

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONALIZANTE EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

ESTUDO DA ECOTOXICIDADE AGUDA EM *DANIO RERIO*
DE UM HERBICIDA COMERCIAL E SEUS PRINCIPAIS
COMPONENTES DIURON E HEXAZINONA

MICHEL AUGUSTO CAMARGO RAVANELI

Ribeirão Preto-SP

Maio/09

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONALIZANTE EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

ESTUDO DA ECOTOXICIDADE AGUDA EM *DANIO RERIO*
DE UM HERBICIDA COMERCIAL E SEUS PRINCIPAIS
COMPONENTES DIURON E HEXAZINONA

MICHEL AUGUSTO CAMARGO RAVANELI

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Cristina F. P. Rosa Paschoalato

Ribeirão Preto-SP

Maio/2009

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

R252e Ravaneli, Michel Augusto Camargo, 1982 -
Estudo da ecotoxicidade aguda em *Danio rerio* de um herbicida
comercial e seus principais componentes diuron e hexazinona /
Michel Augusto Camargo Ravaneli. - - Ribeirão Preto, 2009.
95f: il. color.

Orientador (a): Profa. Dra. Cristiana Filomena P. R. Paschoalato.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biologia, área de concentração: Tecnologia
ambiental.
Ribeirão Preto, 2009.

1. Tecnologia ambiental. 2. Praguicidas 3. Toxicidade aguda.
4. Ecotoxicologia. I. Título.

CDD: 628.52

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, José Raveli e Zilda,
pelo apoio e incentivo aos estudos.

A minha companheira Lilian pelo apoio,
paciência, dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato a qual me deu a oportunidade de ser seu orientado, contribuindo com sua sabedoria e conhecimento.

A Prof^a. Dr^a. Luciana Rezende Alves de Oliveira e ao Prof. Dr. Luciano Farias de Novaes pelas dicas e sugestões que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Danielle Palma de Oliveira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP por ter disponibilizado de seu tempo e conhecimento, contribuindo diretamente com sua experiência em ecotoxicidade.

Ao Prof. Me. Rodrigo Latanze por sua ajuda e ao Prof. Esp. Gustavo B. Camitini o qual contribuiu com seu conhecimento estatístico.

Aos amigos do mestrado, Jessé Figueiredo, Duran e Rodrigo Ricardo pelo apoio e amizade.

Ao aluno de iniciação científica e amigo Bruno a qual devo grande parte deste trabalho o qual participou ativamente seja através das discussões ou análises.

A todos os amigos do laboratório e funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho: Danilo, Mônica, José Renato, Taís, Dauani, Tiago, Lorraine e José Guilherme.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Os herbicidas e a cultura canavieira	7
3.2 Comportamento dos herbicidas no solo	10
3.3 A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por herbicidas	11
3.4 Bioacumulação e biomagnificação	14
3.5 A ecotoxicologia aquática como ferramenta no monitoramento ambiental	16
3.5.1 Biomonitoramento	18
3.6 Descrição do organismo teste <i>Danio rerio</i>	18
3.7 Comportamento dos organismos sob o efeito de agentes tóxicos	20
3.8 Ensaio ecotoxicológicos	21
3.9 Carta-controle	24
3.9.1 Análise dos gráficos de controle	25
4 METODOLOGIA	29
4.1 Origem dos peixes	30
4.2 Controle da sanidade, aclimatação e soltura dos peixes	30
4.2.1 Preparo da água de diluição	32
4.3 Aclimatação a água de diluição	34
4.4 Recipiente ensaio	35
4.5 Ensaio preliminar com o herbicida comercial	36
4.6 Ensaio definitivo com o herbicida comercial	37
4.7 Ensaio definitivo com os principais componentes do herbicida comercial	39
4.8 Parâmetros de controle	39
4.8.1 Aclimatação	40
4.8.2 Água de diluição	40

4.8.3 Ensaio estático de 48 horas	41
4.9 Cálculo da concentração letal mediana (CL ₅₀)	42
4.10 Análise do comportamento dos peixes	42
4.11 Ensaio de sensibilidade e de repetibilidade	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE A	74
APÊNDICE B	76
APÊNDICE C	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural dos herbicidas, principais componentes do produto comercial.	8
FIGURA 2 - Esquema representativo do comportamento e destino do herbicida no solo.	11
FIGURA 3 - Processos de transporte de herbicida no ambiente.	12
FIGURA 4 - Organismo teste peixe <i>Danio rerio</i> macho ♂ e fêmea ♀.	19
FIGURA 5 - Fluxograma com o resumo da metodologia.	29
FIGURA 6 - Tanques de cultivo dos peixes.	30
FIGURA 7 - Caixa de aclimatação e controle da sanidade dos peixes.	31
FIGURA 8 - Termostato eletrônico de 200 W ViaAcqua.	31
FIGURA 9 - Sequência do procedimento e equalização da temperatura da água do saco com a da caixa (A); equiparação do pH (B) e soltura dos peixes utilizando rede de nylon (C).	32
FIGURA 10 - Recipiente sob 24 horas de aeração para saturação de oxigênio, estabilização e dissolução total dos sais.	33
FIGURA 11 - Aquário de aclimatação dos peixes.	35
FIGURA 12 - Sistema de filtragem biológica composto por uma bomba de 1500 L/h e anéis de cerâmica utilizada para a filtragem do aquário.	35
FIGURA 13 - Vista frontal do recipiente ensaio com os 8 compartimentos	36

anteriores.

FIGURA 14 - Vista em planta do recipiente ensaio com seu compartimento 36
único posterior.

FIGURA 15 - Controle da temperatura durante os ensaios preliminares e 49
definitivos com herbicida comercial.

FIGURA 16 - Tela de apresentação dos resultados obtidos utilizando o 51
programa do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber versão 1.5.

FIGURA 17 - Representação gráfica da porcentagem da mortalidade de 52
Danio rerio em função do aumento da concentração do herbicida comercial
composto por 13,2% em massa de hexazinona e 46,8% em massa de
diuron no teste de toxicidade aguda.

FIGURA 18 - Ensaio definitivo com o herbicida comercial onde se observou 54
hiperatividade dos peixes representada pelo comportamento de escape,
devido ao estresse gerado pelo agente tóxico.

FIGURA 19 - Diminuição da mobilidade dos peixes devido à realocação de 55
energia para outros processos fisiológicos.

FIGURA 20 - Carta-controle da sensibilidade com os resultados das 56
mortalidades, a média amostral (\bar{x}), o limite superior de controle (LSC) e o
limite inferior de controle (LIC), utilizando-se como substância de referência
dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

FIGURA 21 - Resultados das mortalidades do ensaio de repetibilidade com 57
o herbicida comercial, média amostral (\bar{x}), limite superior de controle (LSC)
e limite inferior de controle (LIC).

FIGURA 22 - Controle da temperatura durante os ensaios definitivos com 58 diuron e com a hexazinona.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ficha técnica dos principais componentes do herbicida comercial.	9
TABELA 2 - Características físico-químicas do herbicida comercial	10
TABELA 3 - Parâmetros utilizados, unidade, limite de detecção e metodologia analítica.	40
TABELA 4 - Controle e periodicidade dos parâmetros aplicados durante os ensaios.	41
TABELA 5 - Controle do pH e dureza total da água de diluição produzida para os ensaios.	46
TABELA 6 - Valores médios dos registros da variável dureza total da água dos testes de toxicidade aguda.	48
TABELA 7 - Valores médios dos registros da variável pH da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida comercial.	49
TABELA 8 - Valores médios dos registros da variável condutividade da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida comercial.	50
TABELA 9 - Valores médios dos registros da variável oxigênio dissolvido da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida comercial.	53
TABELA 10 - Concentração do herbicida comercial, número de animais por concentração, número total de mortes em 24h e 48h após o início do ensaio e a porcentagem total de mortos por concentração de herbicida.	53

TABELA 11 - Valores médios dos registros da variável dureza total da água dos testes de ecotoxicidade aguda com hexazinona. 58

TABELA 12 - Valores médios dos registros da variável dureza total da água dos testes ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron. 59

TABELA 13 - Valores médios dos registros da variável pH da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida hexazinona. 59

TABELA 14 - Valores médios dos registros da variável pH da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron. 60

TABELA 15 - Valores médios dos registros da variável condutividade da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida hexazinona. 61

TABELA 16 - Valores médios dos registros da variável condutividade da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron. 61

TABELA 17 - Valores médios dos registros da variável oxigênio dissolvido da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida hexazinona. 62

TABELA 18 - Valores médios dos registros da variável oxigênio dissolvido da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron. 62

TABELA 19 - Resultados do parâmetro condutividade do ensaio definitivo com herbicida comercial. 74

TABELA 20 - Resultados do parâmetro oxigênio dissolvido do ensaio definitivo com herbicida comercial. 74

TABELA 21 - Resultados do parâmetro de dureza total do ensaio 75

definitivo com herbicida comercial.

TABELA 22 - Resultados do parâmetro pH do ensaio definitivo com herbicida comercial. 75

TABELA 23 - Resultados do parâmetro de condutividade do ensaio definitivo com hexazinona. 76

TABELA 24 - Resultados do parâmetro oxigênio dissolvido do ensaio definitivo com hexazinona. 76

TABELA 25 - Resultados do parâmetro dureza total do ensaio definitivo com hexazinona. 77

TABELA 26 - Resultados do parâmetro pH do ensaio definitivo com hexazinona. 77

TABELA 27 - Resultados do parâmetro condutividade do ensaio com diuron. 78

TABELA 28 - Resultados do parâmetro oxigênio dissolvido do ensaio com diuron. 78

TABELA 29 - Resultados do parâmetro dureza total do ensaio definitivo com diuron. 79

TABELA 30 - Resultados do parâmetro pH do ensaio definitivo com diuron. 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. Consultoria & Comércio
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
- CL₅₀ - Concentração Letal mediana
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
- DAERP - Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto
- DP – Desvio Padrão
- EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ETE - Estação de Tratamento de Esgoto
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
- LIC – Limite Inferior de Controle
- LSC – Limite Superior de Controle
- OD - Oxigênio dissolvido
- SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para defesa
- UNAERP - Universidade de Ribeirão Preto
- UNICA - União da Indústria da Cana-de-açúcar
- USEPA – *United States Enviromental Protection Agency*
- \bar{x} – Média amostral

RESUMO

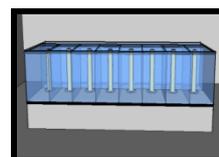
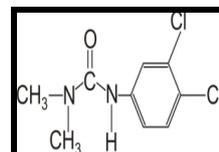
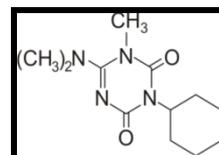
O desenvolvimento tecnológico do homem moderno tem produzido além de todos os seus benefícios e bem estar, efeitos adversos e com intensidades variáveis no ambiente, afetando os demais organismos e também a sua própria qualidade de vida. No Brasil a cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais importantes economicamente. A aplicação de praguicidas é uma importante prática no controle de pragas das culturas, dentre eles, o diuron e a hexazinona destacam-se como herbicidas, necessários no controle do crescimento de ervas daninhas, utilizados amplamente no cultivo da cana-de-açúcar, mas com risco de serem carregados por diversos mecanismos até os corpos d'água. Dentro deste contexto o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade de um herbicida comercial utilizado na cultura canavieira, composto por 46,8% em massa de diuron e 13,2% em massa de hexazinona e 40% em massa de componentes não especificados, através de ensaios de ecotoxicidade aguda para a determinação da CL_{50} , utilizando-se o organismo-teste *Danio rerio* como bioindicador. Os ensaios foram realizados de acordo com as normas da ABNT 15088 (2004) e EPA (2002) para a espécie. A CL_{50} para *Danio rerio* foi determinada em 581,50 mg/L, em concentrações a partir de 50mg/L do herbicida comercial pôde-se observar alterações comportamentais significativas, causando hipoatividade relacionada ao movimento natatório em mais de 50% dos organismos. Os dois componentes principais do herbicida comercial, a hexazinona e o diuron foram analisados separadamente considerando suas percentagens utilizadas no ensaio definitivo com o herbicida comercial para a comparação da toxicidade. O hexazinona nas concentrações estudadas não apresentou mortalidade e alteração comportamental relacionado ao movimento natatório. Devido a baixa solubilidade do diuron 42 mg/L, foram utilizadas concentrações abaixo das obtidas no ensaio definitivo com o herbicida comercial, nestas concentrações o diuron não apresentou mortalidade e alteração comportamental.

