adicionadas ao meio de cultivo das dáfnias (meio M4). O número de células de algas por mL foi determinado utilizando-se a câmara de contagem de Newbauer. Todo o conteúdo foi dividido em porções de 500 mL e estocado em freezer a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ , as quais foram fornecidas diariamente as dáfnias.



Figura 2 - Experimento com algas de acumulação

### 3.8.3 Experimento com dáfnias 9 dias – acumulação

Em 4 aquários com capacidade de 70 litros, foram adicionados 55,5 litros de meio de cultivo para os microcrustáceos. Em seguida foram colocadas em cada um aproximadamente 1000 dáfnias jovens com idade menor ou igual há 24 horas (Figura 3). Durante os dias de estudo os organismos foram alimentados com as algas contaminadas previamente armazenadas, descongeladas quando atingiram a temperatura ambiente. O número aproximado de algas fornecido diariamente logo após as coletas foi de  $1 \times 10^7$  células de algas/dáfnia. Os aquários foram mantidos sem agitação e aeração. O período de luminosidade foi de 16 horas luz e 8 escuro. Os dados físico-químicos médios iniciais dos aquários foram: condutividade de 318,12  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , dureza de 241,67 mg/L  $\text{CaCO}_3$ , temperatura de 20,2°C e pH de 7,3. Após 24 horas do início do experimento, três amostras de cada aquário foram coletadas com pipeta volumétrica de 50 mL de ponta cortada. Cinco organismos foram retidos com papel filtro Whatman 42 cortado, com 10 mm de largura por 25 mm de comprimento, e foram queimados no aparelho oxidador biológico e analisados em cintilador líquido. Três amostras de 400  $\mu\text{L}$  foram coletadas e analisadas em cintilador líquido. No final do experimento os organismos foram separados do meio de cultivo por peneira fina (300  $\mu\text{m}$ ) e adicionados na água de cultivo dos peixes; sendo contados, separados em pequenas porções e estocados em freezer a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ , os quais foram fornecidos diariamente aos peixes (Figura 3). No nono dia o material de fundo foi sifonado, filtrado em papel filtro Whatman 42 e secado a temperatura ambiente, para posterior queima no cintilador líquido.



Figura 3 - Aquários com experimento das dáfnias e separação dos organismos com peneira

### 3.8.4 Experimento com peixes 5 dias – acumulação

Em 4 aquários com capacidade de 20 litros, foram adicionados 12 litros de água para o cultivo dos peixes. Em seguida, foram colocados 14 organismos aclimatados em cada aquário (Figura 4). Durante essa fase do estudo os peixes foram alimentados com as dáfnias armazenadas em freezer do experimento de acumulação. Foram fornecidas aproximadamente 10 dáfnias por peixe após as coletas. O experimento foi mantido com aeração. O período de luminosidade foi de 16 horas luz e 8 escuro. Os dados físico-químicos médios iniciais dos aquários foram: condutividade de  $1222,25 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , dureza de  $922,17 \text{ mg/L CaCO}_3$ , temperatura de  $25,6^\circ\text{C}$  e pH de 7,4. Após 24 horas do início do experimento, diariamente um organismo de cada recipiente foi sacrificado e pesado. O organismo que apresentou massa maior que 300 mg foi dividido para combustão no oxidador biológico e analisados em cintilador líquido. Três amostras de  $400 \mu\text{L}$  de água foram coletadas nos tempos 192 e 216 horas e analisadas em cintilador líquido. No quinto dia, logo após a realização da coleta e alimentação dos peixes, os 9 organismos que restaram de cada aquário foram transferidos dos aquários para dar início à fase de depuração. No quinto dia o material de fundo foi sifonado, filtrado em papel filtro Whatman 42 e secado a temperatura ambiente, para posterior queima e leitura no cintilador líquido.





Figura 4 - Experimento com peixes - acumulação e depuração

### 3.8.5 Experimento com peixes 9 dias – depuração

Os 9 peixes que restaram de cada aquário da terceira fase foram mantidos sob as mesmas condições da fase anterior (Figura 4). Do sexto dia em diante os organismos foram alimentados em dias alternados após a coleta, com ração (23,3 mg) e com as dáfnias (10 por peixe) cultivadas na fase limpa. Os dados físico-químicos médios iniciais dos aquários foram: condutividade de 1227,75  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , dureza de 915,48 mg/L  $\text{CaCO}_3$ , temperatura de 25,3°C e pH de 7,34. Após 24 horas do início, diariamente um organismo de cada recipiente foi sacrificado e pesado. O organismo que apresentou massa maior que 300 mg foi dividido para combustão em oxidador biológico e analisado em cintilador líquido. Três amostras de 400  $\mu\text{L}$  de água foram coletadas de cada aquário e as amostras avolumadas para 10 mL de solução cintiladora e analisadas em cintilador líquido. No nono dia o material de fundo foi sifonado, filtrado em papel filtro Whatman 42 e secado a temperatura ambiente, para posterior queima e leitura no cintilador líquido.

### 3.9 Modelo toxicocinético

#### 3.9.1 Modelagem da bioacumulação do inseticida heptacloro em peixes alimentados por dáfnias e estas alimentadas com algas contaminadas com heptacloro

As expressões descrevem o cálculo do fator de bioacumulação do heptacloro em peixe via dieta alimentar. A bioacumulação de uma substância orgânica por um organismo é um termo geral para a acumulação por qualquer meio ou rota possível de uma substância por organismo. O fator de bioacumulação é um número que permite estimar a concentração de uma substância em um organismo conhecendo-se a concentração da substância no meio e na cadeia alimentar.

