

TOXICIDADE AGUDA DE HERBICIDA E DE SEUS COMPONENTES QUÍMICOS DIURON E HEXAZINONA EM *CERIODAPHNIA DUBIA*

Acute toxicity of herbicide and its components in chemical diuron and hexazinone in *Ceriodaphnia dubia*

Bruno Moreira da Silva¹, Cristina Filomêna Pereira Rosa Paschoalato², Marcia Maisa de Freitas Afonso³, Maira Batista de Souza⁴

Recebido em 07 de novembro de 2013; recebido para revisão em 05 de dezembro de 2013; aceito em 10 de dezembro de 2013; disponível on-line em 13 de dezembro de 2013.



PALAVRAS CHAVES:

Ceriodaphnia dubia;
Diuron;
Ecotoxicidade aguda;
Hexazinona.

KEYWORDS:

Acute ecotoxicity;
Ceriodaphnia dubia;
Diuron;
Hexazinon.

RESUMO: A expansão da cultura da cana-de-açúcar, a necessidade do uso de herbicidas, o processo de escoamento superficial da água no solo, a simplicidade das tecnologias empregadas nas estações de tratamento de água, justificam a proposta do referido estudo para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de um herbicida comercial composto por Diuron (46,8%p/p) e Hexazinona (13,2%p/p) e dos compostos puros Diuron e Hexazinona, através da realização de testes de toxicidade aguda, utilizando como organismo testes a *Ceriodaphnia dubia*. A metodologia utilizada nos ensaios foi adaptada das Normas NBR 12.713 (ABNT, 2004) e NBR 13.373 (ABNT, 2005). Nos ensaios de toxicidade aguda, o tempo de exposição foi de 48 h e os resultados obtidos foram estatisticamente processados por *Trimmed Spearman-Kärber* para cálculo de 50% da imobilização dos organismos testes (CE₅₀). O valor obtido de CE₅₀ para os testes agudos com um herbicida comercial foi de 5,78 mg.L⁻¹, para o Diuron o valor de CE₅₀ foi de 2,9 mg.L⁻¹ e para Hexazinona o CE₅₀ foi de 105,56 mg.L⁻¹. Concluiu-se que Diuron apresentou potencial tóxico de aproximadamente 37 vezes maior, quando comparado a Hexazinona e em relação aos valores obtidos de toxicidade citados na literatura, mesmo considerando organismos pertencentes a diferentes cadeias tróficas, os valores de CE₅₀ apresentaram-se próximos, porém, faz se necessário a compilação de diversos ensaios em diferentes níveis tróficos, no intuito de ampliar dados para futura análise de risco que possibilitem aos órgãos regulamentadores o estabelecimento de limites máximos permissíveis para qualidade de águas superficiais com segurança e confiabilidade.

ABSTRACT: The expansion of the culture of cane sugar, the need for the use of herbicides, the process of runoff water in the soil, the simplicity of the technologies used in water treatment plants, justifies the proposal of this study to evaluate the effects ecotoxicological effects of a commercial herbicide Diuron consisting of (46.8% w/w) and Hexazinone (13.2% w/w) pure compounds and Diuron and Hexazinone, by carrying out acute toxicity tests using as test organism to *Ceriodaphnia dubia*. The methodology used in the tests was adapted from the NBR 12713 (ABNT, 2004) and NBR 13373 (ABNT, 2005). In acute toxicity tests, the exposure time was 48 h and the results obtained were statistically processed by Trimmed Spearman-Kärber calculation to 50% of the test organisms immobilization (EC₅₀). The EC₅₀ value obtained for the acute tests with a commercial herbicide was 5.78 mg.L⁻¹ for Diuron the EC₅₀ value was 2.9 mg.L⁻¹ and the EC₅₀ was Hexazinone 105.56 mg.L⁻¹. Diuron was concluded that showed toxic potential of approximately 37- fold higher as compared to Hexazinone and for the toxicity values reported in literature, even considering organisms belonging to different trophic chains, the EC₅₀ values were close, but makes it necessary to build several tests at different trophic levels, in order to expand data for future risk analysis that enable regulators to establish maximum allowable limits for surface water quality with safety and reliability.

* Contato com o autor:

¹ e-mail : brunomoreira.eng@gmail.com (B. M. da Silva)

Aluno de iniciação científica curso de Engenharia Química, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

² e-mail : cpaschoa@gunaerp.br (C. F. P. R. Paschoalato)

Engenheira Química, Doutora em Engenharia Civil, Docente do programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental da UNAERP.

³ e-mail : mafonso@unaerp.br (M. M. F. Afonso)

Engenheira Química, Doutora em Química Orgânica, Docente do Curso de Engenharia Química da UNAERP.

⁴ e-mail : brunomoreira.eng@gmail.com (M. B. de Souza)

Mestre em Tecnologia Ambiental pela UNAERP.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da cana tornou-se um grande investimento agrícola e atualmente a cana-de-açúcar ocupa cerca de 2% da área cultivável no Brasil, que é o maior produtor mundial, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália. No Brasil, as regiões que se destacam no cultivo da cana-de-açúcar são: Sudeste, sendo São Paulo o estado de maior índice seguido de Minas Gerais, Centro-Oeste (com Mato Grosso do Sul e Goiás), Sul e Nordeste. Em média 55% da colheita de cana-de-açúcar é destinada a fabricação de etanol e 45% para a fabricação de açúcar (UNICA, 2013).

A área cultivada de cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 9,62 milhões de hectares, sendo 13% na região norte-nordeste e 87% na região centro-sul com 7,8 milhões de hectares para a safra 2013 (UNICA, 2013). A produtividade média da cultura de cana de açúcar no Brasil está estimada em 69289 kg/ha (CONAB, 2011). Com o propósito de aumento na produtividade agrícola são necessários e indispensáveis investimentos em agroquímicos e insumos, tais como os fertilizantes, formicidas, pesticidas e, principalmente, os herbicidas.