Palavras chave: ecotoxicologia, toxicidade aguda, praguicidas, bioindicador

ABSTRACT

The development of modern man has produced beyond to all benefits and welfare, adverse effects and with many intensities in the environment, affecting the other organisms and also their own life quality. In Brazil, sugar cane is one of the most important economic crops. The application of agricultural pesticides is an important practice in the control of crops pests, diuron and hexazinone are herbicides widely used to control the growth of weeds in the sugar cane crop, but at risk of being carried by various mechanisms to the water bodies. In this context presented, this study aimed to evaluate the toxicity of a commercial herbicide used in sugar cane crop, compounded of 46.8% by mass of diuron and 13.2% by mass of hexazinone and 40% by mass of not specified ingredients, through tests of acute ecotoxicity to determine the LC_{50} , using the body-test *Danio rerio* as bioindicator. The tests were performed according to the ABNT 15088 (2004) and EPA (2002) rules for the specie. The LC_{50} for *Danio rerio* was determined in 581.50 mg/L, in concentrations over 50 mg/L of commercial herbicide could be observed significant behavioral changes, causing hypoactivity associated with swimming movements in more than 50% of the organisms. The two main compounds of commercial herbicide, hexazinone and diuron were analyzed apart considering its percentages used in the final test with the commercial herbicide for the toxicity comparison. The studied hexazinone concentrations showed no mortality and behavioral changes related to the swimming movements. By the low solubility of diuron, 42 mg/L, were used concentrations below the obtained in the final test with the commercial herbicide, in these concentrations, the tests showed no mortality and behavioral changes.

Key words: ecotoxicology, acute toxicity, pesticides, bioindicator



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A área plantada hoje de cana-de-açúcar ocupa 7 milhões de hectares, perfazendo um total de 2% de toda a terra agricultável do Brasil, tornando o maior produtor mundial, seguido por países como a Índia, Tailândia e Austrália. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano (UNICA, 2008). A previsão da produção para a atual safra indica que o total dessa matéria prima que será processada pelo setor sucroalcooleiro deverá atingir um montante de 558,72 milhões de toneladas, correspondendo a 11,4% a mais do que os 501,54 milhões de toneladas processadas na safra anterior (CONAB, 2008). O estado de São Paulo é responsável por 56% deste total (AGRIANUAL, 2008).

Ribeirão Preto é a 9ª (nona) maior cidade em população do Estado de São Paulo, com 547.417 habitantes (IBGE, 2008). A atividade econômica do município é intensa e diversificada destacando-se como um dos principais pólos de geração tecnológica do país. Isso se deve à lavoura canavieira, à fertilidade da terra e à diversidade de culturas como: soja, amendoim, laranja, feijão, manga, limão e abóbora. A região é a maior produtora mundial de açúcar e álcool, com 21 usinas que utilizam fertilizantes e agroquímicos (tóxicos e não tóxicos) no cultivo da cana-de-açúcar, dentre eles destacam-se os herbicidas constituídos de uma mistura contendo principalmente diuron e hexazinona.

A Bacia Hidrográfica do rio Pardo abrange 39 municípios que enfrentam problemas de poluição com a intensiva cultura canavieira, agroindústria e lançamento de esgotos sem tratamento de diversas cidades, inclusive de Ribeirão Preto, que, segundo o Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto

(DAERP, 2008), a Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) trata atualmente aproximadamente 90% do esgoto da cidade, no entanto os outros 10% ainda têm seu destino final os corpos d'água.

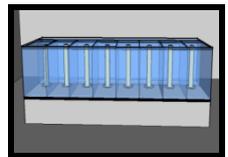
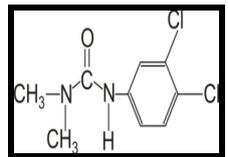
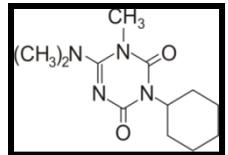
O abastecimento de água para consumo da cidade de Ribeirão Preto, SP, atualmente é realizado pelo Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto (DAERP), sendo que 99,9% da população são abastecidos por água subterrânea proveniente do Aquífero Guarani os outros 0,1% por poços de sistema alternativo.

A crescente demanda de água subterrânea e conseqüente rebaixamento dos níveis estático e dinâmico do aquífero têm preocupado o DAERP. Além disso, há uma preocupação com a possível presença de microcontaminantes que podem afetar a qualidade da água. Segundo o Jornal Gazeta de Ribeirão em uma matéria publicada em 13 de julho de 2008, cita que "Uso do Aquífero Guarani tem limites" e considera a possibilidade do município recorrer ao rio Pardo como manancial para o abastecimento público sendo uma possível solução para o problema de escassez.

A Resolução CONAMA n° 357 de 2005 estabelece padrões de qualidade para as águas superficiais divididos em classes e os compostos diuron e hexazinona não estão citados. Segundo o parágrafo 4° do artigo 8, as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos (BRASIL, 2005).

Portanto a realização de ensaios de ecotoxicidade faz-se necessário em função do uso em grandes quantidades de praguicidas na cultura da cana-de-açúcar, futuramente, junto com outras avaliações tais como, análise de riscos,

poderão dar subsídios aos órgãos reguladores de qualidade das águas para estabelecerem valores máximos permissíveis em futuras revisões dos padrões de qualidade da água.



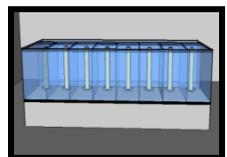
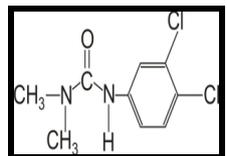
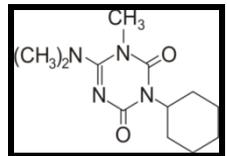
Objetivos

2 OBJETIVOS

O estudo teve por objetivo geral a determinação da toxicidade do herbicida composto por 46,8% em massa de diuron e 13,2% em massa de hexazinona utilizado nas lavouras de cana-de-açúcar, através da utilização de peixes *Danio rerio* como bioindicador.

Para atingir o objetivo geral, foram necessários o desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

- Obtenção da concentração letal mediana a 50% dos peixes (CL₅₀);
- Observação do efeito tóxico aparente no comportamento natatório dos peixes durante a realização do ensaio definitivo sob ação do herbicida comercial;
- Comparação da toxicidade dos compostos hexazinona e diuron separadamente, através da observação da mortalidade e do efeito deletério sobre o comportamento natatório dos peixes.



Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

Segundo Machado Neto (1991), a contaminação do ambiente por praguicidas é quase que em sua totalidade proveniente da sua aplicação direta para o controle de vetores de doenças, parasitas e pragas, a fim de se proteger as culturas e a saúde pública.

Onde quer que se pratique a chamada “agricultura moderna” quantidades significativas de praguicidas serão utilizadas (MACHADO NETO, 1991). Portanto, o uso adequado dos praguicidas se faz necessário com a finalidade de se obter os melhores resultados agronômicos e, ao mesmo tempo, evitar os possíveis problemas de intoxicação, poluição ambiental e contaminação dos alimentos com resíduos não permitidos (ASTOLFI *et al.*, 1984).

3.1 Os herbicidas e a cultura canvieira

Os herbicidas são conhecidos por possuírem características de fitotoxicidade, por essa razão são utilizados no controle de plantas daninhas que se desenvolvem junto às culturas de exploração econômica. Por sua importância, o seu uso na cultura de cana-de-açúcar ocupa o terceiro lugar na economia brasileira, perdendo apenas para as culturas de soja e milho (SINDAG, 2000).

O herbicida comercial estudado é composto pela mistura de 46,8% em massa de diuron, 13,2% em massa de hexazinona, 40% em massa de ingredientes não especificados pelo fabricante e é amplamente utilizado na cultura de cana-de-açúcar.

De acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde, o produto comercial apresenta a classe toxicológica III – Medianamente Tóxico (DuPont, 2003).

Na Figura 1 estão apresentadas as fórmulas estruturais dos compostos diuron e hexazinona.

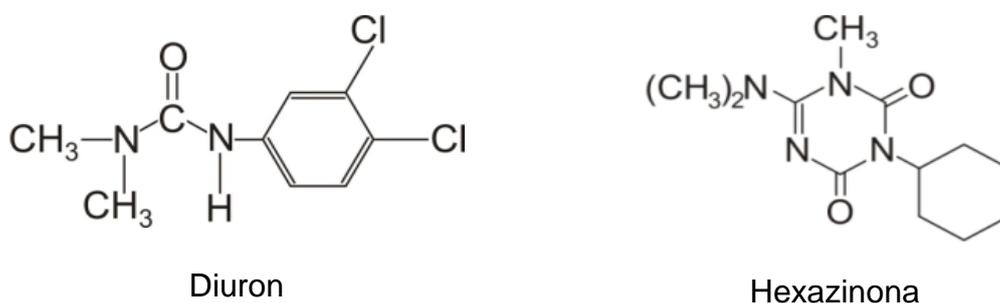


FIGURA 1 – Fórmula estrutural dos herbicidas, principais componentes do produto comercial

Quando aplicado, seja em pré ou pós emergência no controle das plantas daninhas, parte do que foi aplicado pode permanecer no solo, onde estão sujeitos a alguns processos ambientais, como: retenção, transformação e transporte. Inevitavelmente alguns herbicidas podem ser transportados para outros pontos fora da área alvo, podendo ocasionar preocupação quanto ao fato de não saber ao certo quanto pode ter se deslocado para águas superficiais (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

Para se estabelecer a dinâmica do herbicida seja no solo, na água ou nos organismos vivos se faz necessário conhecer suas características físicas e químicas. A ficha técnica dos componentes do herbicida comercial está descrita na Tabela 1.

TABELA 1 - Ficha técnica dos principais componentes do herbicida comercial.

Características	HEXAZINONA	DIURON
Ingrediente ativo	Hexazinona	Diuron
Sinonímia	DPX 3647	DMU;DMU
N° CAS	5123 – 04 – 02	330 – 54 – 1
Nome químico	3-ciclohexil-6(dimetilamino) 1-metil-1,3,5-triazina 2,4(1H,3H) -diona	3-(3,4-diclorofenil)-1,1- dimetiluréia
Fórmula bruta	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	C ₉ H ₁₀ C ₁₂ N ₂ O
Peso molecular	252,32	233,1
Estado físico	sólido cristalino marrom claro de odor característico	sólido cristalino esbranquiçado de odor característico
Ponto de fusão	113,5°C	157°C
Grupo químico	Triazona	Uréia
Classe	Inibidor da fotossíntese	Inibidor da fotossíntese
Pressão de vapor a 25°C	1,9x10 ⁻⁷ mm de Hg (volatilidade baixa)	2,3x10 ⁻⁹ mm de Hg (volatilidade muito baixa)
Solubilidade em água em pH 7 a 25°C	29,8g/L (solubilidade elevada)	42 mg/L (solubilidade baixa)
Coefficiente de partição de octanol-água (log K _{ow})	1,17 (pH 7)	2,84
Constante de ionização ácida (pK _a)	pK _a = 1,1	não se ioniza
Constante da Lei de Henry a 25°C	<1,1x10 ⁻⁷ atm-m ³ /mol	<1,19x10 ⁻¹² atm-m ³ /mol
Coefficiente de partição em relação ao carbono orgânico do solo (K _{oc})	40 mL/g	480 mL/g
Meia-vida no solo sob condições aeróbicas	115 dias	118 dias (102 a 134 dias)
Meia-vida (fotólise na água)	>30 dias	43 dias
Classificação tóxica	Classe III	Classe III
Uso agrícola	Aplicação em pré e pós emergência das plantas infestantes na cultura de cana de açúcar	Aplicação em pré e pós emergência das plantas infestantes na cultura de cana de açúcar
LMR (mg/Kg)	0,1	0,1
Intervalo de segurança	150 dias	150 dias

Fonte : Lavorenti e Lanças (2003).

As características físico-químicas do herbicida comercial estão indicadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Características físico-químicas do herbicida comercial

Propriedades	
Estado físico	Sólido
Forma	Granulado auto-disponível
Cor	Marrom claro
Odor	Característico
pH	9,6
Ponto de fusão	Não determinado
Ponto de fulgor	Produto não inflamável
Densidade	0,714 g/mL
Solubilidade	Dispersível em água

Fonte : Ficha de informações de segurança do produto químico, DuPont (2003).

3.2 Comportamento do herbicida no solo

A contaminação ambiental por agroquímicos pode ocorrer, além da utilização normal, ou aplicação intencional, de maneira não intencional ou indireta (BATISTA, 1988). Desta forma tornam-se importante o conhecimento do comportamento dos herbicidas no meio ambiente, para avaliação do potencial destes produtos em atingirem ou não as águas de superfície e/ou subterrâneas. A Figura 2 mostra um esquema representativo dos fatores envolvidos no estudo de comportamento de uma molécula de herbicida no solo.