De uma forma geral, o fator de bioconcentração é calculado por:

$$BCF = \frac{C_o}{C_w}$$

em que BCF é o fator de bioconcentração,  $C_o$  é a concentração da substância no organismo e  $C_w$  é a concentração da substância no meio ou na água nos quais se encontram a substância e o organismo.

Quando a concentração da substância é constante na água, a dinâmica de acumulação e eliminação da substância pelo organismo é dada por:

$$C_o(t) = \frac{k_{wo} C_w}{k_{ow}} (1 - \exp(-k_{ow} t)) \quad (1)$$

em que  $k_{wo}$  é a taxa de acumulação da substância da água pelo organismo,  $k_{ow}$  é a taxa de eliminação da substância do organismo para a água.

Por meio da equação (1) é possível calcular o fator de bioconcentração, a concentração máxima no organismo ( $C_o^m$ ) e o tempo de meia-vida da substância no organismo ( $t_{1/2}^o$ ) utilizando-se as seguintes expressões:

$$BCF_o = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{C_o}{C_w} \quad (2)$$

$$C_o^m = \lim_{t \rightarrow \infty} C_o \quad (3)$$

$$t_{1/2}^o = \frac{\ln(2)}{k_{ow}} \quad (4)$$

em que  $BCF_o$  é o fator de bioconcentração,  $C_o^m$  é a concentração máxima e  $t_{1/2}^o$  é o tempo de meia-vida da substância no organismo.

A cinética de acumulação e eliminação de uma substância em um organismo  $j$  pela dieta alimentar de um organismo contaminado  $i$  é dada por:

$$C_j(t) = \frac{k_{ij}C_i^m}{k_{jw}}(1 - \exp(-k_{jw}t)) \quad (5)$$

em que  $C_j$  é a concentração da substância no organismo  $j$ ,  $k_{ij}$  é a taxa de acumulação da substância pelo organismo  $j$  por meio da dieta alimentar de organismo  $i$ ,  $k_{jw}$  é a taxa de eliminação da substância pelo organismo  $j$  e  $C_i^m$  é a concentração máxima da substância no organismo  $i$ .

O fator de bioacumulação de uma substância pelo organismo  $j$  da cadeia alimentar é dado por:

$$BAF_j = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{C_j}{C_i^m} \quad (6)$$

A estimativa do fator de biomagnificação de uma substância de um organismo através exclusivamente da cadeia alimentar é dada por:

$$BMF_{wo} = BCF_1 BAF_2 K BAF_n \quad (7)$$

em que  $BMF_{wo}$  é o fator de biomagnificação pela dieta alimentar da substância na água pelo organismo.

### 3.9.2 Cálculo do fator de bioconcentração do heptacloro em algas

A equação cinética que descreve a acumulação e eliminação do heptacloro em algas foi obtida por meio de ajustes numéricos da equação (1) aos dados experimentais de concentrações do heptacloro em alga. A equação obtida é dada por:

$$C_a(t) = 5.22(1 - \exp(-3.2 \times 10^{-2}t)), \text{ com } R^2 = 0.91, \quad (8)$$

em que  $C_a = C_a(t)$ ,  $\text{mg mg}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ n}^\circ \text{ células} \times 1\text{E}+7$  é a concentração do heptacloro em algas. A partir da equação (8), os valores do fator de bioconcentração do heptacloro em alga, da concentração máxima do heptacloro em algas e tempo de meia-vida do heptacloro em algas

foram calculados pelas equações (2), (3) e (4), respectivamente e os valores estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Valores encontrados da concentração máxima, fator de bioconcentração, fator de biomagnificação e tempo de meia vida para os organismos experimentais

	<u>Organismos</u>		
	Algas	Dáfinia	Peixes
Concentração máxima	5,22 mg mg <sup>-1</sup> (nº células×10 <sup>7</sup> ) ml <sup>-1</sup>	1.55×10 <sup>-5</sup> mg mg <sup>-1</sup>	-
BCF	11600 (nº células x 10 <sup>7</sup> ) mg <sup>-1</sup>	-	-
BAF	-	2.97×10 <sup>-5</sup> mg ml mg <sup>-1</sup> (nº células×10 <sup>7</sup> ) <sup>-1</sup>	3.8×10 <sup>-3</sup> mg mg <sup>-1</sup>
Tempo de meia vida (horas)	22	85,5	63

### 3.9.3 Cálculo do fator de bioacumulação do heptacloro em dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro

A equação cinética que descreve a acumulação e eliminação do heptacloro por dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro foi obtida por meio de ajustes numéricos da equação (5) aos dados experimentais de concentrações do heptacloro em dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro. A equação utilizada é:

$$C_d(t) = 1.55 \times 10^{-4} (1 - \exp(-8.11 \times 10^{-3} t)), \text{ com } R^2 = 0.89, \quad (9)$$

em que  $C_d = C_d(t)$ , mg mg<sup>-1</sup>, é a concentração do heptacloro em dáfnias. A partir da equação (9) os valores de concentração máxima do heptacloro em dáfnias, o tempo de meia-vida do heptacloro em dáfnias e o fator de bioacumulação do heptacloro em dáfnia foram calculados por meio das equações (3), (4) e (6), respectivamente, e os valores estão apresentados na Tabela 1.

### 3.9.4 Cálculo do fator de bioacumulação do heptacloro em peixes alimentados com dáfnias contaminadas com heptacloro

A equação cinética que descreve a acumulação e eliminação do heptacloro por peixes alimentados com dáfnias contaminadas com heptacloro foi obtida por meio de ajustes numéricos da equação (5) aos dados experimentais de concentrações do heptacloro em peixes alimentadas com algas contaminadas com heptacloro. A equação obtida é dada por:

$$C_p(t) = 5.89 \times 10^{-7} (1 - \exp(-1.11 \times 10^{-2} t)), \text{ com } R^2 = 0.85, \quad (10)$$

em que  $C_p = C_p(t)$ ,  $\text{mg mg}^{-1}$  é a concentração do heptacloro em peixes. A partir da equação (10) os valores de concentração máxima do heptacloro em peixes, o tempo de meia-vida do heptacloro em peixes e o fator de bioacumulação do heptacloro em peixes foram calculados por meio das equações (3), (4) e (6), respectivamente, e os valores estão apresentados na Tabela 1.