O uso de agroquímicos é a segunda causa de contaminação da água no país, só perde para o despejo de esgoto doméstico. A poluição da água provocada por agrotóxico ou fertilizante é um problema para 16,2% dos municípios brasileiros (901 municípios), na Bacia Costeira do Sul, 31% dos municípios registraram poluição da água por agrotóxicos e 19% estão concentrados nas bacias do Rio da Prata e na Costeira do Sudeste (IBGE, 2010).

Dentre vários herbicidas empregados na cultura da cana-de-açúcar, um produto comercial composto pela mistura de Diuron e Hexazinona vem sendo amplamente utilizados (ARMAS, 2006).

A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 (BRASIL, 2005), que estabelece padrões de qualidade para corpos d'água, não relaciona esses compostos químicos e recomenda que possíveis substâncias causadoras de danos aos seres vivos deverão ser investigadas, e que critérios de toxicidade deverão se basear em

resultados de testes de ecotoxicológicos padronizados utilizando organismos aquáticos.

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que analisa os efeitos tóxicos causados por agentes químicos e físicos sobre as populações em ambientes aquático e/ou terrestres, que integram o ecossistema. O desenvolvimento de protocolos para testes de toxicidade permitem definir a faixa de toxicidade tolerável obtendo-se o conhecimento de níveis aceitáveis e servem de referência na tomada de decisões para órgãos públicos reguladores (RONCO *et al.*, 2004).

A Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que estabelece padrões de potabilidade da água para consumo humano, incluiu e limitou o valor máximo de concentração de Diuron em $90 \mu\text{g.L}^{-1}$, tal inclusão, deve-se a uma preocupação com os possíveis efeitos danosos a saúde dos seres humanos.

A importância da realização de estudos sobre os efeitos tóxicos de compostos químicos, utilizando organismos sensíveis, compostos estes passíveis de virem a ser microcontaminantes emergentes de águas superficiais e potáveis, os quais estão relacionados com a concentração e suas propriedades, bem como estes compostos podem afetar o organismo exposto, esta centrada no estabelecimento do potencial tóxico, no mecanismo de ação nos seres vivos e nas taxas de sensibilidade para diferentes organismos aquáticos, em relação à mesma substância. Com este enfoque, a pesquisa objetiva avaliar os efeitos ecotoxicológicos de um herbicida comercial composto pelos princípios ativos diuron e hexazinona, atualmente empregados na cultura da cana-de-açúcar, utilizando como organismo testes neonatas de *Ceriodaphnia dubia* para determinar valores da concentração efetiva média (CE_{50}) desses compostos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada na realização dos ensaios de toxicidade aguda em *Ceriodaphnia dubia* foi baseada nas NBR 12.713 (ABNT 2004) e NBR 13.373 (ABNT 2005), utilizando como

contaminantes um herbicida comercial e seus dois compostos, Diuron e Hexazinona isoladamente.

2.1 PREPARO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Uma água reconstituída foi utilizada nos ensaios para diluições de contaminantes e para o cultivo dos organismos testes, esta água foi preparada em laboratório com adição de reagentes químicos para obtenção de valores de pH de $7,3 \pm 0,3$ e dureza de 44 ± 4 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e mantida em temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, para o controle destes valores, estes parâmetros foram analiticamente verificados semanalmente (APHA, 2005). Na Tabela 1 estão apresentadas as quantidades dos reagentes químicos de pureza analítica que foram utilizados no preparo da água reconstituída do cultivo.

Após preparação da água reconstituída a mesma foi aerada por 12 h através de um compressor de ar, para proporcionar solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Dessa água reconstituída, foram mantidas soluções-estoque aeradas constantemente em frasco de 1000 mL, para posteriormente serem utilizadas no cultivo dos organismos-testes que necessita de uma renovação da água três vezes por semana, com uma troca total e outras duas parciais de 50%, tendo-se o cuidado no manuseio para evitar alterações na temperatura da água ($\pm 2^\circ\text{C}$) para não causar danos aos organismos-testes.

2.2 PREPARAÇÃO DOS ALIMENTOS PARA OS ORGANISMOS

De acordo com a metodologia aplicada, o alimento utilizado para os organismos-testes foram algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata* e um alimento composto à base de ração comercial para peixe e fermento biológico. O fornecimento do alimento no cultivo das algas foi diário, com dosagens controladas, evitando que os organismos permanecessem mais de 48h sem alimentação e/ou com excesso de alimentos.

Para o preparo do meio de cultivo das algas foram adicionados 30 mL de meio CHU (CHU, 1942) em 1,5 L de água destilada, cujas soluções de preparo foram esterilizadas em autoclave na temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, por 20 minutos. Após resfriamento dessas soluções, foram adicionadas iscas de culturas da alga para a sua posterior reprodução. Na Figura 1, é apresentado o frasco com o cultivo das algas.

Para a obtenção de células viáveis, as culturas de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* foram mantidas em temperatura entre 20° a 25°C , com permanente aeração e iluminação artificial com 4 lâmpadas fluorescentes compactas de 25W, após atingirem o crescimento adequado, em aproximadamente 7 dias, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante do meio de cultura das algas foi descartado, as algas sedimentadas foram coletadas e posteriormente levadas à câmara de Neubauer para contagem do número de células viáveis por mL.

TABELA 1: Quantidade de reagentes químicos de pureza analítica (PA) utilizados na preparação da água reconstituída com diluição para 1000 mL no cultivo das *Ceriodaphnia dubia*.

Reagente P.A.	Fórmula molecular	Quantidade (mg)
Sulfato de cálcio	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1500
Cloreto de potássio	KCl	200
Bicarbonato de sódio	NaHCO_3	4800
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6100

Fonte: NBR 13.373 (ABNT, 2005).



FIGURA 1: Manutenção de meio de cultura de algas *Pseudokirchneriella subcapitata*.

No fornecimento do alimento aos organismos teste, à base de algas verdes, utilizou-se uma dosagem de 1 a 5×10^5 células por organismo, diariamente, de acordo com as recomendações da NBR 13.373 (ABNT, 2005).