Para se conhecer o seu comportamento é necessário estudar os processos de retenção, transformação e transporte, os quais se iniciam

imediatamente após a liberação do herbicida no ambiente (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

Estes processos ocorrem simultaneamente, em intensidades diferentes, com possibilidades de um interferir no outro, e variam de acordo com as propriedades físico-químicas do herbicida, as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, e as condições climáticas durante a interação herbicida-solo (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

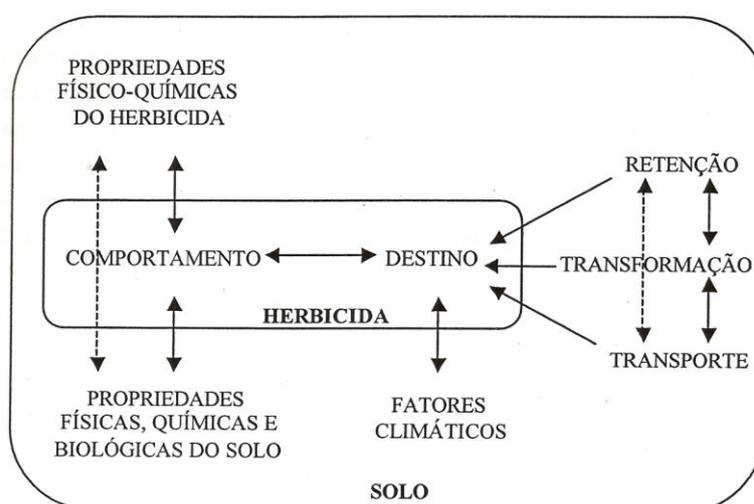


FIGURA 2 - Esquema representativo do comportamento e destino do herbicida no solo (LAVORENTI, 2002).

3.3 A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por herbicidas

O sistema de produção agrícola adotado nos últimos anos tem sido altamente dependente do uso de agroquímicos (praguicidas, fertilizantes e outros insumos) para assegurar a produtividade, expondo os recursos hídricos ao risco de transporte de praguicidas aplicados nas culturas para áreas não alvo e, assim, expondo o ambiente como um todo a risco de contaminações (MENDONÇA e MARINHO, 2005).

A principal maneira como um herbicida pode atingir águas de superfície, além do processo de deriva que pode ocorrer durante a aplicação do produto no campo e próximo aos cursos d'água, é através do escoamento superficial. Trata-se de um movimento do herbicida ao longo da superfície do solo juntamente com o escoamento das águas das chuvas ou pelo vento (conhecido por erosão), fazendo com que o herbicida se desloque, por fluxo de massa, até a superfície das águas dos rios ou lagos que normalmente estão em áreas de menor declividade do terreno (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

Na Figura 3 está apresentado o fluxograma do processo de transporte de um herbicida no solo, os quais podem ser exemplificados pela volatilização, lixiviação e escoamento superficial (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

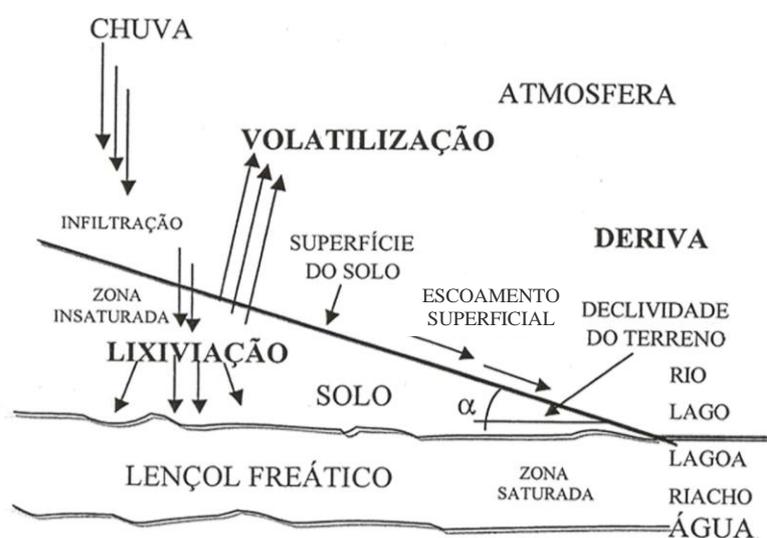


FIGURA 3 - Processos de transporte de herbicida no ambiente (LAVORENTI, 2002).

O escoamento superficial ocorre quando a chegada de água na superfície do solo excede a capacidade de infiltração desta água no perfil do próprio solo. Aplicando os herbicidas em solos saturados de água aumentam as chances de

certa quantidade do herbicida ser transportado para fora do local de aplicação através de escoamento superficial. Neste caso, o escoamento superficial inclui tanto o herbicida dissolvido como também aquelas moléculas que estejam adsorvidas às partículas coloidais dos solos, sujeitas ao arraste pelas águas das chuvas. A profundidade da superfície do solo efetiva que interage com o escoamento superficial é de 2 a 10 mm (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

A concentração do herbicida e a distância que ele é transportado são influenciados por fatores tais como: taxa de aplicação, propriedades físico-químicas do herbicida e do solo, o tempo antes que ocorra a erosão seguindo a aplicação, quantidade de precipitação versus taxa de infiltração, a topografia do terreno e o tipo de cobertura vegetal (LEONARD, 1990).

Segundo Lavorenti e Lanças (2003), a deposição de herbicidas é o resultado final do transporte de massa superficial, os quais são influenciados pela velocidade da força carregadora (água ou vento) e o tamanho da partícula no qual o pesticida pode estar sorvido. A erosão do fluxo de água sobre a superfície do solo é muito mais significativa que a erosão pelo vento.

O intervalo de tempo entre a aplicação do produto e a primeira chuva, suficiente para provocar o escoamento superficial tem um efeito significativo na quantidade de produto que é perdido para águas de superfície. Isto ocorre, principalmente, devido ao fato do produto não ter tido tempo suficiente para ser adsorvido às partículas coloidais do solo ou ainda, pode ser que ele ficou adsorvido apenas nas partículas que estão na superfície do solo e que também ficam sujeitas ao arraste pela água da chuva (LAVORENTI e LANÇAS, 2003).

Considerando que a região de Ribeirão Preto se encontra sobre a região de recarga do Aquífero Guarani, e por se tratar de uma região de intensa atividade agroindustrial canavieira, faz se necessário o monitoramento das águas superficiais e subterrâneas, que podem receber por escoamento superficial e ou por lixiviação os herbicidas utilizados na cultura canavieira, através de análises ecotoxicológicas, para avaliar os efeitos das atividades antrópicas sobre as águas superficiais.

Em 2007, a EMBRAPA realizou um estudo para avaliar o potencial de transporte e lixiviação de vários agroquímicos. Foram consideradas as características físico-químicas de 236 princípios ativos, dentre eles o diuron e a hexazinona, que demonstraram uma capacidade de contaminarem as águas subterrâneas e de superfície (PESSOA *et al.*, 2007).

Segundo Pessoa *et al.* (2007) o hexazinona e o diuron possuem, associados ao sedimento, um médio potencial de transporte, no entanto, quando dissolvidos em água tanto o hexazinona quanto o diuron apresentam alto potencial de transporte. O hexazinona provavelmente se lixiviaria podendo chegar às águas subterrâneas sob processo de lixiviação, já o diuron se manteria na faixa de transição.

3.4 Bioacumulação e biomagnificação

Segundo Voutsas *et al.* (2002) para que ocorram os processos de bioacumulação e biomagnificação, a substância deve ser lipossolúvel, uma propriedade físico-química relacionada ao grau de solubilidade em gorduras que é conhecido como coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) de se dissolver

preferencialmente em gorduras podendo assim fixar-se nos tecidos dos seres vivos e ali permanecer quando persistentes.

O número de átomos de cloro das substâncias contaminantes também as faz capazes de atravessar com facilidade a estrutura fosfolipídica das membranas biológicas e se acumularem no tecido adiposo. O fato destes compostos também terem uma solubilidade relativa na água é que os tornam disponíveis para a bioacumulação nos seres vivos (VOUTSAS *et al.*, 2002).

Quando os organismos encontram-se expostos no seu ambiente natural a uma concentração de poluentes insuficiente para causar a mortalidade, mesmo que os efeitos em curto prazo não sejam sempre visíveis, a longo prazo, de acordo com Baganz (2005) acabam por acarretar alterações comportamentais, sejam elas respiratórias, nutricionais e/ ou reprodutivas.

O aumento na concentração de uma determinada substância a cada nível da cadeia alimentar é conhecida como biomagnificação. Esse fenômeno ocorre porque a fonte de alimento para organismos de um nível superior na cadeia alimentar é progressivamente mais concentrada, aumentando assim a bioacumulação no topo da cadeia alimentar (VOUTSAS *et al.*, 2002).

A bioacumulação é o processo no qual os organismos, inclusive os humanos, podem concentrar substâncias mais rapidamente do que seus corpos podem eliminá-los. Como muitos contaminantes ambientais, podem sofrer bioacumulação, se por um determinado período um organismo não ingerir o contaminante, a taxa desta substância em seu organismo declinará. Entretanto, se o organismo ingerir o contaminante continuamente, a sua concentração pode atingir níveis tóxicos (VOUTSAS *et al.*, 2002).

3.5 A ecotoxicologia aquática como ferramenta no monitoramento ambiental.

O monitoramento da água citado na Resolução CONAMA nº 357, artigo 2º, inciso XXV, está caracterizado como a medição ou verificação de padrões de qualidade e quantidade de água e este monitoramento pode ser realizado continuamente ou periodicamente. O parágrafo 3º do artigo 8 prevê que a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas (BRASIL, 2005).

Segundo Lobo e Callegaro (2000), o termo geral “monitoramento da qualidade da água” inclui tanto o monitoramento físico e químico quanto o monitoramento biológico. Desses dois enfoques, o monitoramento biológico destaca-se basicamente em função de dois importantes argumentos; primeiro, os organismos apresentam uma resposta integrada ao seu ambiente, e, segundo, se o que interessa é manter comunidades biológicas saudáveis é muito mais apropriado monitorar as comunidades aquáticas que somente as variáveis físicas e químicas.

Segundo Knie e Lopes (2004), na ecotoxicologia o uso de reativos biológicos permite a detecção de substâncias a concentrações bem abaixo dos limites de detecção por métodos de análises químicas. Além disto, a matéria viva responde de forma integrada a todos os fatores perturbadores, o que inclui efeitos produzidos por substâncias novas na água, formadas através de interações.

Esta resposta, via de regra, se subtrai da análise química. Assim, os bioensaios permitem, geralmente, uma avaliação bastante segura do potencial

tóxico de substâncias ou de meios contaminados, permitindo também deduções indiretas do seu risco para o meio ambiente (KNIE e LOPES, 2004).

Desta forma, testes toxicológicos vêm a ser ótimas ferramentas para auxiliar na tomada de decisões visando à preservação da biota aquática.

Os testes de toxicidade aquática são ferramentas utilizadas para detectar e avaliar os efeitos toxicológicos potenciais de produtos químicos nos organismos aquáticos.

Por meio de bioensaios, organismos aquáticos respondem integralmente a presença ou ao efeito de uma substância tóxica, sozinha ou combinada com outras. Assim, esses testes fornecem uma base de dados que pode ser usada para avaliar o risco associado com a situação no qual, o agente químico, o organismo e as condições de exposição são definidos (RAND e PETROCELLI, 1985).

A possibilidade de se medir a poluição e estabelecer padrões ambientais permitem que sejam definidos com clareza os direitos e as responsabilidades do poluidor e do fiscal (os órgãos públicos), assim como da população. Abre também campo para estudos científicos que definam a capacidade de assimilação do meio, estabelecendo, dessa forma, os padrões ambientais. Estes não são estáticos, dados de uma vez por todas, mas estão em contínua evolução, sendo fruto de pesquisas que tendem a aprofundar o conhecimento dos processos naturais, dos efeitos dos poluentes sobre o homem e os ecossistemas e dos efeitos sinérgicos e cumulativos de diferentes poluentes (SÁNCHEZ, 2006).

3.5.1 Biomonitoramento

O biomonitoramento pode ser dividido em duas partes: passivo ou bioavaliações, onde são analisadas comunidades biológicas com controles experimentais rígidos; e o ativo ou bioensaios, que são ensaios em laboratório que requerem rigorosos procedimentos experimentais que avaliam a toxicidade das substâncias aos organismos (HENDRICKS *et al.*, 1989).

Vários organismos podem ser utilizados como detectores de problemas causados ao meio ambiente, sendo denominados bioindicadores, eles podem ser definidos como organismos selecionados com os quais se podem amostrar, testar e responder às questões ambientais.