### 3.9.5 Cálculo do fator de biomagnificação do heptacloro em peixes por meio da cadeia alimentar contaminada com heptacloro

O fator de biomagnificação do heptacloro em peixes foi calculado a partir do fator de bioconcentração do heptacloro em algas e dos fatores de bioacumulação do heptacloro em dáfnias e em peixes. O valor de  $1.31 \times 10^{-3} \text{ mL mg}^{-1}$  ( $1.31 \text{ L Kg}^{-1}$ ) para fator de biomagnificação em peixe do heptacloro através da cadeia alimentar ( $BMF_{wo}$ ) foi calculado por meio da equação (7) com os valores de  $BCF$  em alga e dos valores de  $BAF$  em dáfnia e em peixes (Tabela 1).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio aquático é o destino final para os pesticidas utilizados nas atividades agrícolas. Dos inseticidas, os primeiros sintetizados em laboratório foram os organoclorados, que são bastante estáveis e por isso, continuam agindo muito tempo depois da aplicação. Mas sua degradação é vagarosa, tendem a se acumular ao longo das cadeias alimentares.

### 4.1 Resultado do teste agudo com peixes

A duração e a frequência da exposição dos organismos ao agente tóxico afetará a toxicidade. Na exposição aguda os organismos entram em contato com o agente químico num único evento ou em eventos múltiplos que ocorrem num pequeno período de tempo, variando de horas a dias (TOMITA; BEYRUTH, 2002). O heptacloro é considerado altamente tóxico para organismos aquáticos, pois o efeito agudo deste causa mortalidade em concentrações relativamente baixas. A  $CL_{50}$  96 horas segundo EXTOWNET (1996) para várias espécies de peixes ficou em torno de 5,3 a 23,0  $\mu\text{g/L}$ . Neste trabalho, o teste agudo 96 horas com *Danio rerio* apresentou uma alta toxicidade como resultado da  $CL_{50}$  96 horas igual a 0,89 mg/L (Tabela 2), que foi calculada com limite de confiança de 95%, utilizando-se o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1978).

Nas concentrações 0,25 e 0,50 mg/L do início até o final do teste os organismos apresentaram comportamento normal. Na concentração 0,75 mg/L de duas a quatro horas do início do teste os peixes apresentaram movimentos respiratórios acelerados, e logo após este período até as 96 horas observou-se comportamento normal e mortalidade de apenas um organismo (10%) nas 48 horas. Na concentração de 1,0 mg/L os peixes exibiram movimentos respiratórios acelerados e presença na superfície de duas a quatro horas. Nesta mesma concentração de oito a doze horas mostraram movimentos descoordenados e houve mortalidade de oito organismos com 48 horas, o que representou 80% dos organismos, permanecendo até o final do teste. Na concentração de 1,5 mg/L, no intervalo de duas a quatro horas, os organismos apresentaram movimentos respiratórios acelerados, agitação e presença na superfície. Com 8 horas de exposição observaram-se movimentos descoordenados e nas 12 horas seguintes os organismos foram encontrados no fundo do aquário, sendo que em 24 horas de teste constatou-se 100% de mortalidade.

Tabela 2 - Concentrações e períodos em que foram expostos os organismos à substância teste e avaliação da mortalidade

Concentração (mg/L)	Leitura							
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle solvente	0	0	0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
0,50	0	0	0	0	0	0	0	0
0,75	0	0	0	1	0	1	0	1
1,00	5	3	5	3	5	3	5	3
1,50	5	5	5	5	5	5	5	5

R = repetição (5 organismos em cada uma)

#### 4.2 Concentração do heptacloro na água das algas, dáfnias e peixes

A água é o meio que mais sofre agressões de compostos químicos que chegam por diversas rotas, que podem causar conseqüências severas aos animais, plantas e ao próprio homem. É muito importante o gerenciamento dos corpos d'água. Segundo Paraíba e Jonsson (1994), existe um nível teórico de equilíbrio em que a quantidade do composto que é incorporada aos tecidos do organismo é equivalente à quantidade eliminada, sendo que a concentração na água é considerada constante. Neste estudo foi possível observar que em todos os compartimentos testados, mesmo o de dáfnias e peixes, que diferem das algas porque estas receberam o produto da água de cultivo e aqueles da alimentação, a concentração da água continuou constante nos períodos coletados, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Valores diários das concentrações de heptacloro na água de cultivo dos três organismos