Com o objetivo de otimizar o processo de contagem das algas (n° de células.mL⁻¹), foi desenvolvida uma técnica analítica alternativa por espectrofotometria na região de UV-visível em um equipamento Espectrofotômetro Cary 1E, da marca Varian, com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Uma varredura da cultura na região de UV-visível foi empregada para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima, em seguida, foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações conhecidas de alga obtendo-se uma correlação entre absorbância e número de células por mL (PASCHOALATO *et al.* 2013).

No preparo do alimento composto, utilizou-se 5 g de ração comercial para peixe dissolvida em 1 L de água destilada, mantido sob aeração por 7 dias, o qual foi filtrado em papel qualitativo e posteriormente separado em porções de 50 mL, armazenados em frascos plásticos descartáveis e mantidos em temperatura de -4º C (em freezer). Para a utilização, esperou-se atingir a temperatura ambiente natural e foi adicionado

0,25 g de fermento biológico mais 50 mL de água destilada para formar 100 mL. Esse composto, em seguida, foi novamente filtrado em papel qualitativo e armazenado em geladeira sendo consumido em até uma semana.

2.3 MANUTENÇÃO DE ORGANISMOS TESTES E ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

Os organismos foram mantidos em laboratório climatizado (23°C) em recipientes de vidro e divididos em lotes de até 70 adultos por litro, os recipientes foram cobertos por filme plástico com furos. Foi utilizado um equipamento de foto período para controle de 16 h de luz em todas as culturas de *Ceriodaphnias dubias*. A Figura 2 mostra os recipientes utilizados para a manutenção dos organismos-testes. Desses recipientes obtiveram-se as neonatas de *Ceriodaphnia dubia* que foram utilizadas nos testes agudos.

A manutenção e a separação das neonatas de *Ceriodaphnias dubia* objetivou um melhor desempenho na reprodução, a fim de evitar o excesso de população e, posteriormente, serem utilizadas para avaliar a toxicidade aguda de substâncias químicas em contato com esses organismos. Na Figura 3 podemos ver um exemplar de *Ceriodaphnia dubia* (MBL, 2005).



FIGURA 2: Manutenção dos organismos-testes.



FIGURA 3: Exemplar de *Ceriodaphnia dubia*.
Fonte: MBL Aquaculture (2005).

A separação dos organismos de *Ceriodaphnias dubia* ocorreu a cada 3 dias, considerando a idade e diferentes lotes. O procedimento de separação das *Ceriodaphnias dubias* adultas das neonatas (de 6 a 24 h de vida), foi realizado com o auxílio de uma pipeta automática com ponteira descartável, onde as neonatas eram capturadas e inseridas em uma nova solução de água reconstituída, a fim de serem posteriormente utilizadas nos testes agudos. A justificativa da utilização apenas de organismos neonatas nos testes agudos é por serem mais sensíveis aos agentes químicos do que os organismos adultos, e por haver diferenças no grau de desenvolvimento dos mecanismos de desintoxicação entre organismos jovens e adultos (FORGET *et al.*, 2005).

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 h (RAND *et al.*, 1995). Neste trabalho, o tempo de exposição estudado foi de 48 h (CETESB, 1991; USEPA, 2001 e ABNT, 2004).

Para os ensaios de toxicidade aguda foram selecionados organismos neonatas de *Ceriodaphnia dubia*, de 6 a 24 h de idade, e estes foram expostos ao contaminante por um período de 48 h, sem iluminação e sem o fornecimento de alimento. Para a separação dos organismos neonatas, com idade desejada, novamente foi necessária à aspiração com auxílio de um pipetador, um dia antes de iniciar os testes agudos, de um lote de fêmeas ovadas, posteriormente transferidas para frascos que foram mantidos a 23°C, sendo alimentadas com algas *Pseudokirchneriella subcapitata* em uma concentração de aproximadamente 2×10^5 e de alimento composto com 2 mL.L⁻¹.

Os efeitos observados nos organismos testes são a imobilização ou a letalidade. É importante ressaltar que são considerados imóveis, além dos organismos aparentemente mortos, aqueles incapazes de nadar na coluna d'água em até 15 segundos após leve agitação do recipiente. Para cada teste definitivo de toxicidade aguda, foi observada a imobilização dos organismos para determinação da CE_{50-48 h} (concentração efetiva

média), isto é, a concentração do agente tóxico que causa imobilidade estatisticamente a 50% dos organismos teste depois de 48 horas de exposição ao contaminante.

Os testes de toxicidade aguda para o herbicida comercial foram realizados partindo-se de uma solução de herbicida comercial preparada para a obtenção de uma concentração de 25 mg.L⁻¹, adotado em função da composto com menor solubilidade (diuron 42mg/L), em seguida foram preparadas, por diluições, 26 soluções de concentrações que variaram de 0,50 a 13 mg.L⁻¹, sendo essas concentrações baseadas em ensaios preliminares.

Nos ensaios de toxicidade aguda para diuron, partiu-se de uma solução de 25 mg.L⁻¹, em seguida foram diluídas para obtenção de 15 concentrações variando entre 0,25 a 12 mg.L⁻¹ e nos ensaios de toxicidade aguda para hexazinona, partiu-se de uma solução de 1.000 mg.L⁻¹, que por diluições obteve-se 15 diferentes concentrações variando entre 1 a 500 mg.L⁻¹. Em todos os ensaios foi inserido um controle (sem contaminação) e os mesmos foram realizados em triplicata. Os recipientes utilizados foram frascos de vidro com capacidade para 25 mL, conforme a Figura 4.

Foram colocadas nesses frascos 20 mL das soluções diluídas dos herbicidas comercial, puro e do controle, em seguida, foram transferidos 5 organismos neonatos para cada frasco com o auxílio de uma pipeta automática com ponteira descartável e acondicionados em estufa incubadora com temperatura controlada entre 23°C a 25°C.

Durante o período de testes, os frascos foram mantidos sem alimentação e ausência total de iluminação, sendo que as variáveis físicas e químicas (pH, dureza total e oxigênio dissolvido) foram controladas semanalmente durante o decorrer dos testes.