Na realização do biomonitoramento, uma espécie ou grupo de organismos somente é utilizado quando apresenta algumas características que as tornem "ideais", dentre as quais, ampla distribuição, abundância numérica e facilidade de reprodução em cativeiro (KNIE e LOPES, 2004).

3.6 Descrição do organismo *Danio rerio*

O *Danio rerio* peixe de águas tropicais vulgarmente conhecido como paulistinha ou zebrafish, é um teleósteo da ordem dos Cypriniformes e família Cyprinidae (STORER *et al.*, 2000). Esta espécie de peixe ovíparo de hábitos alimentares onívoros tem em sua dieta, pequenos vermes, larvas de insetos, microcrustáceos e algas, na cadeia alimentar aquática atua como consumidor secundário. Originário da Ásia habita rios, riachos e canais de águas lentas a estagnadas de países como Índia oriental, Bangladesh, Nepal e Paquistão.

O peixe *Danio rerio* possui de 31 a 32 vértebras, pode chegar até cinco centímetros de comprimento, tem dois pares de barbilhões localizados na região da cabeça, coloração geral prateada, com cinco faixas longitudinais azul escuras que se iniciam no opérculo chegando até a nadadeira caudal.

Possui dimorfismo sexual, sendo o macho levemente dourado nas regiões, abdominal e das nadadeiras peitorais e caudal, o corpo mais alongado e delgado que a fêmea e sua listra abdômenal é completa. A fêmea é prateada, mais robusta e ligeiramente maior que o macho, seu abdômen geralmente encontra-se inchado devido ao desenvolvimento de ovos e sua listra abdominal é incompleta. Na Figura 4 está apresentado o organismo teste *Danio rerio* macho e fêmea.



FIGURA 4 – Organismo teste peixe *Danio rerio* macho ♂ e fêmea ♀.

A maturidade sexual é atingida do quarto ao sexto mês de vida, tipicamente a desova ocorre nas primeiras horas do amanhecer. Os ovos são semi-adesivos, relativamente grandes e são deixados em águas abertas e a partir daí são fecundados pelo macho. Em condições naturais a desova ocorre em intervalos de 5 dias a algumas semanas e a cada desova podem ser liberados de 21 a 60 ovos, a eclosão dos ovos tem início a partir de 20 a 48 horas da

fecundação, após a eclosão dos ovos, as larvas se alimentam do saco vitelínico por um período de até 72 horas.

Sendo um organismo de grande adaptabilidade, pode sobreviver em diferentes condições ambientais, o *Danio rerio* é de fácil reprodução em ambientes artificiais e devido ao seu grande sucesso entre os aquaristas do mundo todo é facilmente encontrado em lojas de peixes ornamentais, facilitando a sua obtenção.

3.7 Comportamento dos organismos sob o efeito de agentes tóxicos

Dentre as diferentes respostas comportamentais, a atividade natatória é importante, pois é um indicador que integra o status interno do animal. O uso da locomoção na ecotoxicologia comportamental é baseado no fato de que ela é objetiva e quantitativa e pode ser medida efetivamente em várias espécies de peixe para caracterizar as consequências de exposições subletais (LITTLE *et al.*, 1993).

Segundo Schreck *et al.* (1997) quando um animal é exposto a uma situação de estresse, sua primeira resposta de defesa na maioria das vezes, é o comportamento de fuga, na tentativa diminuir a probabilidade de morte, ou então, pode ocorrer um comportamento de economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica. Esses processos fisiológicos podem ser de osmo e ionregulação, de indução de proteínas de estresse ou de aumento de *turnover* de energia (TRIEBSKORN *et al.*, 1997).

De acordo com Baganz (2005) a redução da atividade metabólica pode ser uma estratégia eficaz se a exposição ao agente agressor tiver natureza

temporária e a energia economizada para a mitigação do processo tóxico for suficiente para suprir esse período. No entanto, uma atividade reduzida por um longo período de exposição pode causar danos ao organismo ocasionando redução do hábito alimentar e de cópula, podendo levar a um colapso metabólico no organismo.

Como a natação é um aspecto central para a biologia dos peixes, sua redução causada pela exposição a agentes tóxicos, pode implicar na diminuição das interações interespecíficas e intraespecíficas (BAGANZ, 2005).

3.8 Ensaios ecotoxicológicos

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) vem desde 1992 realizando ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos, para determinar os efeitos tóxicos causados por um ou mais agentes químicos em amostras de águas, sendo tais efeitos detectados por respostas fisiológicas de organismos aquáticos.

Para o monitoramento da qualidade das águas a CETESB avalia os efeitos agudos e crônicos, tanto para amostras quanto para sedimentos utilizando-se para isso organismos aquáticos como: a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e o anfípodo *Hyalella azteca*.

Muitos estudos relacionados à ecotoxicidade vêm sendo realizados, utilizando-se uma grande variedade de organismos como bioindicadores, a fim de obter uma resposta mais ampla dos efeitos tóxicos de várias substâncias.

Em um estudo realizado por Nakagome *et al.* (2007), foram realizados ensaios de toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em

lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. Os resultados obtidos indicaram que os herbicidas oxifluorfem, oxadiazona e clomazona e os inseticidas lambdacialotrina, betaciflutrina, carbofurano e fipronil apresentam maior potencial de risco de impacto ecológico sobre o bioindicador *Danio rerio*. Os herbicidas metsulfurom, pirazossulfuron, bispiribaque, bentazona e quincloraque revelaram risco mínimo a leve de impacto sobre peixes da espécie *Danio rerio*.

Segundo uma pesquisa de Henares *et al.* (2007) sobre os efeitos histopatológicos do ditaque na brânquia e no fígado do piaçu (*Leporinus macrocephalus*), demonstrou-se que o ditaque é pouco tóxico para a espécie, sendo possível considerá-lo como produto adequado para ser utilizado no controle de macrófitas aquáticas. As alterações histopatológicas que ocorreram na brânquia e no fígado dos peixes expostos ao ditaque são reversíveis, indicando que o ditaque não apresentou efeitos severos nas concentrações subletais utilizadas durante os testes de toxicidade aguda.

De acordo com Ferrão Filho *et al.* (2007) a toxicidade de concentrações subletais de cianobactérias da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, em *Daphnia pulex* e *Danio rerio*, podem ser avaliadas através de processamento automático de imagem. Os resultados demonstraram que tanto as cianobactérias de culturas laboratoriais, quanto amostras de água do reservatório alteraram a atividade natatória de *Danio rerio*, elevando os valores de distância percorrida e velocidade média. Para *Daphnia pulex*, as células de cianobactérias tiveram o efeito contrário, diminuindo significativamente os parâmetros da atividade natatória, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação das saxitoxinas.

Em um trabalho realizado por Arauco *et al.* (2005) foi possível se avaliar o efeito tóxico do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*

(*Daphnia similis*, *Daphnia magna* e *Daphnia laevis*) na presença ou ausência de sedimento. Os valores da concentração efetiva mediana (CE_{50-48h}) em um ensaio de toxicidade aguda para *Daphnia magna* encontrados foram de 0,3496 mg de sulfato de cobre por litro com sedimento e 0,0447 mg sem sedimento, para *Daphnia similis* 0,2859 mg com sedimento e 0,0426 mg sem sedimento e para *Daphnia laevis* 0,1437 mg com sedimento e 0,1094 mg sem sedimento. A CE_{50-48h} estimada para a *Daphnia magna* foi de 299,70 ng de triclorfon por litro com sedimento e 0,70 ng sem sedimento, para *Daphnia similis* 381,62 ng com sedimento e 0,52 ng sem sedimento e para *D. laevis* 282,72 ng com sedimento e 0,92 ng sem sedimento. Os resultados obtidos puderam demonstrar que o triclorfon é mais tóxico que o sulfato de cobre para as três espécies estudadas, sendo que a presença de sedimento diminuiu a toxicidade de ambos, para as três espécies de *Daphnia*. Como não ocorreu diferença de sensibilidade ao triclorfon entre as três espécies na ausência de sedimento, a *Daphnia laevis* (espécie nativa do Brasil) pode ser utilizada como organismo teste na avaliação da toxicidade aguda e crônica de inseticidas organofosforados e a base de cobre.

Em um estudo realizado no Instituto de Ciências do mar em Barcelona na Espanha, por Saiz *et al.* (2009), avaliou-se o efeito letal e sub-letal através da concentração letal mediana (CL_{50}) do naftaleno sob os estágios de náuplio e adulto do ciclo de vida do copépodo marinho *Oithona davisae*. Durante o estudo os organismos foram expostos a várias concentrações de naftaleno por um período de 24 horas. Ao final dos ensaios os náuplios do copépodo demonstraram maior sensibilidade ao naftaleno e a concentração letal mediana obtida foi de 4422 $\mu\text{g/L}$, já os adultos não demonstraram nenhuma mortalidade nas concentrações estudadas, os náuplios demonstraram ser sensíveis a toxinas xenobióticas.

Shelley *et al.* (2009) realizou uma pesquisa no Canadá, onde se observou o efeito de três praguicidas (clorotalonil, cipermetrina e pentaclorofenol) e o seu efeito sobre o sistema imune de juvenis de peixes truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Após 28 dias de exposição aos praguicidas, as trutas sob efeito de 1 e 2 µg/L pentaclorofenol apresentaram aumento da atividade fagocitária dos linfócitos, já ao clorotalonil e a cipermetrina não causaram alterações na atividade fagocitária. Depois de 14 dias após o período de exposição das trutas ao pentaclorofenol, não se observou recuperação ao efeito da exposição ao pesticida, como evidência deste efeito pode ser observado o aumento contínuo da taxa respiratória e da porcentagem de células fagocitárias mesmo nas menores concentrações de 100 e 200 ng/L do pesticida, o que sugeriu um prolongado impacto sobre o sistema imune.

Os ensaios de toxicologia aquática vêm demonstrando ser uma importante ferramenta para avaliação da sensibilidade de organismos a fatores ambientais desfavoráveis como efluentes tóxicos, poluentes físicos, químicos e medicamentos. Podem ser realizados com diversas finalidades, como a regulamentação dos limites aceitáveis de contaminação ambiental, homologação e registro de produtos químicos comerciais utilizados no meio ambiente e teste de medicamentos, que permitem avaliar a eficácia e também os efeitos deletérios dos compostos químicos utilizados nos tratamentos de doenças de organismos aquáticos (LOMBARDI, 2004).

3.9 Carta-controle

Segundo Opazo (2008) quando é realizado um experimento, as características deste experimento irão apresentar uma variabilidade inevitável,

devido à variação sofrida pelos fatores que compõem o processo analítico. Estas variações podem resultar de diferença entre equipamentos, mudanças nas condições ambientais, variação entre lotes de organismos teste, entre outras. Apesar de um esforço considerável ser especificamente direcionado para controlar a variabilidade em cada um desses fatores, existirá sempre a variabilidade no resultado final de um experimento. Portanto, é importante que esta variabilidade também seja controlada, para que possam ser realizados ensaios de boa qualidade. É importante verificar a estabilidade do processo de experimentação, já que processos instáveis provavelmente irão resultar em resultados incompletos, erro nas análises e baixa qualidade dos resultados.

O procedimento de controle estatístico é um elemento importante em um sistema completo de controle de qualidade (CEMBROWSKI *et al.*, 1980)

Em 1931 Shewardt, um estatístico americano apresentou os chamados Gráficos de Controle ou Cartas de Controle, como um método para a análise e ajuste da variação de um processo em função do tempo. Descreviam o processo considerando duas características fundamentais: centralização, determinada pela média; dispersão, verificada pelo desvio-padrão ou amplitude.

3.9.1 Análise dos Gráficos de Controle

Segundo Opazo (2008) existem dois tipos de causas para a variação na qualidade dos produtos resultante de um processo:

- Causas Comuns ou Aleatórias onde a variação provocada por causas comuns, também conhecidas como variabilidade natural do processo, é inerente ao processo considerado e estará presente mesmo que todas as operações sejam executadas empregando métodos padronizados.

Quando apenas as causas comuns estão atuando em um processo, a quantidade de variabilidade se mantém em uma faixa estável, conhecida como faixa característica do processo. Neste caso, dizemos que o processo está sob controle estatístico, apresentando um comportamento estável e previsível.

- Causas Especiais ou Fatores Particulares de Processo que surgem esporadicamente, devido a uma situação particular que faz com que o processo se comporte de um modo completamente diferente do usual, o que pode resultar em um deslocamento de seu nível de qualidade. Quando um processo está operando sob a atuação de causas especiais de variação dizemos que ele está fora de controle estatístico e neste caso sua variabilidade geralmente é bem maior do que a variabilidade natural. As causas especiais de variação devem ser, de modo geral, localizadas e eliminadas, e, além disto, devem ser adotadas medidas para evitar sua reincidência. Alguns exemplos de causas especiais de variação podem ser causados por imperícia do analista, a utilização de um novo lote de organismos e o descumprimento de padrões operacionais.