Concentração (µg/mL)	Período (Horas)								
	24	48	72	96	120	144	168	192	216
Algas	n.a.	n.a.	0,34 x 10 <sup>-6</sup>	0,34 x 10 <sup>-6</sup>	0,34 x 10 <sup>-6</sup>	0,34 x 10 <sup>-6</sup>	0,34 x 10 <sup>-6</sup>	n.a.	n.a.
Dáfnias	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,50 x 10 <sup>-6</sup>	0,50 x 10 <sup>-6</sup>
Peixes acumulação	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>
Peixes depuração	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>	0,84 x 10 <sup>-6</sup>

n.a.: períodos não avaliados

### 4.3 Avaliação da exposição das algas ao heptacloro

O fitoplâncton tem papel essencial dentro do ambiente aquático para a produção de nutrientes e oxigênio. Sua posição ecológica constituindo a base produtiva da cadeia alimentar tem importância no uso destes em testes ecotoxicológicos para estimar o risco de contaminação por pesticidas em organismos aquáticos (JONSSON et al., 2001). No decorrer do experimento a concentração de 0,45 mg/L de heptacloro não inibiu o crescimento celular (Figura 5) e foi observado nas amostras diárias que a concentração do produto ao longo do tempo diminuiu nas amostras, possivelmente devido ao aumento da massa celular, conforme demonstrado na tabela 4. Montgomery (1997), em um modelo contendo vários organismos, dentre estes a comunidade planctônica, observou por um período de até sete dias de exposição que o heptacloro é persistente e se deposita na água de forma residual. Jonsson et al. (2001) em seu estudo com a alga *Chlorella saccharophila* concluiu que a detecção de um inseticida dentro de um nível trófico em um lago pode contribuir para a iniciação de um processo de biomagnificação, levando-se em conta o grau estimado para acumulação como produtor primário.



Tabela 4 - Concentração do heptacloro em algas, massa e valores do crescimento celular

	Período (Horas)				
	72	96	120	144	168
Concentração Algas ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	$0,39 \times 10^{-5}$	$0,31 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-5}$
Massa (mg/mL)	0,24	0,29	0,50	0,52	0,72
Número de células/mL	$1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,76 \times 10^7$	$3,58 \times 10^7$	$4,53 \times 10^7$

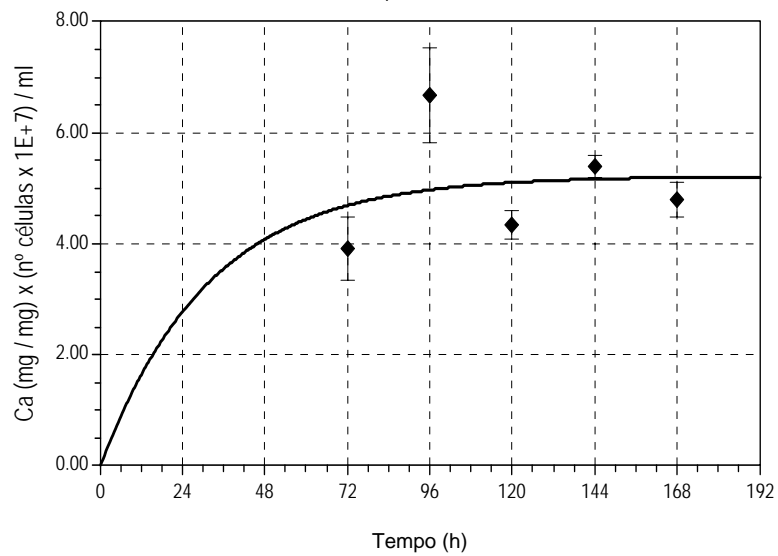


Figura 5 - Evolução da concentração de heptacloro em algas mantidas em água contaminada (meio de cultivo L. C. Oligo) com heptacloro

#### 4.4 Avaliação da exposição das dáfnias alimentadas com algas contaminadas pelo heptacloro

Das diferentes espécies utilizadas em testes de toxicidade a dáfnia é uma das selecionadas. Desempenham papel importante na transferência de energia de um nível trófico a outro, pois servem de alimento para inúmeras espécies de peixes. Nesta fase do estudo foi possível observar que houve a passagem do produto ou metabólito das algas para as dáfnias (Figura 6). Já nas 24 horas do início do experimento pôde-se notar que os organismos haviam incorporado o composto. Ao longo das 216 horas notou-se um leve aumento da concentração nos organismos coletados devido ao aumento da massa dos mesmos, conforme mostra tabela 5. Silva (2000), em sua pesquisa com compostos organoclorados, observou que as maiores concentrações na bacia do rio Piracicaba foram de  $\gamma$ BHC e o heptacloro detectados em todos os pontos de coleta. Essa mesma autora chegou à conclusão de que a quantidade de heptacloro encontrada em bivalves foi aproximadamente 20 vezes maior que a obtida no sedimento. Montgomery (1997), em seu modelo de ecossistema observou a acumulação do heptacloro por 7 dias de exposição, em diversos organismos da cadeia alimentar, entre eles a *Daphnia magna*. Ellgehausen et al. (1979), que trabalhou com três organismos representantes da cadeia alimentar aquática, testando 10 moléculas entre as quais um organoclorado o *p, p'*- DDT, percebeu que a dáfnia por um período de 244 horas, sendo, 50 horas de exposição ao produto apresentou resíduos do inseticida e por mais um período de 194 horas de depuração observou que os organismos eliminaram uma quantidade significativa do produto.

Tabela 5 - Concentração do heptacloro em dáfnias e valores da massa dos organismos

	Período (Horas)								
	24	48	72	96	120	144	168	192	216
Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	$0,18 \times 10^{-5}$	$0,06 \times 10^{-5}$	$0,08 \times 10^{-5}$	$0,08 \times 10^{-5}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-5}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,12 \times 10^{-5}$
Massa de 5 organismos (mg)	0,04	0,18	0,20	0,29	0,31	0,42	0,51	0,61	0,74