Após 48 horas, com o auxílio de uma lupa, observou-se e quantificou-se o número de indivíduos imóveis por frascos, em triplicata. O método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays* (HAMILTON *et al.*, 1977; APHA, 2005), foi utilizado para cálculo dos

valores de CE_{50} , que são relativos à imobilização dos organismos testes, que correspondem às concentrações das amostras no início do ensaio com efeito de toxicidade aguda a 50% dos organismos expostos a 48 h.



FIGURA 4: Frascos de vidro utilizados nos testes agudos.

Os métodos *Spearman-Karber* e *Trimmed Spearman-Karber* são métodos não paramétricos que têm boas propriedades estatísticas, são fáceis de usar e são recomendados para cálculos precisos de CE_{50} (Concentração Efetiva Média) e CL_{50} (Concentração Letal Média) com intervalo de confiança de 95% (HAMILTON *et al.*, 1977). Os valores numéricos de toxicidade aguda, expressos em CE_{50} exprimem uma relação inversa com a toxicidade, ou seja, quanto menor esse valor maior a toxicidade (SILVA *et al.*, 2012).

O método estatístico de *Trimmed Spearman-Karber* é válido para curvas dose-resposta simétricas e assimétricas. A única limitação desse método em relação aos métodos paramétricos é que deve cobrir o intervalo de zero a 100% de mortalidade ou de efeito agudo (HAMILTON *et al.*, 1977; APHA, 2005; BAEZ *et al.*, 2004).

2.4 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS TESTES

De acordo com Santos *et al.* (2007), estudos mostraram que cloreto de sódio (NaCl) pode ser usado como um produto tóxico de referência, atendendo à dois requisitos importantes em uma pesquisa: o NaCl é menos perigoso para a

manipulação humana e para o ambiente quando comparado ao tradicional dicromato de potássio e a outros, e sua reprodutibilidade é aceitável em testes laboratoriais de rotina.

Os organismos testes foram avaliados em relação à sensibilidade a fim de assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados exigidos pela norma da ABNT.

No ensaio de sensibilidade, a substância empregada foi o cloreto de sódio de pureza analítica (NaCl PA), foram realizados 5 ensaios, em duplicata, com 5 concentrações e um controle, variando entre 0,6 a 2,2 $g.L^{-1}$ de NaCl, os valores obtidos foram utilizados no cálculo do CE_{50} para o NaCl. Os resultados devem compreender um intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da realização de um espectro (varredura) entre os comprimentos de onda de 200 a 800 nm, determinou-se o valor do comprimento de onda de máxima absorção de 685 nm, considerando a coloração esverdeada da solução. Este comprimento de onda foi utilizado na construção da curva de calibração pelo método espectrofotométrico.

Partindo-se de uma concentração de algas de $2,05 \times 10^7$ nº células. mL^{-1} , previamente determinada na câmara de Neubauer, foram feitas diluições de concentrações decrescentes para a construção da curva de calibração de absorbância em função do nº células por mL.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9995, indicando que a técnica analítica apresentou uma linearidade satisfatória, conforme mostrado na Figura 5, permitindo a quantificação do número de células por mL de maneira rápida e com confiabilidade. De acordo com ANVISA, (2003) o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser de superior ou igual a 0,99.

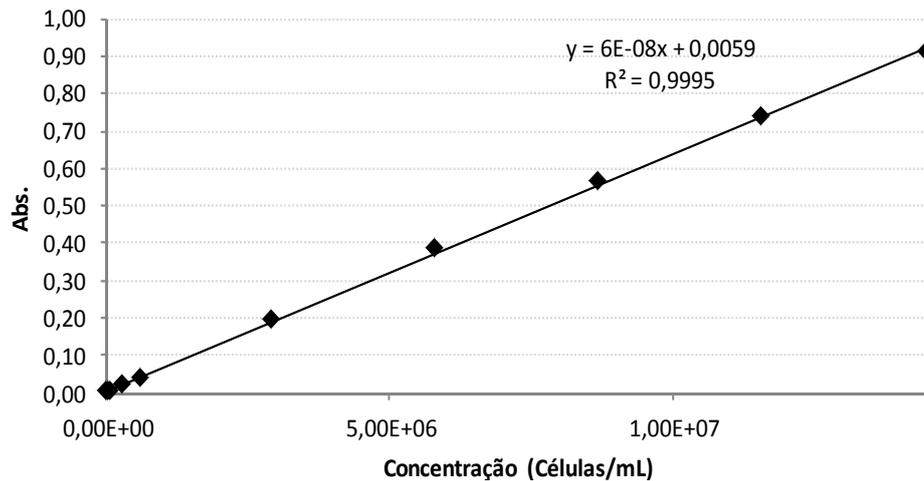


FIGURA 5: Curva de calibração do método alternativo de contagem de algas para a alimentação dos organismos-testes.
Fonte: Paschoalato *et al.* 2013.

Nos testes agudos com neonatas de *Ceriodaphnia dubia*, primeiramente, foi avaliado como contaminante o herbicida comercial, utilizando-se 26 concentrações e mais uma solução para controle. Posteriormente, os compostos ativos do herbicida comercial foram avaliados separadamente, sendo o Diuron e o Hexazinona, ambos em 15 concentrações distintas e mais uma solução de controle para cada composto. Em todos os testes foram observados os CE_{50-48h} , a partir das porcentagens de imobilização dos organismos testes expostos por 48 h a várias concentrações destes contaminantes.

O valor obtido de CE_{50-48h} para os testes agudos com um herbicida comercial foi de 5,78 $mg.L^{-1}$, o qual representa estatisticamente 50% de imobilização dos organismos testes. A Figura 6 demonstra a concentração do herbicida comercial em função da porcentagem de imobilidade dos organismos testes, a faixa de toxicidade variou de 1,5 $mg.L^{-1}$, que representa a concentração máxima que não causa imobilidade aos organismos a 11,5 $mg.L^{-1}$, a qual representa a concentração que causa 100% de imobilidade aos organismos.