Os gráficos de controle são instrumentos para o monitoramento da variabilidade e para a avaliação da estabilidade de um processo. Um gráfico de controle permite a distinção entre os dois tipos de causa de variação, ou seja, nos informa se o processo está ou não sob controle estatístico. É importante destacar que um gráfico de controle não “descobre” quais são as causas especiais de variação que estão atuando em um processo fora de controle estatístico, mas ele

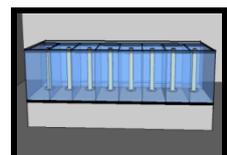
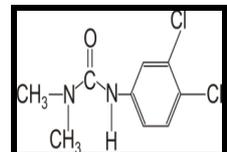
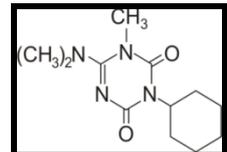
processa e dispõe informações que podem ser utilizadas na identificação destas causas (OPAZO, 2008).

Um gráfico de controle consiste de:

Uma linha média (LM) que representa o valor médio da característica da qualidade correspondente à situação do processo sob controle, isto é, sob a atuação de apenas causas de variação aleatórias;

Um par de limites de controle, representados um abaixo (limite inferior de controle – LIC) e outro acima (limite superior de controle – LSC) da linha média. Os limites de controles são determinados de forma que, se o processo está sob controle, praticamente todos os pontos traçados no gráfico estarão entre as linhas, formando uma nuvem aleatória de pontos distribuídos em torno da linha média. Os valores da característica da qualidade traçada no gráfico indicam então a situação do processo no que diz respeito ao controle estatístico (OPAZO, 2008).

Em qualquer outra situação devemos considerar que o processo esta fora de controle estatístico.



Metodologia

4 METODOLOGIA

Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados no Laboratório de Recursos Hídricos da UNAERP, a metodologia aplicada foi estabelecida conforme recomendações da ABNT 15088 (2004) e USEPA (2002). Na Figura 5 está representado um fluxograma com resumo da metodologia que foi aplicada no decorrer dos ensaios com o organismo teste *Danio rerio* em presença dos herbicidas diuron e hexazinona.

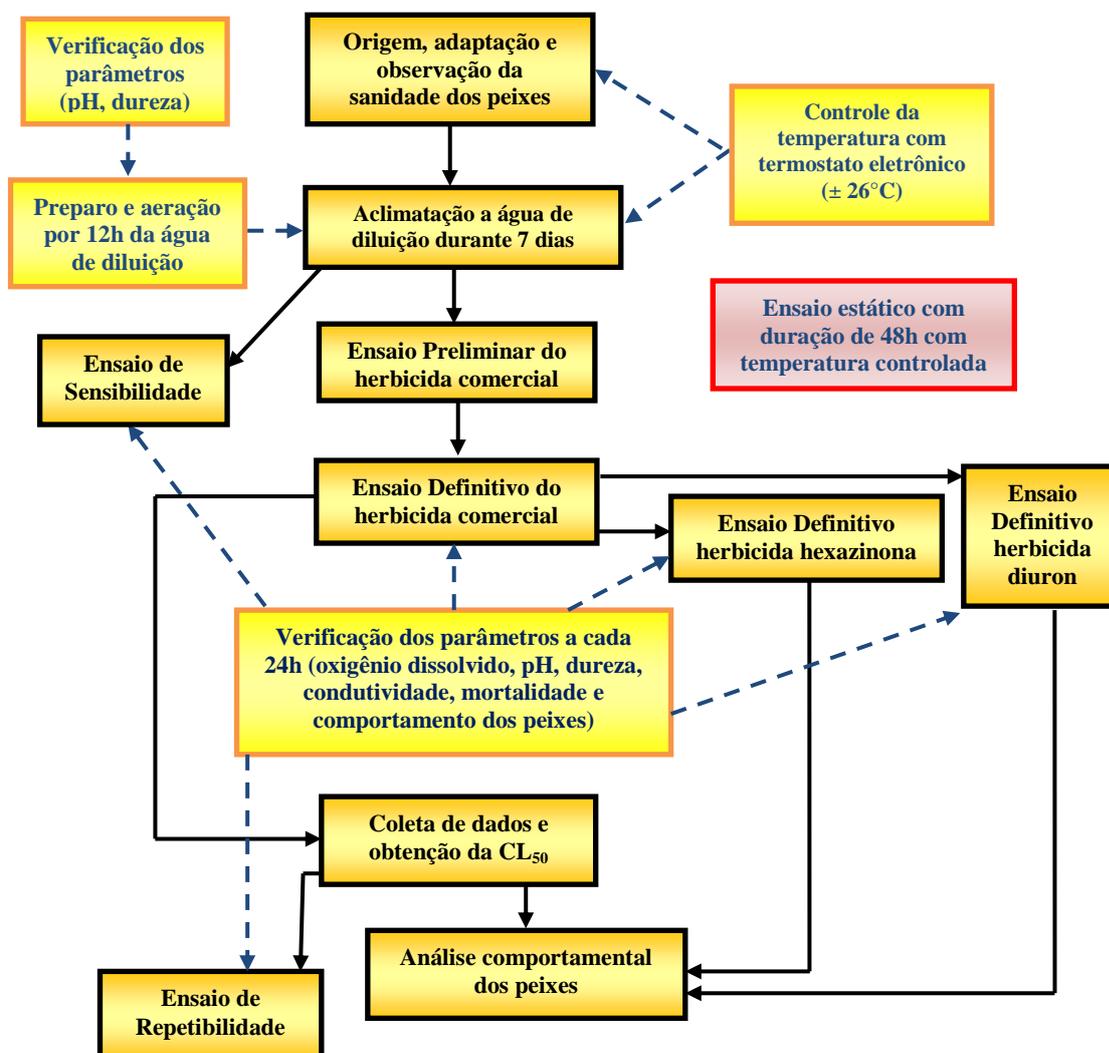


FIGURA 5 – Fluxograma com o resumo da metodologia.

4.1 Origem dos peixes

Os paulistinhas (*Danio rerio*) foram adquiridos junto a uma piscicultura de peixes ornamentais, localizada na cidade de Ribeirão Preto interior do estado de São Paulo. Os peixes foram cultivados em tanques escavados no solo conforme apresentado na Figura 6, onde ocorria troca parcial, com água de uma nascente da propriedade.



FIGURA 6 - Tanques de cultivo dos peixes.

4.2 Controle da sanidade, aclimação e soltura dos peixes

Após serem adquiridos, os peixes foram levados em sacos plásticos, próprios para o transporte de peixes ornamentais, até o local dos ensaios. Anterior a chegada dos organismos teste, foi preparada uma caixa d'água mostrada na Figura 7, com 200 litros de água da rede de abastecimento que foi desclorada com adição de tiosulfato de sódio.

Para o controle da temperatura foi utilizado um termostato eletrônico de 200W (ViaAcqua) mostrado na Figura 8, instalado na caixa para o controle da

temperatura estável, em torno de 26°C e um sistema de filtragem mecânica e biológica.

Utilizou-se uma bomba de 500 L/h com pré-filtro (ATMAN) que transportava a água através de uma mangueira por um tubo de PVC contendo anéis de cerâmica para a fixação das bactérias nitrificantes, responsáveis pela degradação da amônia produzida nas excretas dos peixes.

Uma tela foi colocada sobre a caixa para evitar que os peixes saltassem para fora.



FIGURA 7 - Caixa de aclimação e controle da sanidade dos peixes.



FIGURA 8 – Termostato eletrônico de 200 W ViaAcqua.

Conforme apresentado na Figura 9 os peixes *Danio rerio* foram colocados sobre a água da caixa ainda dentro do saco plástico (A), para a que as temperaturas das águas se iguallassem, logo após foram acrescentadas aos poucos água da caixa dentro do saco para atingir o equilíbrio no valor de pH (B), antes da sua soltura foram verificados se haviam manchas nos peixes, deformidades, parasitas externos como o ictíó. Após a verificação visual da

sanidade, estes foram soltos com a ajuda de uma rede de nylon e água do saco foi descartada (C).

Os peixes permaneceram nesta caixa por um período de 10 dias, o fundo era sifonado e a água era trocada em torno de 30% semanalmente.



FIGURA 9 - Sequência do procedimento e equalização da temperatura da água do saco com a da caixa (A); equiparação do pH (B) e soltura dos peixes utilizando rede de nylon (C).

4.2.1 Preparo da água de diluição

A água de diluição foi preparada a partir da dissolução de sais em água deionizada conforme ABNT 15088 (2004). Para o preparo da água de diluição foram produzidos duas soluções estoque, a solução 1 era composta de 3000 mg sulfato de cálcio diidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) avolumado para 2000 mL de água deionizada, foi colocado sob agitação e aquecimento até que fosse totalmente

dissolvido, a solução 2 era composta por 20 mg de cloreto de potássio (KCl), 4800 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 6100 mg de sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_{4.7\text{H}_2\text{O}}$) dissolvidos e avolumados a 1000 mL de água desionizada.

A partir destas duas soluções estoque, era produzida a água de diluição, onde 2 litros da solução 1 mais 1 litro da solução 2 eram avolumados a 100 litros de água destilada e desclorada com tiosulfato, a dureza e pH eram sempre observados e anotados, quando necessário o pH era corrigido com uma solução de HCl 2N, sendo mantido dentro do estabelecido pela ABNT 15088 (2004), onde o pH deveria permanecer entre 7,0 e 7,6 e a dureza total em torno 40 e 48 mg de CaCO_3/L .

Logo após o preparo da água dentro do recipiente de 100 litros, foi colocada para a aeração durante 24 horas com a ajuda de um compressor de ar com duas saídas (Regent 4800) e duas mangueiras com pedras porosas, representados na Figura 10, saturando de oxigênio, estabilizando e dissolvendo totalmente os sais.



FIGURA 10 – Recipiente sob 24 horas de aeração para saturação de oxigênio,

estabilização e dissolução total dos sais.

4.3 Aclimação a água de diluição

Após o período de observação na caixa d'água, os peixes foram aclimatados de forma similar a quando chegaram ao laboratório depois de serem adquiridos no criadouro, sendo aclimatados a 100% de água de diluição. Para isto foi feito um pequeno teste de viabilidade anterior a aclimação dos peixes, onde foram colocados 10 peixes e aclimatamos a 100% de água de diluição durante 7 dias, o comportamento e a mortalidade foram observados.

O recipiente de aclimação conforme na Figura 11 era composto por um aquário de 200 litros, a relação de gramas de peixes por litro de água foi mantida dentro do limite estabelecido pela norma ABNT 15088 (2004), que estabelece um limite máximo de 1 grama do peixe paulistinha por litro de água, a relação estimada encontrada foi de 0,225 g/L. Para o controle da temperatura foi utilizado um termostato eletrônico de 300 W e para a manutenção da qualidade da água foi utilizado um sistema de filtragem biológica como o da Figura 12, composto por um filtro externo com bomba submersa de 1500 L/h (ATMAN AT1215), preenchido com anéis de cerâmica para a fixação de bactérias nitrificantes.

A iluminação permaneceu acesa em torno de 14 horas diárias, período de funcionamento do laboratório de pesquisa. A temperatura era mantida em torno de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, a amônia era verificada pelo menos duas vezes por semana, através de testes de amônia tóxica de uso doméstico da marca Alcon[®].

Tanto os peixes na caixa, quanto no aquário eram alimentados pelo menos uma vez ao dia com ração Tetra[®] color tropical flakes.



FIGURA 11 – Aquário de aclimação dos peixes.



FIGURA 12 - Sistema de filtragem biológica composto por uma bomba de 1500 L/h e anéis de cerâmica utilizada para a filtragem do aquário.

4.4 Recipiente ensaio

O recipiente utilizado no ensaio era composto por 8 compartimentos anteriores de dimensões 15 centímetros de comprimento por 25 centímetros de largura e 20 centímetros de altura, de vidro, independentes e com tampa conforme a Figura 13 e um compartimento único posterior de 120 centímetros de comprimento, 10 centímetros de largura e 20 centímetros de altura (Figura 14).

As divisórias do recipiente ensaio foram coladas por silicone sem antifúngico.

Os ensaios ocorreram nos 8 compartimentos anteriores, enquanto que o compartimento posterior era responsável pelo controle da temperatura, através da dispersão do calor para os compartimentos anteriores, utilizando-se de um termostato de 100 W (ViaAcqua).