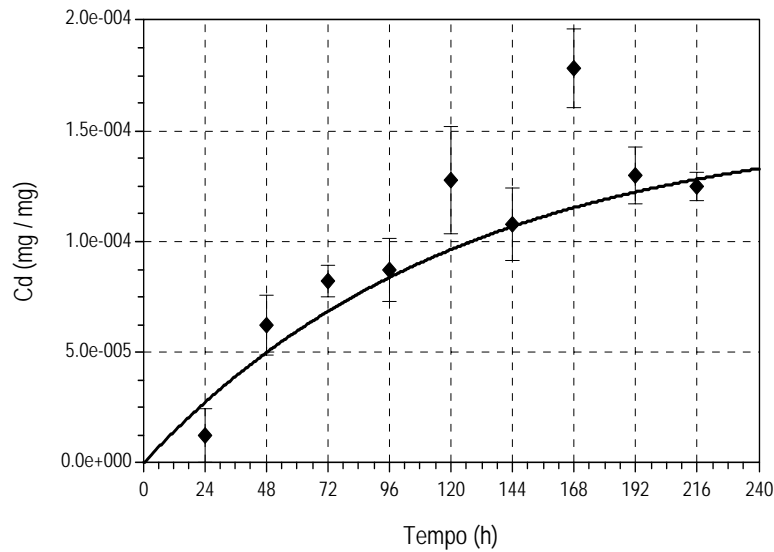


Figura 6 - Evolução da concentração do heptacloro em dáfnias alimentadas com algas contaminadas com heptacloro

#### 4.5 Avaliação da exposição dos peixes alimentados com dáfnias contaminadas pelo heptacloro no período de acumulação

Para avaliação da bioacumulação em organismos aquáticos carnívoros foi escolhida como representante a espécie *Danio rerio*. A biota aquática é um importante reservatório de DDT, metabólitos e outros organoclorados, e que o acúmulo destes pode conduzir a desequilíbrios na estrutura de comunidades de níveis mais elevados (D'AMATO et al., 2002). O heptacloro e seu metabólito foram encontrados na gordura de peixes e pássaros. É altamente tóxico para inúmeras espécies, pois se mostrou bioconcentrante em organismos aquáticos tais como peixes, moluscos, insetos, plâncton e algas. Em peixes foram encontradas concentrações de 200 a 37.000 vezes a concentração do heptacloro nas águas circunvizinhas (EXTOXNET, 2004). No período de 5 dias de acumulação, em que os peixes foram alimentados com dáfnias contaminadas com heptacloro observou-se um acúmulo do produto em maior quantidade que os níveis anteriores algas e dáfnias (Tabela 6). Se neste modelo os peixes acumularam uma quantidade significativa do produto, sendo que se alimentaram de uma espécie apenas, isso nos leva a deduzir quanto o mais um organismo do

topo da cadeia em ambiente natural pode concentrar por se alimentar de várias espécies diferentes (Figura 7). Ikeda e Yamada (2003), em seu trabalho com *Pagrus major*, pôde observar que esta espécie de peixe apresentou uma eficiência de assimilação de 56% de PCBs através da alimentação e concluiu que o poder de bioacumulação depende da concentração do produto na alimentação, contribuindo assim para a passagem na cadeia alimentar. Segundo Murty (1986), o processo para uma elevada assimilação em qualquer caso é proveniente do alimento ou da água que é demonstrado por diversos fatores, tais como: propriedades físico-químicas da molécula, condições físico-químicas do meio e do próprio peixe. Na eficiência da acumulação do peixe vai influenciar o conteúdo de lipídios, o seu tamanho, o período de exposição e atividades físico-químicas.

Tabela 6 - Concentração do heptacloro em peixes durante a acumulação e valores da massa dos organismos

	Período (Horas)				
	24	48	72	96	120
Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	0,22	0,23	0,45	0,46	0,62
Massa do organismo (mg)	317,6	378,3	318,0	328,2	360,5

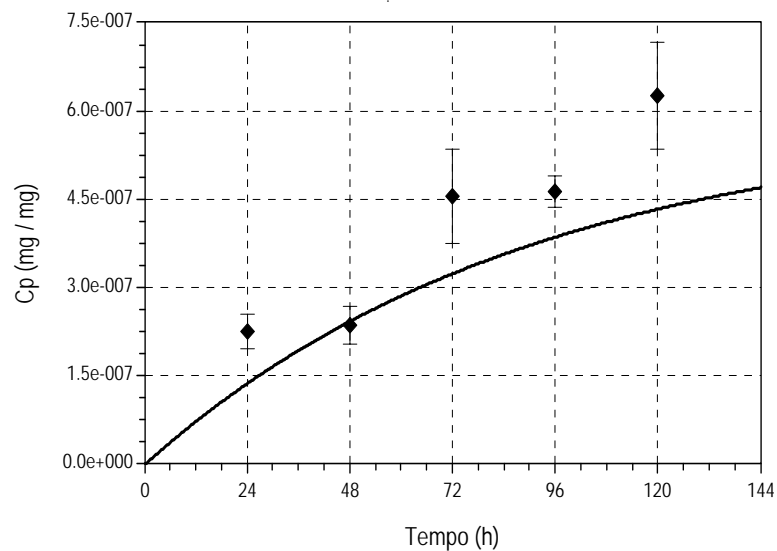


Figura 7 - Evolução da concentração do heptacloro em peixe alimentados com dáfnias contaminadas com heptacloro

#### 4.6 Avaliação da exposição dos peixes alimentados com dáfnias contaminadas pelo heptacloro no período de depuração

Muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas para a eliminação de despejos de produtos que chegam ao ambiente aquático de várias fontes. Também estudos vêm sendo realizados para saber o poder de depuração de partículas indesejáveis em certos organismos a fim de que se tornem próprios para o consumo humano. Murty (1986) descreve que a eliminação de um pesticida orgânico depende dos grupos atômicos substituintes e que a taxa de eliminação tem que ser superior à de assimilação. Nessa fase do estudo foi observado que houve um decréscimo da concentração do produto, como mostra a tabela 7, e que os organismos não apresentavam quantidade de massa muito diferente uns dos outros. O organismo do último dia de coleta (336 horas) foi o que apresentou a maior massa, permanecendo com uma concentração de 0,25 µg. Segundo Matsui (2002), a excreção de substâncias tóxicas pelos organismos obedece, com boa aproximação, a uma cinética de primeira ordem, na qual o coeficiente das taxas depende do composto químico e do tamanho do organismo considerado. Ellgehausen et al. (1979) pôde observar que a taxa de eliminação de resíduos de pesticidas em organismos aquáticos depende do pesticida e do organismo testado.