De acordo com Silva *et al.* (2010), em um trabalho no qual foi utilizado o mesmo herbicida comercial e os organismos teste foram peixes *Danio rerio*, obteve-se como resposta do CL_{50} um valor de 581,50 $mg.L^{-1}$. O mesmo trabalho também detectou que a partir de 50 $mg.L^{-1}$ desse herbicida, houve alterações comportamentais significativas, como hipoatividade, relacionada ao movimento natatório em mais de 50% dos organismos. Portanto os resultados encontrados com o mesmo herbicida comercial demonstraram que as espécies *Ceriodaphnia dubia*, sendo de menor tamanho corpóreo e de nível trófico anterior, sofreram maiores efeitos tóxicos do que comparado as espécie de peixes *Danio rerio*. Segundo Williamson (1980), os animais pequenos apresentam uma maior taxa metabólica.

Os resultados dos testes com os componentes puros Diuron e Hexazinona, foram realizados separadamente, com propósito de uma avaliação específica de seus efeitos tóxicos. Na Figura 7 estão apresentados os resultados obtidos com o Composto Diuron e o valor obtido de CE_{50} que foi de aproximadamente 2,9 $mg.L^{-1}$.

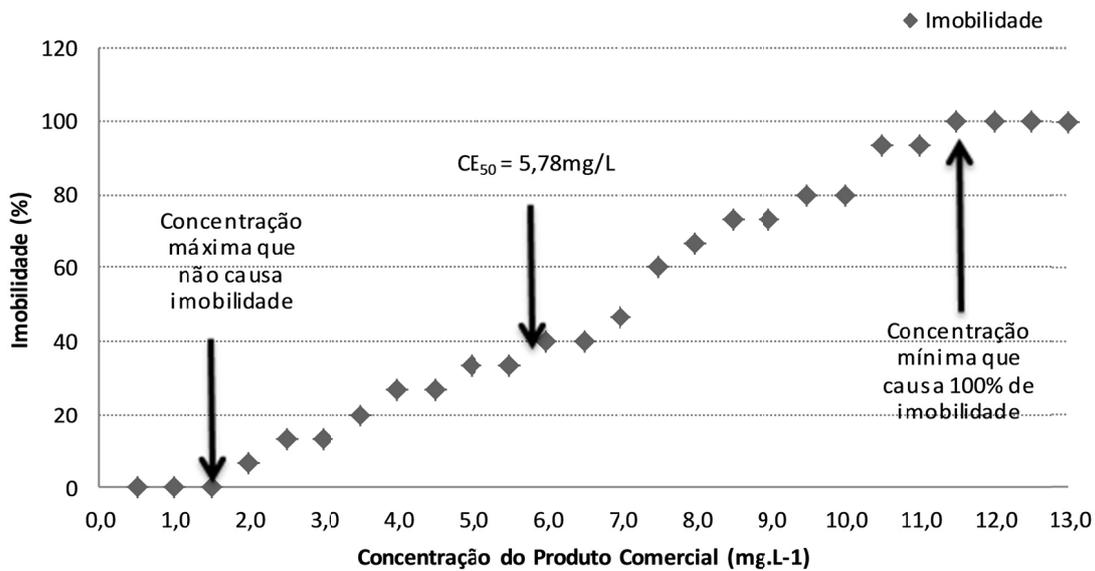


FIGURA 6: Concentração do herbicida comercial em função da porcentagem de imobilidade dos organismos testes.

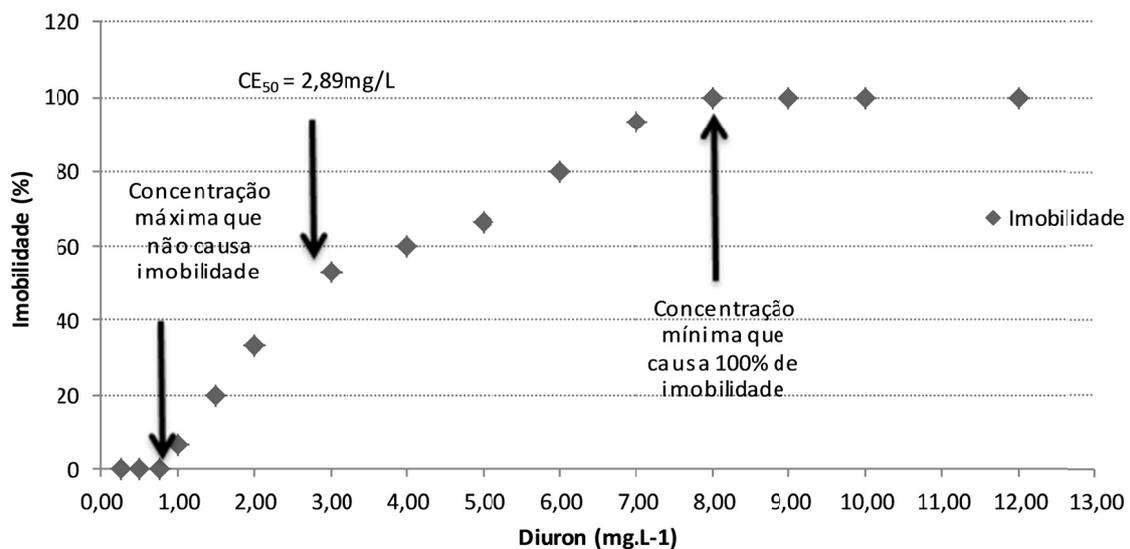


FIGURA 7: Resultado do valor de CE_{50} nos testes agudos com o herbicida diuron com porcentagem de imobilidade dos organismos testes em função da concentração.

Na Figura 8 estão apresentados os resultados obtidos nos testes agudos com *Ceriodaphnia dubia* expostas em hexazinona e o valor obtido de CE_{50} foi de aproximadamente $105,56 \text{ mg.L}^{-1}$.