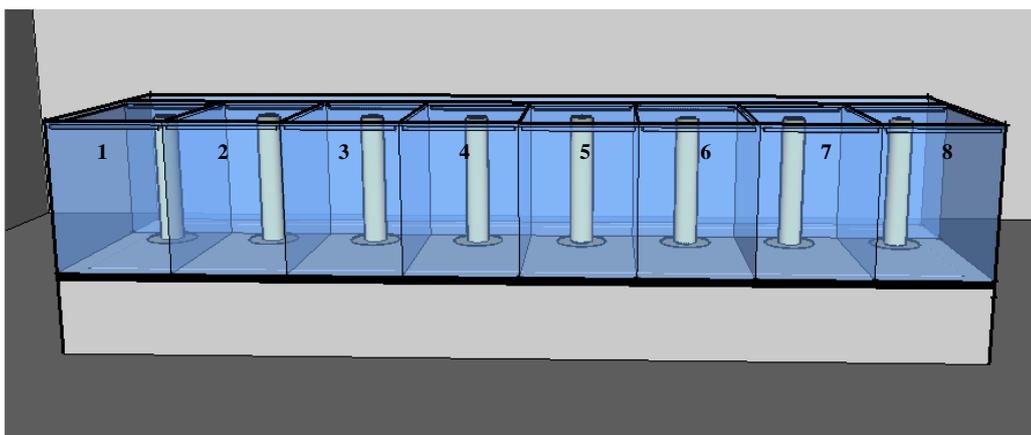


FIGURA 13 – Vista frontal do recipiente ensaio com os 8 compartimentos anteriores.

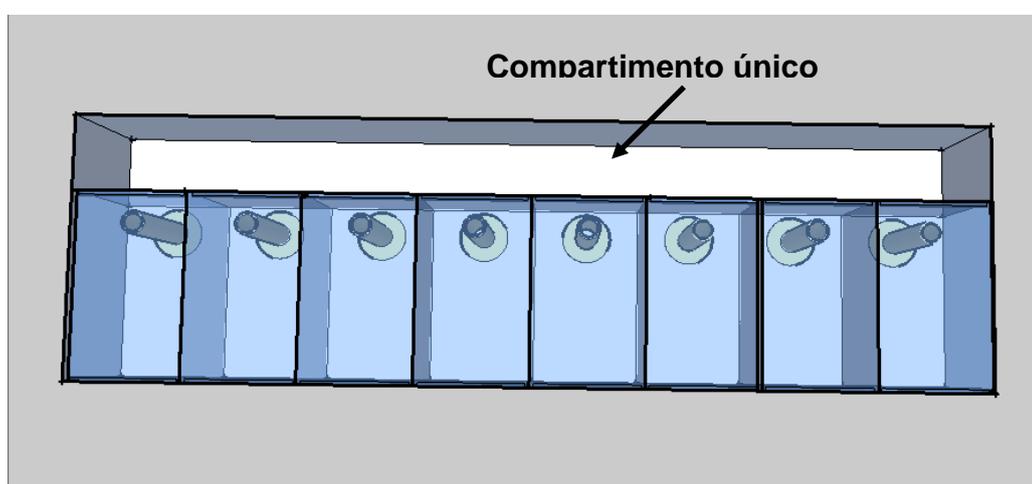


FIGURA 14 – Vista em planta do recipiente ensaio com seu compartimento único posterior.

4.5 Ensaio preliminar com o herbicida comercial

Os ensaios preliminares de toxicidade aguda, com duração de 48 horas, foram realizados com o intuito de se estabelecer os limites de concentrações a ser analisada no ensaio definitivo.

Para a primeira bateria de ensaios preliminares foram utilizadas as concentrações 20, 30, 50, 60, 70, 80, 100 mg/L do produto comercial, mais o controle somente com água de diluição.

Para a produção das soluções de água contaminada, utilizaram-se diferentes massas do herbicida comercial que foram pesadas e dissolvidas para 3 litros dentro do recipiente ensaio, utilizando-se para isso, água de diluição previamente preparada e aerada durante 24 horas antes do início do ensaio e dentro das especificações de dureza total e pH estabelecidas pela ABNT 15088.

Em cada concentração de água contaminada com o herbicida comercial foram colocados 5 peixes, inclusive no controle, todos os peixes ficaram sem alimentação 24 horas antes do início do ensaio como recomenda a ABNT 15088.

Os parâmetros pH, dureza total, condutividade, oxigênio dissolvido e mortalidade dos peixes estudados eram observados inicialmente e depois a cada 24 horas até o final do ensaio.

Na segunda bateria de ensaios utilizaram-se as concentrações 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 mg/L do herbicida mais o controle.

Com base nos resultados anteriores foram utilizadas as concentrações de 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/L para a última bateria de testes. A partir destas três baterias de ensaios preliminares estabeleceu-se o intervalo entre a maior concentração a qual não se observou mortalidade e a menor concentração que causou 100% de mortalidade.

4.6 Ensaio definitivo com o herbicida comercial

O ensaio definitivo foi realizado em três etapas, assim como no ensaio preliminar, com duração de 48 horas, só que em duplicatas e utilizando-se 10 peixes por recipiente.

Na primeira bateria de ensaios foram utilizadas as concentrações de 900, 850 e 800 mg/L de herbicida comercial mais o controle. As pesagens das massas

do herbicida comercial foram realizadas em uma balança de precisão de 4 casas decimais, logo após, foi dissolvido e avolumado para 3 litros em água de diluição previamente preparada, e com seus parâmetros de pH e dureza verificados para controle, os peixes ficaram sem alimentação 24 horas antes do início do ensaio.

Anterior a colocação dos organismos teste nos compartimentos, foram coletadas amostras para posterior análise dos parâmetros de controle.

Para aferição do pH utilizou-se peagâmetro da marca Orion, o oxigênio dissolvido foi verificado através do equipamento oxímetro Digmed DM-4, a condutividade foi avaliada utilizando-se de um condutivímetro da marca Marconi, para a dureza total foi utilizado o método titrimétrico com EDTA, a temperatura e mortalidade no recipiente ensaio também foram observadas, estes parâmetros eram verificados inicialmente e a cada 24 horas até o término dos testes.

Os peixes foram capturados em uma rede aleatoriamente e foram sendo colocados de dez em dez nos recipientes ensaio.

A segunda bateria de ensaios analisou as concentrações de 750, 700, 650 mg/L de herbicida mais o controle.

As concentrações de 550 e 500 mg/L de herbicida mais o controle foram utilizados para a realização da última bateria de testes, todos os ensaios seguiram os mesmos métodos dos anteriores.

Para a validação dos resultados ao término do ensaio definitivo com o herbicida comercial foi realizado um ensaio onde, utilizou-se a mesma concentração da CL_{50} obtida anteriormente nos ensaios com o herbicida comercial, em dez replicatas com dez peixes cada.

4.7 Ensaio definitivo com os principais componentes do herbicida comercial.

Com intuito de se observar a toxicidade dos principais componentes do herbicida comercial separadamente, foram realizados ensaios definitivos utilizando-se o herbicida hexazinona e o herbicida diuron separadamente. Os ensaios com o composto hexazinona e com o composto diuron foram realizados utilizando-se a mesma metodologia realizada nos ensaios definitivos com herbicida comercial.

As concentrações dos ensaios com diuron e hexazinona foram realizadas com base nas concentrações utilizadas nos ensaios definitivos com o herbicida comercial e as percentagens existentes destes componentes no produto comercial.

Nos ensaios definitivos com hexazinona foram utilizadas as concentrações: 0, 66, 73, 86, 92, 99, 106, 112 e 119 mg/L.

Devido a baixa solubilidade do diuron em água, em torno de 42 mg/L, o que não permitiu que fossem utilizadas as concentrações obtidas no ensaio definitivo com o herbicida comercial, para os ensaios definitivos com diuron foram utilizadas as concentrações: 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 mg/L.

4.8 Parâmetros de controle

Durante os ensaios, foram realizados controles com periodicidade diária da água dos recipientes de ensaios. Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros, unidades, limites de detecção e metodologias analíticas empregadas, segundo as recomendações de AWWA, *et al.* (1998).

TABELA 3 - Parâmetros utilizados, unidade, limite de detecção e metodologia analítica.

Parâmetro	Unidade	LDM	Método
pH	adimensional	0 -14	potenciométrico
Dureza total	mg CaCO ₃ /L	1	titrimétrico com edta
Oxigênio dissolvido	mg O ₂ /L	0,1	potenciométrico
Condutividade	µS/cm	0,1	potenciométrico
Temperatura	°C	1	leitura escala
Nitrogênio amoniacal	mg NH ₃ /L	0,001	colorimétrico

4.8.1 Aclimação

A caixa d'água de cultivo e o aquário de aclimação tiveram seu pH e amônia aferidos semanalmente e quando necessário foram feitas trocas parciais para a manutenção dos parâmetros de qualidade da água dentro da faixa aceitável para a espécie *Danio rerio*, além das trocas e sifonagens semanais.

A água da caixa de manutenção dos peixes era substituída por água da rede de abastecimento pública previamente desclorada, já no aquário de aclimação sua água era substituída por água de diluição preparada a partir das soluções estoque.

4.8.2 Água de diluição

As soluções estoque para a produção da água de diluição eram preparadas semanalmente, após o período de sete dias do início do seu preparo as soluções que restassem dentro dos frascos eram descartadas.

Quando necessário à produção de uma nova água de diluição o seu pH e a dureza eram aferidos e corrigidos, e a solução ficava sob aeração durante o período mínimo de 12 horas até o início do ensaio.

4.8.3 Ensaio estático de 48 horas

Tanto nos ensaios preliminares quanto nos ensaios definitivos os dados dos parâmetros de controle como pH, oxigênio dissolvido, condutividade, dureza total, temperatura, mortalidade e comportamento eram analisados no início do ensaio e posteriormente a cada 24 horas, até o término do ensaio. Na Tabela 4 é encontrado o resumo da periodicidade dos parâmetros que foram aplicados no decorrer dos ensaios.

TABELA 4 - Controle e periodicidade dos parâmetros aplicados durante os ensaios.

Parâmetro	Frequência de controle				
	Água de diluição	Caixa de aclimatação	Aquário de aclimatação	Ensaio preliminar	Ensaio definitivo
pH	cada 7 dias	cada 7 dias	cada 7 dias	0, 24 e 48 horas	0, 24 e 48 horas
Dureza total	cada 7 dias	–	cada 7 dias	0, 24 e 48 horas	0, 24 e 48 horas
Oxigênio dissolvido	–	–	–	0, 24 e 48 horas	0, 24 e 48 horas
Condutividade	–	–	–	0, 24 e 48 horas	0, 24 e 48 horas
Nitrogênio amoniacal	–	cada 7 dias	cada 7 dias	–	–
Temperatura	–	cada 7 dias	cada 7 dias	0, 24 e 48 horas	0, 24 e 48 horas
Mortalidade	–	Diário	Diário	0, 24 e 48 horas	0, 24 e 48 horas
Troca parcial de água e sifonagem	–	cada 7 dias	cada 7 dias	–	–

Todos os parâmetros de controle utilizados em função dos ensaios tiveram um controle rígido, com o intuito de reduzir o efeito das variações destes parâmetros sobre os resultados dos ensaios de toxicidade aguda.

4.9 Cálculo da concentração letal mediana (CL₅₀).

A partir das concentrações do ensaio definitivo e suas respectivas mortalidades, utilizando-se um programa de computador com o método estatístico Trimmed Spearman-Karber obteve-se a concentração letal mediana (CL₅₀) conforme USEPA (2002).

4.10 Análise do comportamento dos peixes

Inicialmente e a cada 24 horas após a colocação dos peixes na água contaminada com o herbicida comercial, foram sendo observadas as alterações nos comportamentos, como a hiperatividade ou hipoatividade relacionada à mobilidade do organismo estudado.

A alteração no comportamento é um alerta para o tipo de dano ou estresse causado por uma substância e esse estresse causará a redução ou aumento do metabolismo.

4.11 Ensaio de sensibilidade e de repetibilidade

O ensaio de sensibilidade do organismo teste foi realizado utilizando-se a substância de referência dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) conforme a ABNT 15088, seguindo a mesma metodologia do ensaio definitivo com o herbicida comercial, as concentrações utilizadas para o ensaio foram: 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 mg/L e com o programa estatístico Trimmed Spearman Karber obteve-se a concentração letal mediana (CL₅₀) . Depois foi realizado outro ensaio com 16 réplicas utilizando-se a mesma concentração da CL₅₀ de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em todos os recipientes ensaio.

Para o ensaio de repetibilidade com o herbicida comercial utilizou-se a mesma concentração obtida a partir do cálculo da CL_{50} para o herbicida comercial em 10 réplicas seguindo a mesma metodologia do ensaio definitivo.