Tabela 7 - Concentração do heptacloro em peixes durante a depuração e valores da massa dos organismos

	Período (Horas)								
	144	168	192	216	240	264	288	312	336
Concentração (µg/ µg)	0,42	0,29	0,26	0,36	0,24	0,23	0,27	0,27	0,25
Massa do organismo (mg)	301,7	305,9	316,0	304,7	308,3	346,2	279,8	253,1	392,7

#### 4.7 Avaliação do material de fundo dos aquários de dáfnias e peixes

No ambiente aquático os compostos orgânicos podem bioacumular também pelo sedimento de fundo, e podem estar dissolvidos na água ou associados a partículas dependendo de sua hidrofobicidade e do seu coeficiente de partição. Essas partículas podem depositar-se no fundo ou

ligar-se ao compartimento biótico que são o destino final de tais compostos (STRANDBERG et al., 1998). Nos aquários de dáfnia o material depositado no fundo ficou com valor médio de  $0,37 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  material de fundo. E nos aquários de peixes no período de acumulação foi encontrado o valor médio de  $0,28 \times 10^{-7}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  material de fundo e na depuração o valor médio de  $0,15 \times 10^{-7}$   $\mu\text{g}$  heptacloro/ $\mu\text{g}$  material de fundo. Com os resultados do material de fundo do experimento podemos concordar com D'Amato et al. (2002), que ainda adverte sobre os peixes que não estão em níveis superiores, mas que poderão atingir altos níveis de contaminação ao absorverem nutrientes que possuem grande carga de poluentes, por estes se associarem aos sedimentos de fundo.

#### **4.8 Biomagnificação da cadeia alimentar**

Uma das principais características dos organoclorados é a persistência no tecido adiposo do homem e outros animais, isso se deve à grande solubilidade destes em gordura. Este estudo demonstra que uma exposição gradual ao pesticida heptacloro por um período de tempo, leva ao acúmulo na cadeia trófica aquática. Na Figura 8 estão os resultados finais dessa passagem do produto. Foi analisado o conteúdo de lipídio dos organismos, que apresentaram o extrato puro de algas 9,24%, dáfnias 14,55% e peixes 30,45%.

Os seres humanos também integram as espécies de organismos de maior nível trófico. Dependendo dos hábitos alimentares, determinados grupos de pessoas que vivem em regiões onde ocorre disposição de produtos tóxicos no ambiente podem constituir grupos de risco (MATSUI, 2002).

O monitoramento de organoclorados e outros pesticidas é muito pobre em várias partes do mundo, especialmente em países em desenvolvimento. E dos pesticidas organoclorados o mais estudado sobre a biomagnificação é o DDT, o que dificultou a realização da revisão bibliográfica deste estudo para comparações de resultados obtidos. D'Amato et al. (2002) lembra que embora pesticidas estejam incluídos em vários programas governamentais na agricultura ou em programas de saúde, há falta de verba, dificuldades de aplicá-los no exato momento do ano em que os pesticidas são utilizados. Também a dificuldade de realizar análises por falta de profissionais, de reagentes e técnicas adequadas.

Hoje sofremos implicações no ambiente relatada por Rachel Carson há 40 anos. Algumas substâncias cloradas permanecem intactas no ambiente por décadas. Organoclorados são parte de nossa dieta diária, esses compostos tóxicos podem ser encontrados no sangue, leite humano, músculos e tecido adiposo de pessoas em todas as partes do globo. Acumulando-se no tecido adiposo, elas se somam às cargas corporais de substâncias perigosas que ameaçam a vida (FRANCISCO, 1995). Em seu estudo, Freguglia (2003), observando os resultados obtidos quanto à presença de organoclorados heptacloro e heptacloro epóxi em leite, assegura a necessidade de intensificação do controle de resíduos de pesticidas nos alimentos, com o objetivo de possibilitar à população um alimento confiável e de melhor qualidade.

A maioria dos seres vivos, entre eles o homem, carrega no organismo substâncias químicas persistentes, dentre estas os organoclorados que podem ter um efeito acumulativo muito importante.