De acordo com dados da USEPA (1997 e 2003) foram encontrados valores de CL_{50} para diuron de $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e para hexazinona valores de CL_{50} de $151,6 \text{ mg.L}^{-1}$ em testes agudos com *Daphnia magna*, esses valores comparados aos obtidos no

trabalho demonstram variações no valor de CL_{50} . Segundo dados na literatura, as condições do meio, por serem espécies de diferentes sensibilidades a um mesmo contaminante ou a contaminantes diferentes, valores de CL_{50} podem ser passíveis de variações, não podendo assim ser justificados baseando-se em apenas um dado.

Nas Tabelas 2 e 3, estão apresentadas as compilações de valores de CE_{50} e CL_{50} para diferentes organismos testes, expostos aos

herbicidas diuron e hexazinona respectivamente, em trabalhos realizados por diferentes autores e classificados por ordem trófica.

Dentre os valores de CE_{50} e CL_{50} encontrados na literatura, a faixa de toxicidade do diuron para algas variou entre 0,0007 a 0,070 $mg.L^{-1}$; para os cladoceras essa faixa ficou em 2,9 a 21,117 mg/L e, para os peixes, variou de 4,3 a 42 $mg.L^{-1}$ respectivamente. As espécies de algas foram mais afetadas pelo diuron, por ser um herbicida, o diuron tem seu efeito direcionado para a inibição da fotossíntese, conseqüentemente prejudicando o crescimento de algas. Os invertebrados aquáticos, por serem de níveis tróficos anteriores as *Daphnias*, apresentaram níveis maiores de sensibilidade à

toxicidade do diuron.

Os organismos aquáticos que apresentaram maior sensibilidade ao diuron foram as *Ceriodaphnias dubia*, dentre as cladoceras, pois são espécies com menor tamanho corpóreo, filtradores na cadeia alimentar, apresentando assim, uma maior sensibilidade à exposição, do que espécies de tamanho corpóreo maior (WILLIAMSON, 1980; FREITAS e ROCHA, 2012). Além disso, a reprodução assexuada desses crustáceos por partenogênese garante a produção de organismos geneticamente idênticos, permitindo assim a obtenção de organismos-teste com sensibilidade constante (TATARAZAKO *et al.*, 2003; BURATINI *et al.*, 2004).

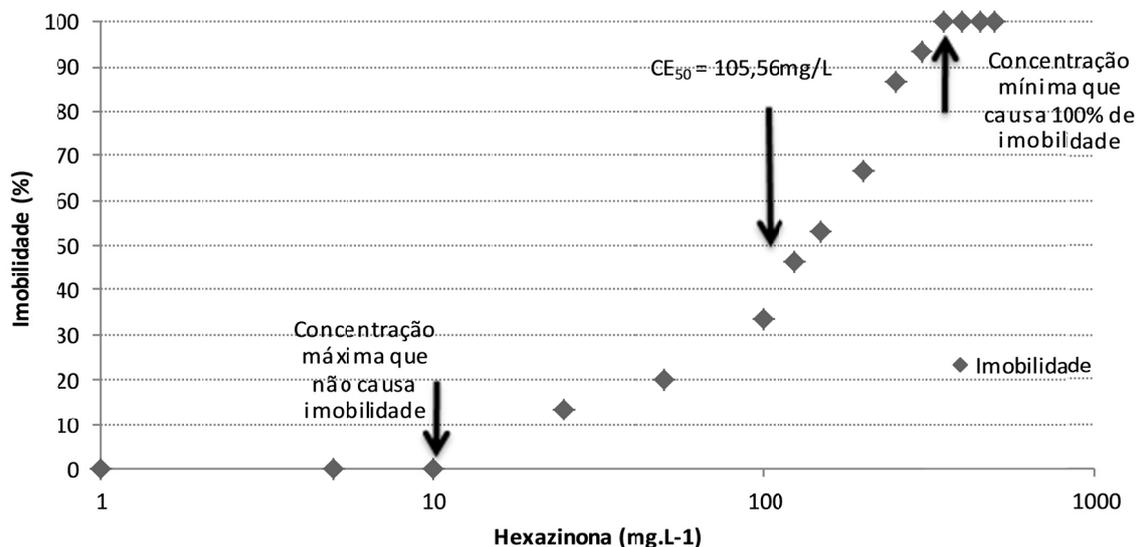


FIGURA 8: Resultados do valor de CE_{50} nos testes agudos com hexazinona com a porcentagem de imobilidade em função da concentração.

TABELA 2: Referência de valores de CE_{50} e CL_{50} para diferentes organismos, organizados por níveis tróficos, expostos ao diuron.

Organismos testes	Diuron		Referências
	CE_{50} (mg/L)	CL_{50} (mg/L)	
Invertebrados aquáticos		1 a 2,5-48h	Giacomazzi, 2004
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	0,05 a 0,07-24h		Neuwoehner <i>et al.</i> , 2008
<i>Selenastrum capricornotum</i>	0,045-72h		Fernandez-Alba, 2002
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	0,0007-96h		Ma, <i>et al.</i> , 2006
Cladoceras em geral		21,117-48h	Sanchez-Bayo, 2006
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	2,9-48h		Presente estudo
<i>Daphnia magna</i>	8,6-48h		Fernandez-Alba, 2002
<i>Daphnia pulex</i>		17,9-96h	Nebeker, 1998
<i>Hyalella azteca</i>		19,4-96h	Nebeker, 1998
Truta arco-íris		3,5-96h	Giacomazzi, 2004
Peixes		4,3 a 42-48h	Giacomazzi, 2004

XTABELA 3: Valores de CE50 e CL50 para diferentes organismos, organizados por níveis tróficos, expostos a hexazinona.