Para a execução dos cálculos estatísticos dos resultados do ensaio de sensibilidade e ensaio de repetibilidade com o herbicida comercial foi utilizado o programa computacional Excel[®], a partir destes resultados obteve-se média amostral (\bar{x}), do limite superior de controle (LSC), do limite inferior de controle (LIC) e do coeficiente de variação (CV) que foram utilizados na construção da carta-controle de sensibilidade e a carta controle do ensaio de repetibilidade.

A média e o desvio-padrão são calculados a partir das seguintes equações:

$$\bar{x} = \Sigma x_i / n \quad (1)$$

$$DP = \sqrt{\frac{n \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2}{n(n-1)}} \quad (2)$$

Onde x_i é uma observação de controle individual e n é o número total de observações coletadas no período de tempo analisado. Estimativas iniciais são normalmente realizadas a partir de um conjunto de resultados n . Quando n é muito baixo, as estimativas podem não ser confiáveis. Estas estimativas devem ser revisadas quando mais observações de controles forem acumuladas. Isto pode ser feito a partir de uma análise do conjunto de resultados adicionais, registrando n , Σx_i e Σx_i^2 . Os totais acumulados podem ser obtidos adicionando os

valores para cada diferente conjunto de resultados. Então, estes totais podem ser usados nas equações 1 e 2, fornecendo estimativas acumuladas de \bar{x} e DP.

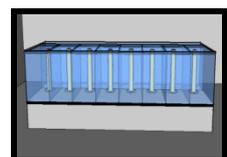
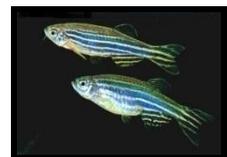
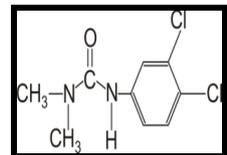
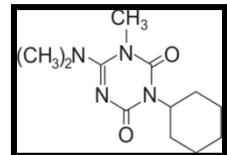
Os limites de controle são calculados a partir da média amostral (\bar{x}) e do desvio padrão (DP), conforme equação:

$$\text{Limite de controle} = \bar{x} \pm 2 \text{ DP}$$

O coeficiente de variação é calculado a partir da equação:

$$CV = \frac{DP}{\bar{x}} 100$$

Onde o desvio padrão sobre a média amostral vezes 100 irá expressar o resultado do coeficiente de variação em percentagem.



Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos controles de pH e dureza total das águas de diluição que foram preparadas para a realização dos testes estão apresentados na Tabela 5, verificou-se que todos os valores obtidos estiveram de acordo com os estabelecidos na norma da ABNT 15088 (2004), onde o pH da água de diluição deveria estar contido entre pH 7,0 e 7,6 e dureza total de 40 a 48 mg de CaCO₃/L.

TABELA 5 - Controle do pH e dureza total da água de diluição produzida para os ensaios.

Água de diluição N°	Parâmetro	
	pH	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
1	7,5	41
2	7,6	41
3	7,4	41
4	7,6	41
5	7,2	42
6	7,6	43
7	7,4	43
8	7,5	43
9	7,5	44
10	7,4	43
11	7,2	42
12	7,3	43

Com os resultados do ensaio preliminar com o herbicida comercial estabeleceu-se o intervalo entre a menor concentração que causou 100% de mortalidade 1000 mg/L e a maior concentração 400 mg/L onde não se observou mortalidade, a partir deste resultado determinou-se as concentrações para o ensaio definitivo.

As variações de temperatura durante as medições, conforme indicadas na Figura 16, foram pouco significativas no decorrer dos ensaios preliminares e definitivos, a mínima temperatura registrada ficou em 25,5°C e a máxima em 26,5°C permanecendo dentro da faixa aceitável de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ conforme estabelece a norma da ABNT 15088 (2004). O sistema compartilhado de dispersão da temperatura e o uso de um termostato eletrônico para o controle possibilitou o equilíbrio da temperatura em todos os compartimentos utilizados durante as baterias de ensaios.

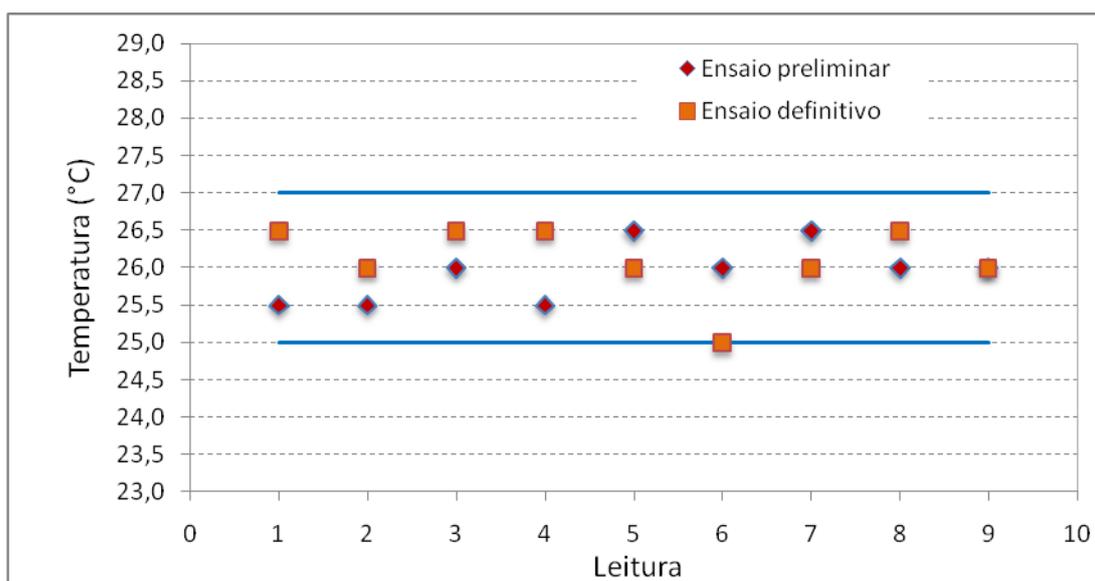


FIGURA 16 - Controle da temperatura durante os ensaios preliminares e definitivos com herbicida comercial.

O parâmetro de dureza total teve pequenas variações, aumentando ligeiramente se comparado com a dureza total encontrada nos recipientes de controles, indicando que os componentes do herbicida comercial nas concentrações estudadas causam pequenas alterações na dureza total conforme observado na Tabela 6.

TABELA 6 - Valores médios dos registros da variável dureza total da água dos testes de toxicidade aguda.

Concentração herbicida comercial (mg/L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	42	43	42
500	45	45	45
550	45	45	45
Controle 2	44	43	44
650	47	48	48
700	48	48	48
750	48	48	49
Controle 3	46	45	46
800	48	47	48
850	48	48	48
900	49	50	49

As alterações do pH, conforme apresentado na Tabela 7, puderam ser observadas principalmente nos recipientes ensaio onde haviam o herbicida comercial, a ligeira queda do pH se deve as excretas metabólicas que foram produzidas pelos organismos testes e pela degradação da matéria orgânica.

TABELA 7 - Valores médios dos registros da variável pH da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida comercial.

Concentração herbicida comercial (mg/L)	pH		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	7,4	7,4	7,3
500	7,5	7,3	7,2
550	7,4	7,1	7,2
Controle 2	7,6	7,6	7,5
650	7,7	7,4	7,3
700	7,8	7,4	7,3
750	7,8	7,3	7,2
Controle 3	7,5	7,4	7,2
800	7,7	7,3	7,3
850	7,8	7,3	7,3
900	7,8	7,4	7,3

O crescente aumento das concentrações do herbicida comercial se refletiu no aumento da condutividade como observado nos resultados apresentados na Tabela 8, no entanto, a condutividade inicial não apresentou alterações significativas com relação à condutividade final.

TABELA 8 - Valores médios dos registros da variável condutividade da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida comercial.

Concentração herbicida comercial (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	147	147	142
500	163	164	161
550	165	167	163
Controle 2	151	151	152
650	166	167	167
700	169	171	171
750	171	173	174
Controle 3	150	151	149
800	171	172	174
850	174	174	174
900	177	177	174

Quanto aos resultados de oxigênio dissolvido observou-se uma redução na concentração que pode ser atribuída à degradação de matéria orgânica e aumento do consumo dos peixes que se encontravam sob situação de estresse, mas o oxigênio dissolvido manteve-se acima do limite mínimo permitido de 4 mg/L conforme ABNT 15088 (2004).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados dos valores médios obtidos do controle do oxigênio dissolvido registrados durante os ensaios definitivos com o herbicida comercial.

TABELA 9 - Valores médios dos registros da variável oxigênio dissolvido da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida comercial.

Concentração herbicida comercial (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L O ₂)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	7,2	6,8	5,7
500	7,1	6,7	5,8
550	7,2	6,8	4,7
Controle 2	7,1	6,5	5,5
650	7,1	6,5	5,3
700	7,1	6,7	5,5
750	7,1	6,6	5,6
Controle 3	7,2	6,8	6,1
800	7,2	6,8	6,2
850	7,2	6,8	5,8
900	7,2	6,8	5,8

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda do herbicida comercial para o organismo teste *Danio rerio* foi determinada a concentração letal mediana CL_{50-48h} de 581,50 mg/L. Na Figura 17 está representado a interface do programa Trimmed Spearman-Kärber versão 1.5 com os resultados dos cálculos obtidos após terem sido inseridos todas as informações sobre o ensaio.

```

DATE: 18/10/20          TEST NUMBER: 001          DURATION: 48 h
TOXICANT : Herbicida comercial composto de 13,2% de hexaz
SPECIES : Danio rerio

RAW DATA:
-----
Concentration      Number      Mortalities
(mg/L)            Exposed
-00              20          0
500.00          20          9
550.00          20          8
650.00          20          13
700.00          20          18
750.00          20          18
800.00          20          19
850.00          20          20
900.00          20          20

SPEARMAN-KARBER TRIM:          42.50%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:
          LC50:          581.50
          95% LOWER CONFIDENCE: 514.97
          95% UPPER CONFIDENCE: 656.62

```

FIGURA 17 – Tela de apresentação dos resultados obtidos utilizando o programa do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber versão 1.5.

Na Figura 18 estão representadas os resultados percentuais das mortalidades dos organismos testes *Danio rerio* em função das concentrações estudadas, onde com o aumento da concentração do herbicida comercial observou-se o aumento da mortalidade dos peixes.

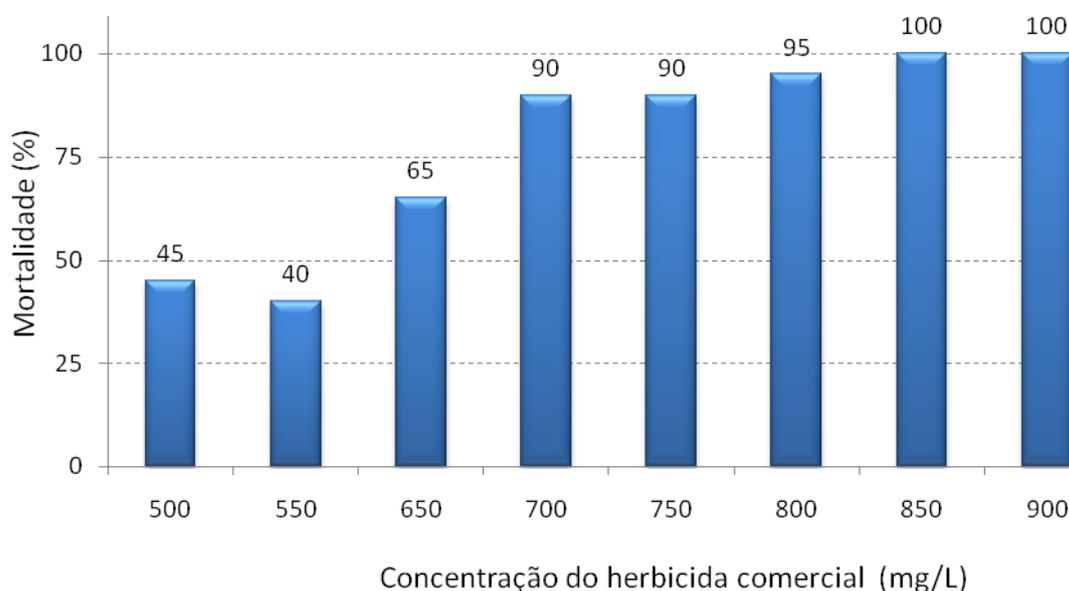


FIGURA 18 - Representação gráfica da porcentagem da mortalidade de *Danio rerio* em função do aumento da concentração do herbicida comercial composto por 13,2% em massa de hexazinona e 46,8% em massa de diuron no teste de toxicidade aguda.