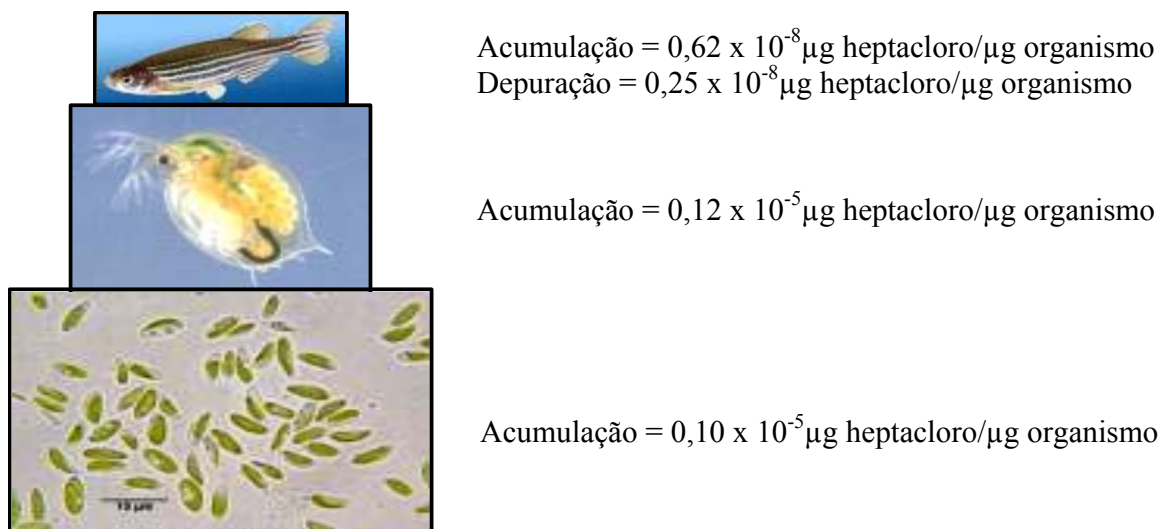


Figura 8 - Concentração final do produto nos níveis da cadeia alimentar estudada

## 5 CONCLUSÕES

Pelos resultados dos experimentos realizados foram possíveis as seguintes conclusões:

- A  $CL_{50}$  96 horas do heptacloro estabelecida mostrou alta toxicidade deste produto para *Danio rerio*;
- Não houve mortalidades no experimento com algas, mas esse inseticida mostrou ter alto poder de bioacumulação;
- A biomagnificação por esse pesticida foi constatada nas dáfnias e peixes;
- Nos peixes ocorreu a depuração de uma parte do heptacloro durante o período estudado.



## REFERÊNCIAS

- ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO **Glossário de Ecologia**. São Paulo, 1997. 352 p.
- ADAMI, H.O.; LIPWORTH, L.; TITUS-ERNSTOFF, L.; HSIEH, C.C.; HAMBERG, A.; AHLBORG, U.; BARON, J. Organochlorine compounds and estrogen related cancers in women. **Cancer Causes and Control**, London, v. 6, p. 551-566, 1995.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **Norme experimentable T90-304**: essais des eaux; détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Paris, 1980. 41 p.
- ALY, O.; BADAUWY, M. Organochloride residues in fish from the river Nile, Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 33, p. 246-256, 1984.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA **Resolução RDC nº135**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 02 maio. 2002.
- AYOTTE, P.; DEWALLY, E.; BRUNEAUS, S.; CAREAU, H.; VEZINA, A. Air pollution and human health: what effects should be expected. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 160, p. 520-537, 1995.
- AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. 340 p.
- BORGA, K.; SOUZA, A.V. Biomagnification of organochlorides along a batters sea food chain. **Environmental Pollution**, London, v. 113, n. 2, 123p. 2001.
- CARVALHO, B.A. **Ecologia e poluição**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1975. 187p.
- CASTRO, V.L.; PALERMO-NETO, J. Contaminação ambiental por inseticidas organoclorados. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 39, n. 5/6, p. 464-470, 1987.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL **L5. 321. Norma técnica**: água – determinação do potencial de crescimento algaço. São Paulo, 1989. 17 p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL **L5. 020. Norma técnica**: água – teste de toxicidade aguda com *Chlorella vulgaris*. São Paulo, 1990a. 15 p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL **L5. 019. Norma técnica**: teste de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema estático. São Paulo, 1990b. 29 p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo, 1999. 155 p.

CHAGAS, C.M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, J.H.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. Determinação de resíduos de organoclorados em águas fluviais do município de Viçosa – MG. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 506-508, jul. / ago. 1999.

CHRISTOFOLETTI, A. **Modelagem de sistemas ambientais**. São Paulo: Edgard Blücher, 1999. 236 p.

COSTA, M.T.G.P. **Diferentes formas de tratamento de resíduos sólidos urbanos e seus impactos no ambiente**: aterros, lixeiras e incineradoras. Universidade Técnica de Lisboa, 1998/99. 1 v. (Ecotoxicologia 2)

DAVIS, D.L.; BRADLOW, B. Can environmental estrogens causes breast cancer? **Scientific American**, New York, v. 275, n. 3, p. 144-149, 1996.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (Dicloro Dofenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002. 2002.

DONALD, G.C. **Environmental toxicology and chemistry**. Moscou: Ramat Aviv, 1998. 336 p.

DORES, E.F.G.C.; FREIRE, E.M.D.L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v. 9, p. 1-18. 1999.

DORES, E.F.G.C.; FREIRE, E.M.D.L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 27-36. 2001.

ELENDT, B.P.; BIAS, W.R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. **Water Research**, New York, v. 24, n. 9, p. 11567-11576, 1990.

ELLGEHAUSEN, H.; GUTH, J.A.; ESSER, H.O. **Factors determining the bioaccumulation potential of pesticides in the individual compartments of aquatic food chains**. Basel: CIBA-GEIGY, Agricultural Division, 1979. 278 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY **Ecological effects test guidelines**. OPPTS 850. 1730 Fish BCF. (Public Draft). Washington, 1996. 23 p.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A.L. **Ecotoxicologia**: perspectivas para o século XXI. São Carlos: Rima, 2000. 575 p.

EXTOXNET. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu>>. Acesso em: 27 junho. 2004.