Organismos testes	Hexazinona		Referências
	CE ₅₀ (mg/L)	CL ₅₀ (mg/L)	
<i>Selenastrum capricornutum</i>	0,126 - 168h		Montague, 2000
Cladoceras em geral		130,88 - 48h	Sanchez-Bayo, 2006
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	105,56 - 48h		Presente estudo
<i>Daphnia magna</i>	151,6 - 48h		Montague, 2000
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>		839 - 48h	Wan <i>et al.</i> , 1988
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>		728 - 72h	Wan <i>et al.</i> , 1988
<i>Oncorhynchus keta</i>		286 - 48h	Wan <i>et al.</i> , 1988
<i>Oncorhynchus keta</i>		146,7 - 96h	Montague, 2000

Os valores de CE₅₀ e CL₅₀ para Hexazinona testados em organismos das espécies cladocera, ficaram na faixa de 105,56 a 151,6 mg.L⁻¹, os demais organismos, apresentaram valores entre 146,7 a 839 mg.L⁻¹, sendo assim mais resistentes. Portanto, os organismos de níveis tróficos acima dos cladoceras, na cadeia alimentar, apresentam maior resistência aos efeitos tóxicos à Hexazinona.

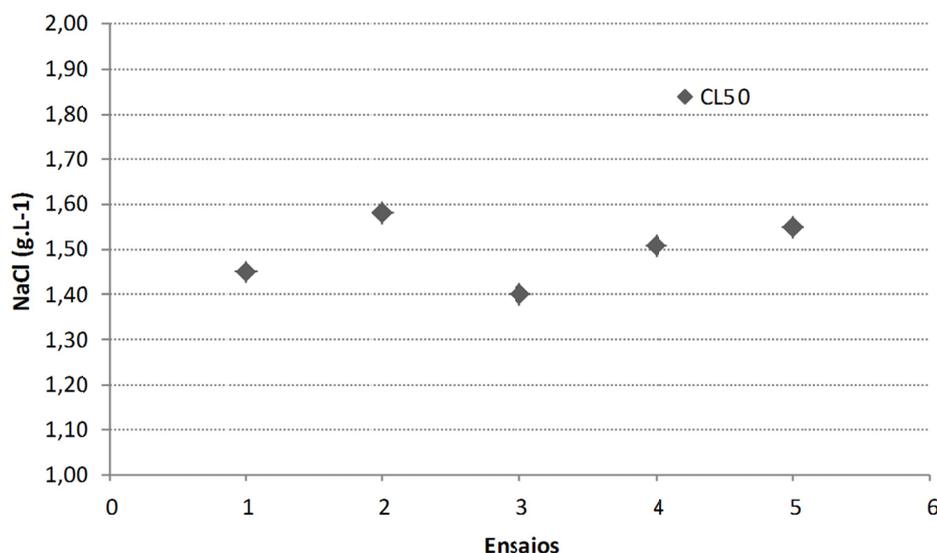
As algas são drasticamente afetadas pelos efeitos tóxicos dos herbicidas diuron e hexazinona que são inibidores da fotossíntese. As *Ceriodaphnia dubia* são animais de tamanho corpóreo pequeno e com alta taxa metabólica, filtradores do zooplâncton e consumidores primários na cadeia alimentar, mostrando neste trabalho serem organismos de alta sensibilidade à alteração do meio e a presença dos herbicidas estudados.

Foram estabelecidos valores de concentrações, através dos testes de sensibilidade

para os organismos utilizando o cloreto de sódio (NaCl). A partir desses resultados adquiridos de cada 5 concentrações testadas, foram calculados os CE₅₀ 48 h destas concentrações nos testes de sensibilidade.

Na Figura 9 está demonstrada a faixa de sensibilidade obtida para a *Ceriodaphnia dubia* sob exposição ao NaCl. A linha central representa o valor médio das CE₅₀-48 h obtidas de 1,50 g.L⁻¹ de NaCl, as linhas tracejadas inferior e superior demonstram os intervalos de sensibilidade que variou entre 1,33 e 1,68 g.L⁻¹ de NaCl, obtendo-se os desvios-padrões aceitáveis exigidos pela ABNT.

Todos os valores se apresentaram dentro do desvio padrão esperado, sendo assim os testes de sensibilidade asseguraram a qualidade dos organismos-testes e a confiabilidade dos resultados.

**FIGURA 9:** Resultados das CE₅₀-48h dos testes de sensibilidade da *Ceriodaphnia dubia* a exposição com o NaCl.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela importância econômica da cultura da cana-de-açúcar para o desenvolvimento do país combinada a preocupação em preservação dos recursos hídricos visando os usos múltiplos e sustentabilidade, pelos resultados dos testes de toxicidade para o herbicida comercial e dos compostos diuron e hexazinona, pode-se concluir que o organismo teste utilizado, *Ceriodaphnia dubia*, apresentou uma facilidade de cultivo em laboratório, sensibilidade durante as realizações dos testes e reprodutividade, mostrando a viabilidade de sua utilização em testes de ecotoxicidade.

Os testes de sensibilidade apresentaram-se dentro do intervalo de confiabilidade exigido pela norma da ABNT NBR 12713, concluindo-se pela validação dos resultados encontrados para os compostos estudados. Os testes agudos mostraram que os herbicidas em estudo, são microcontaminantes e apresentam toxicidade para organismos aquáticos no nível trófico primário da cadeia alimentar.

Nos resultados obtidos para CE₅₀-48h em testes com *Ceriodaphnia dubia* foram obtidos valores para diuron de 2,9 mg.L⁻¹ e para hexazinona de 105,56 mg.L⁻¹, conclui-se que diuron tem potencial tóxico, aproximadamente 37 vezes superior, quando comparado a hexazinona.

O produto herbicida comercial teve o seu resultado de CE₅₀-48h de 5,78 mg.L⁻¹, podendo-se concluir que a presença de 13,2% de hexazinona na mistura tenha proporcionado uma redução da toxicidade em relação ao diuron puro nos organismos testes.