- FRANCISCO, R.C.T. **Análise de multi-resíduo de pesticidas em suco de Laranja**. 1995. 97 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.
- FREGUGLIA, R.M.O. **Determinação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite, na região de Piracicaba-SP**. 2003. 182 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2003.
- GORBA, K.; GENTIL, M. C.; STANBERG, F. Accumulation of pesticides a baters sea food chain. **The Science of the Total Environmental Pollution**, New York, v. 125, 2002. 204 p.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. TRIMMED SPEARMAN- KARBER Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 12, n. 4, p. 417, 1978.
- HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, London, v. 112, n. 2, p. 10, 2001.
- IKEDA, K. YAMADA, H. Changes in dietary bioaccumulation of Tributyltin Chloride (TBTCI) in Red Sea (*Pagrus major*) with the concentration in feed. **Water Research**, New York, v. 37, p. 1497-1504, 2003.
- JAMES, D.J.G.; HUNTLEY, I.D. Some aspects of the processes of mathematical models. In: HUNTLEY, I. D.; JAMES, D. J. G. **Mathematical modeling: a source book of case studies**. London: Oxford University Press, 1990. p. 1-17.
- JONSSON, C.M.; PARAIBA, L.C.; MENDOZA, M.T.; SABATER, C.; CARRASCO, J.M. Bioconcentration of the inseticide pyridaphenthion by the green algae *Chlorella saccharophila*. **Chemosphere**, Oxford, v. 43, p. 321-325, 2001.
- LENARDÓN, A.M.; LORENZATTI, E.A.; ENRIQUE, S.N. Monitoreo de inseticidas organoclorados y organofosforados em el Rio Paraná (km 600). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 8, p. 57- 66, 1998.
- LORENZETTI, M.L.; ARAÚJO, R.P.A. **Cultivo e realização de testes de toxicidade com *Ceriodaphnia***: métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo: CETESB, 1999 v. 1.
- MARANHO, L.A.; NIEWEGLOWSKI, A.M.A. Influência da dureza da água no estudo da reprodução de *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v. 5, n. 5, p. 33-52, 1995.
- MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate as pragas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1963. 607 p.

- MATSUI, S. **Diretrizes para o gerenciamento de lagos: gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios.** São Carlos: International Institute of Ecology, 2002. 216 p.
- MCINTYRE, A.D.; MILLS, C.F. **Ecological toxicology research.** New York: Scientific Affairs Division, 1974. 323 p.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental.** Jaguariúna: Hamburg Gráfica Editora, 1997. 440 p.
- MONTGOMERY, J. H. **Agrochemicals disk reference.** Vienna: Lewis, 1997. 656 p.
- MOZETO, A.A. **Avaliação alternativa de riscos ambientais: o grande e inevitável desafio da Avaliação de Impacto Ambiental do século XXI. Parte II.** São Carlos, 2001. 211p.
- MURTY, A.S. **Toxicity of pesticides to fish.** Boca Raton: CRC Press, 1986. 2v.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals: *Daphnia magna* reproduction test.** United Kingdom, 1998. 21 p.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals: Fish, acute toxicity test.** United Kingdom, 1992. 18 p.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals: Bioconcentration: Flow-through fish test.** United Kingdom, 1996. 26 p.
- PARAÍBA, L.C.; JONSSON, C.M. Um programa de pascal para avaliar a cinética de agrotóxicos em organismos aquáticos. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v. 4, n.4, p. 27-38, 1994.
- PENTEADO, J.C.P.; VAZ, J.M. O legado das Bifelinas policloradas (PCBs). **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 390-398. 2001.
- ROBERTS, T.; HUTSON, D.H. **Environmental fate of pesticides.** New York: Wiley, 1990. 286 p.
- ROBERTS, T.; HUTSON, D.H. **Metabolic pathways of agrochemicals.** Part 2. Insecticides and fungicides. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. 1v.
- ROBINSON, J.; RICHARDON, A.; CRABTREC, A. N. Organochloride residue in marine organisms. **Nature, London**, v. 124, n. 5088/5095, p. 1307-1311, 1967.
- RUSAFÁ, A.; NAVARO, S.; BARBA, A.; MARCOS, C.; CÂMARA, M.A.; SALAS, F. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the mar menor Lagoon (SE Spain). **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 40, n. 2, p. 140-151, 2000.

- SÁFADI, R.S. Importância da análise de resíduos de pesticidas em estudos ecotoxicológicos. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v. 5, n. 5, p. 111-118, 1995.
- SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ, F.J.; NAVARRO, J.C. Bioconcentration and depuration of chlorpyrifos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 33, p. 47-52, 1997.
- SILVA, D.M.L. **Avaliação de compostos organoclorados da bacia do Rio Piracicaba**. 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2000.
- SILVA, A.L. **Cargas difusas de poluição e seu impacto em mananciais para abastecimento público**. 2003. Dissertação (Mestrado em Limnologia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- SOUZA, N.E.; RUBIRA, A. F.; MATSUSHITA, M.; TANAMATI, A. Resíduos de pesticidas organoclorados em amostras ambientais (águas e solos) do município de Maringá – PR. **Agricultura, Biologia e Tecnologia**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 587-594, 1988.
- STRANDBERG, B.; STRANDBERG, L.; BAVEL, B.; BERGVIST, P.A.; BROMAN, D.; FALANDYSZ, J.; PAPAKOSTA, O.; ROLFF, C.; RAPPE, C. Concentration and spatial variation of cyclodienes and the others organochlorides in hering and perch from Baltic sea. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 215, p. 69-83, 1998.
- TAVARES, L.H.S.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: Rima, 2003. 106 p.
- TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.
- TOMLIN, C.D.S. **The e-pesticide manual**: software developed by Wise & Loveys Information Service. London: The British Crop Protection Council Database, 2000. 1v.
- UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Toxic Substances Control Act, Environmental Effects Testing Guidelines. US Code Federal Regulations, **40 CFR 797**. Washington Methods to Assess the effects of Chemicals on Ecosystems Scope 53. 1992.
- VIANA, A.; MARTINS, A.P.C. Alterações morfológicas em hepatócitos de *Brachydanio rerio* (Hamilton & Buchanan) exposto a ação do endossulfan em dose subletal. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v. 5, n. 5, p. 83-94, 1995.