Avaliando-se os valores obtidos de toxicidade por diversos trabalhos consultados na literatura, mesmo considerando organismos pertencentes a diferentes cadeias tróficas, os valores de CE₅₀ apresentaram-se próximos, porém, faz se necessário à compilação de diversos ensaios de diferentes níveis tróficos, no intuito de gerar dados para as avaliações de análise de risco, afim de que os órgãos regulamentadores possam, com segurança, estabelecer limites máximos permissíveis para qualidade das águas superficiais na legislação brasileira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Norma NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea)**. 21p. Rio de Janeiro-RJ, 2004.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Norma NBR 13373: **Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp.* (Cladocera, Crustácea)**. 15 p. Rio de Janeiro, 2005.

APHA, AWWA, WPCF - American Public Health Association; American Water Works Association; Water Public Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21th Washington, D.C., 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003: **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.

ARMAS, E.D. **Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na sub-bacia do rio Corumbataí**. (Tese de doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 186 p., Piracicaba, SP. 2006.

BAEZ, M.C.D.; ROSSINI, G.D.B. & GRANADOS, Y.P. 2004. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluacion de Calidad de Aguas - Estandarizacion, Intercalibracion, Resultados y Aplicaciones**. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa, Canada.

____BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 31 de março de 2005. **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2005.

____BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Portaria MS n.º 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2011.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. 2004. **Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays**. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 73(5): 878-882.

- CHU, S. P. 1942. **The influence of the miceral composition of the medium on the growth of planktonic algae. L-methods and culture media.** Journal of Ecology, n 30, p.284-325.
- CETESB- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. 1991. **Avaliação da toxicidade crônica utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1864 (Cladocera, Crustacea).** São Paulo-SP.
- CONAB. 2011. disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 10 outubro de 2011.
- FERNANDEZ-ALBA, A.R.; HERNANDO, M.D.; PIEDRA, L.; CHISTI, Y. 2002. **Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays.** Analytica Chimica Acta 456. 303-312.
- FORGET-LERAY, J.; LANDRIAU, I.; MINIER, C.; LÉBOULENGER, F. 2005. **Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Pope).** Ecotoxicology and Environmental Safety, 60: 288-294.
- FREITAS, E.C.; ROCHA, O.; 2012. **Acute and chronic effects of atrazine and sodium dodecyl sulfate on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*.** *Ecotoxicology* 21: 1347-1357.
- GIACOMAZZI, S.; COCHET, N.; 2004. **Environmental impact of diuron transformation: a review.** Chemosphere 56. 1021-1032.
- HAMILTON, M.; RUSSO, R.C.; THURFTON, R.B. 1977. **Trimmed Spearman-Kärber method forestimating median lethal concentrations in toxicity biossays.** *Environmental Science Technology*, 11(7): 714-719.
- Indicadores de desenvolvimento sustentável Brasil (IBGE).** 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids>. Acesso em 20 outubro de 2011.
- MBL Aquaculture (2005). Disponível em <http://www.mblaquaculture.com/content/organisms/daphnids.php>. Acesso em 20 outubro de 2011
- MA, J.; WANG, S.; WANG, P.; MA, L.; CHEN, X.; 2006. **Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*.** *Ecotox. And Environm. Safety* 63. 456-462.
- MONTAGUE, B. 2000. **Onliner Pesticide Toxicity Database.** USEPA.
- NEBEKER, A.V. & SCHUYTEMA, G.S.. 1998. **Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, and snails.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35. 441-446.
- NEUWOEHNER, J.; JUNGHANS, M.; KOLLER, M.; ESCHER, B.I.. 2008. **QSAR analysis and specific endpoints for classifying the physiological modes of action of biocides in synchronous green algae.** *Aquat. Toxicol.* 90. 8-18.
- PASCHOALATO, C. F. P. R.; SILVA, B. M.; SOUZA, M. B.; BOLDRIN, T. R.; ROCHA, R. H.. 2013. **Método Alternativo para contagem de algas utilizadas como alimento em ensaios de ecotoxicidade.** 27º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, I-356 15 a 19 setembro 2013 Goiânia- GO
- RAND, G.M.; WELL, P.G.; MCCARTHY, L.S. 1995. **Introduction to aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2ª edition. Taylor & Francis.
- RONCO, A.; BÁEZ, M.C.D.; GRANADOS, Y.P. 2004. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas- Estandarización, Intercalibración, resultados y Aplicaciones.** In: Morales, G.C. (ed). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa.
- SANCHEZ-BAYO, F. 2006. **Comparative acute toxicity of organic pollutants and reference values crustaceans, I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda.** *Environmental Pollution*. Vol. 139. 385-420p.
- SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIROR. T. R. 2007. **Sensitivity of Four Test Organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an Alternative Reference Toxicant.** *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. v 2, nº 3, 229-236p.
- SILVA, B.M.; RAVANELI, M.A.C.; PASCHOALATO, C.F.P.R.; 2010. **Toxicidade aguda dos herbicidas diuron e hexazinona à *Danio Rerio*.** *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba*, v. 20, p. 17-28.
- SILVA, J.D; COSTA, R.H.R.; MATIAS, W.G; JR CASTILHO, A.B.; 2012. **Avaliação da Toxicidade de Lixiviados de Aterro Sanitário em Sistema de Lagoas de Estabilização com Testes de Toxicidade Aguda (*Daphnia magna*).** São Paulo. *Revista DAE*, N.189, p.40-49.
- TATARAZAKO, N., ODA, S., WATANABE, H., MORITA, M. & IGUSHI, T. 2003. **Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*.** *Chemosphere*, 53: 827-833.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration Eligibility Decision (RED) Hexazinone.** 1997. WASHINGTON, D.C. 20460

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2001. **Streamlined water effect ratio procedure for discharges of copper**. Washington, D.C.41p.

USEPA -UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2003. **Reregistration eligibility decision (RED) for Diuron**. WASHINGTON, D.C. 20460. September 30, 2003

UNICA. Disponível em [http: www.unicadata.com.br](http://www.unicadata.com.br). Acessado em outubro de 2013.

WAN, M.T.; WATTS, R.G.; MOUL, D.J.. 1988. **Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids of hexazinone and its formulated products: Pronone 10G Velpar L, and their carriers**. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41: 609-616.

WILLIAMSON, P. 1980. **Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis***. O ecologia, 44: 213-220.