A maior porcentagem de mortalidade dos organismos foi observada entre as concentrações de 850 mg/L e 900 mg/L, onde ocorreram 100% de mortalidade dos organismos, enquanto que no intervalo de 500 mg/L e 550 mg/L ocorreram à menor porcentagem de mortalidade, causando 40 a 45% de mortes dos organismos respectivamente.

Após 24 horas do início do ensaio pôde-se observar maior incidência da mortalidade, na Tabela 10 está apresentado o número de mortes de peixes que

ocorreram em 24 e 48 horas a partir do início de cada ensaio e o total em porcentagem de mortalidade observado para cada concentração do herbicida comercial.

TABELA 10 - Concentração do herbicida comercial, número de animais por concentração, número total de mortes em 24h e 48h após o início do ensaio e a porcentagem total de mortos por concentração de herbicida.

Concentração do herbicida comercial (mg/L)	Nº de de animais	Nº total de mortes		% total de mortes
		24h	48h	
Controle	20	0	0	0
500	20	1	8	45
550	20	1	7	40
650	20	1	12	65
700	20	2	16	90
750	20	7	11	90
800	20	3	16	95
850	20	7	13	100
900	20	8	12	100

Em todos os controles realizados para a validação dos resultados não foi observada nenhuma mortalidade.

No início do ensaio observou-se que nas concentrações entre 40 e 50 mg/L ocorreu uma hiperatividade que esta relacionada ao aumento do movimento natatório em mais de 50% dos organismos, demonstrando que o herbicida comercial nestas concentrações pode causar estresse, aumentando a atividade

locomotora que neste caso está relacionado à resposta de escape. Na Figura 19 está apresentada uma fotografia do ensaio definitivo onde foi observado o comportamento de escape representado pelo aumento da atividade natatória devido ao estresse gerado pelo agente tóxico.

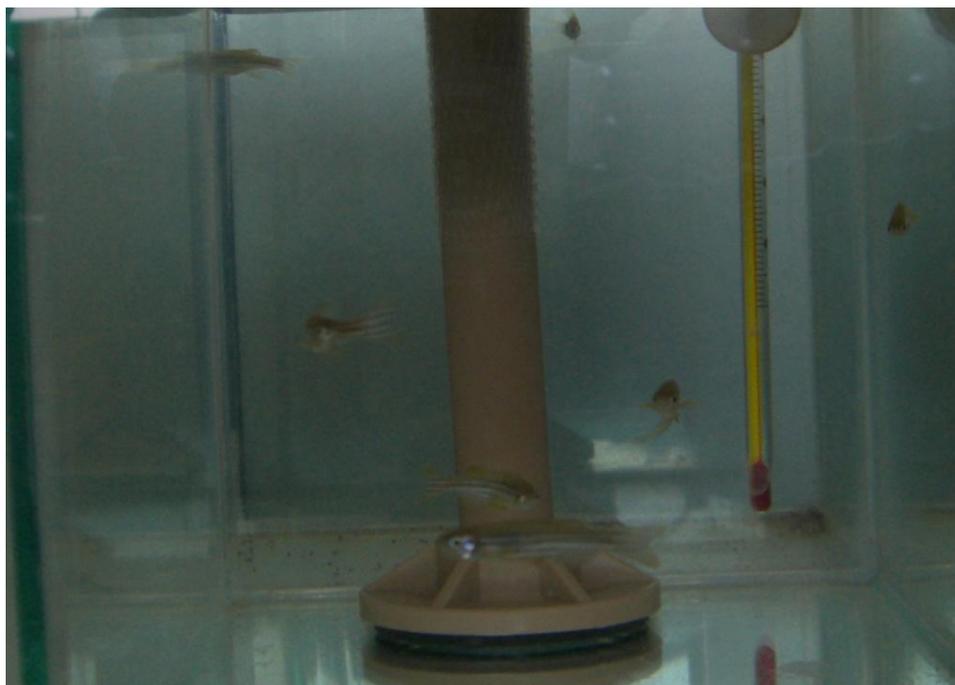


FIGURA 19 – Ensaio definitivo com o herbicida comercial onde se observou hiperatividade dos peixes representada pelo comportamento de escape, devido ao estresse gerado pelo agente tóxico.

Em concentrações acima de 50 mg/L observou-se hipoatividade em mais de 50% dos organismos representado na Figura 20, onde os organismos apresentaram uma diminuição do movimento natatório que pode ser explicado como um comportamento adaptativo ao estresse devido a uma possível realocação de energia para outros processos fisiológicos, resultando em menor quantidade de energia para a locomoção.

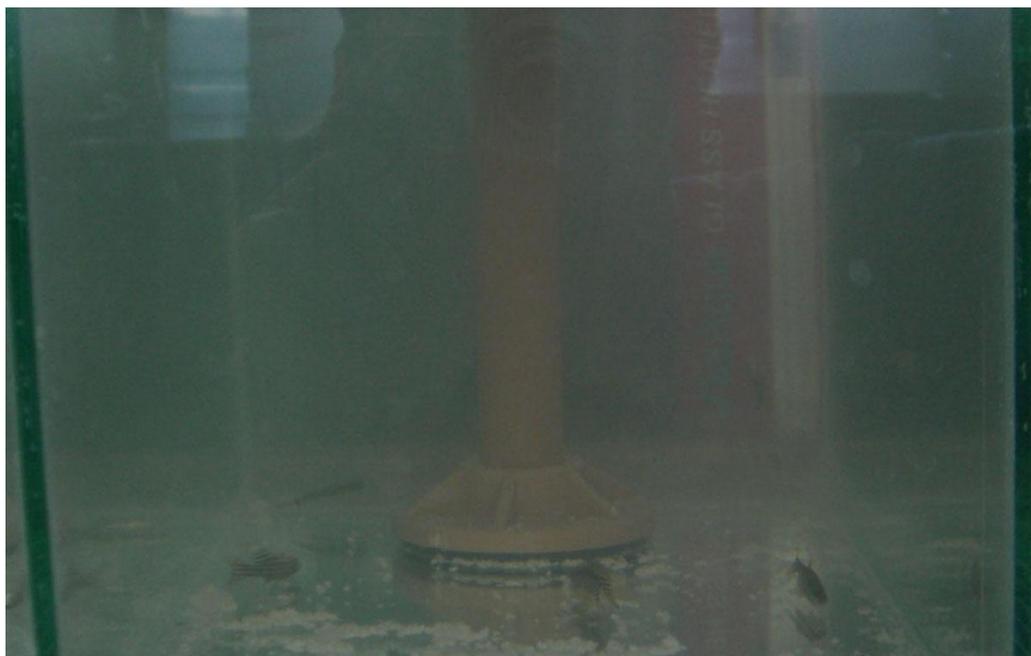


FIGURA 20 – Diminuição da mobilidade dos peixes devido à realocação de energia para outros processos fisiológicos.

Entre os ensaios definitivos foram realizados os ensaios de sensibilidade utilizando-se como substância de referência o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), inicialmente obteve-se a concentração letal mediana $CL_{50} \cong 114$ mg/L, a partir das réplicas realizadas com a CL_{50} foram obtidos dados para os cálculos onde o desvio padrão encontrado foi de $\pm 2,17$ e o coeficiente de variação encontrado foi de 20%. Esse resultado enquadra-se dentro do limite do coeficiente de variação de 45% (CV) proposto pela USEPA (2002). Na Figura 21 estão descritos os resultados da carta controle de sensibilidade, a média amostral (\bar{x}) ficou estabelecida em 5,5, o limite superior de controle (LSC) em 7,7 e o limite inferior em 3,3 (LIC).

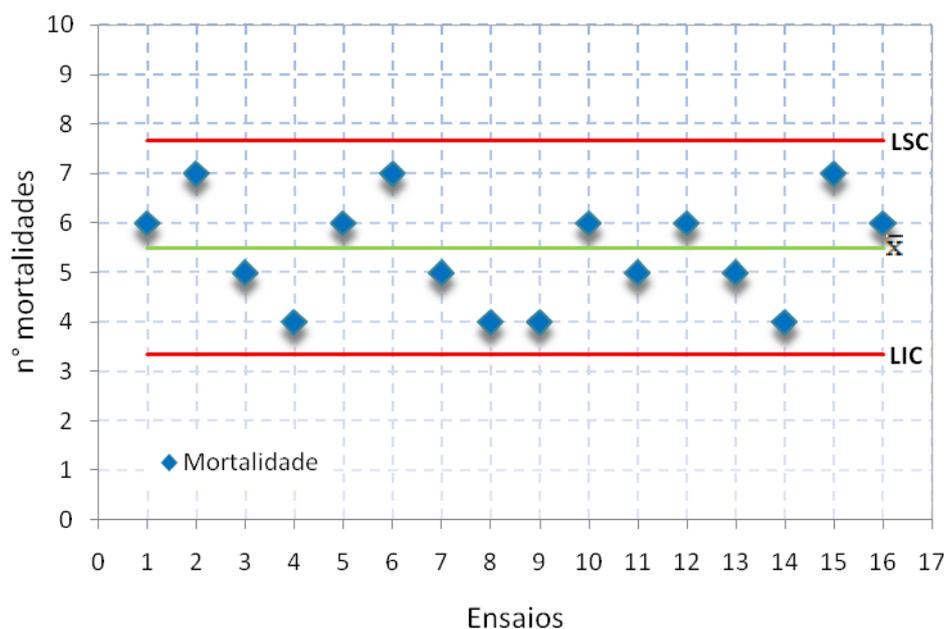


FIGURA 21 – Carta-control de sensibilidade com os resultados das mortalidades, a média amostral (\bar{x}), o limite superior de controle (LSC) e o limite inferior de controle (LIC), utilizando-se como substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

No ensaio de repetibilidade realizado com o herbicida comercial, obteve-se um desvio padrão de $\pm 2,53$ e o coeficiente de variação (CV) de 21%, enquadrando-se dentro do limite do coeficiente de variação de 45% proposto pela USEPA (2002). Na Figura 22 estão apresentados obtidos com o ensaio de repetibilidade com o herbicida comercial, onde a média amostral (\bar{x}) ficou estabelecida em 6, o limite superior de controle (LSC) em 8,5 e o limite inferior em 3,5 (LIC).

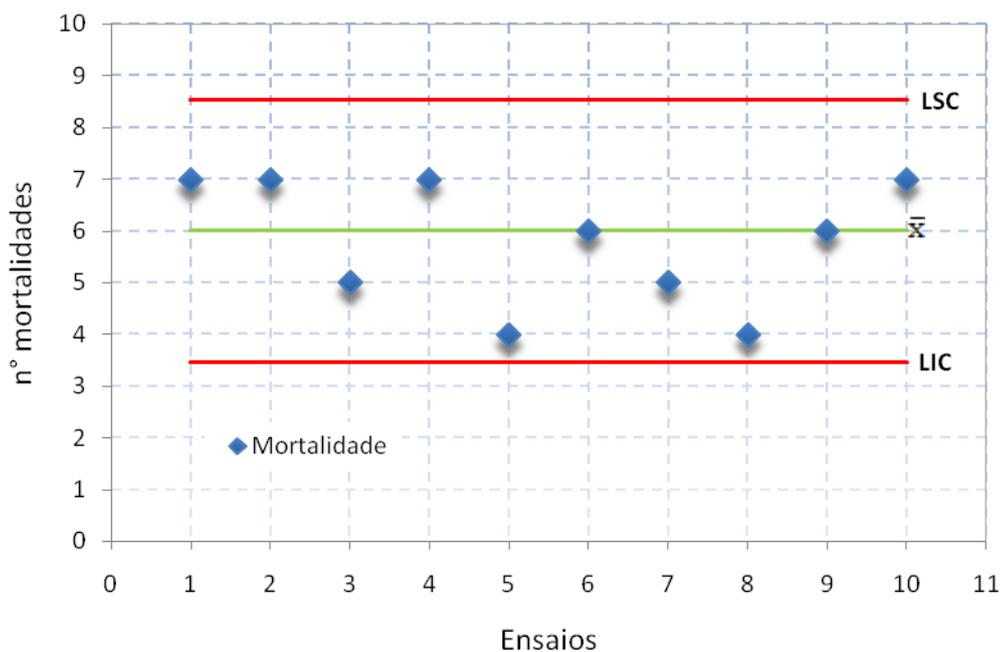


FIGURA 22 – Resultados das mortalidades do ensaio de repetibilidade com o herbicida comercial, média amostral (\bar{x}), limite superior de controle (LSC) e limite inferior de controle (LIC).

A variação da temperatura dos ensaios com hexazinona e com o diuron manteve-se dentro da faixa aceitável ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) conforme ABNT 15088 (2004), variando entre a máxima de 27°C e a mínima de $25,5^\circ\text{C}$, estas variações da temperatura foram pouco significativas. Estes resultados estão apresentados na Figura 23.

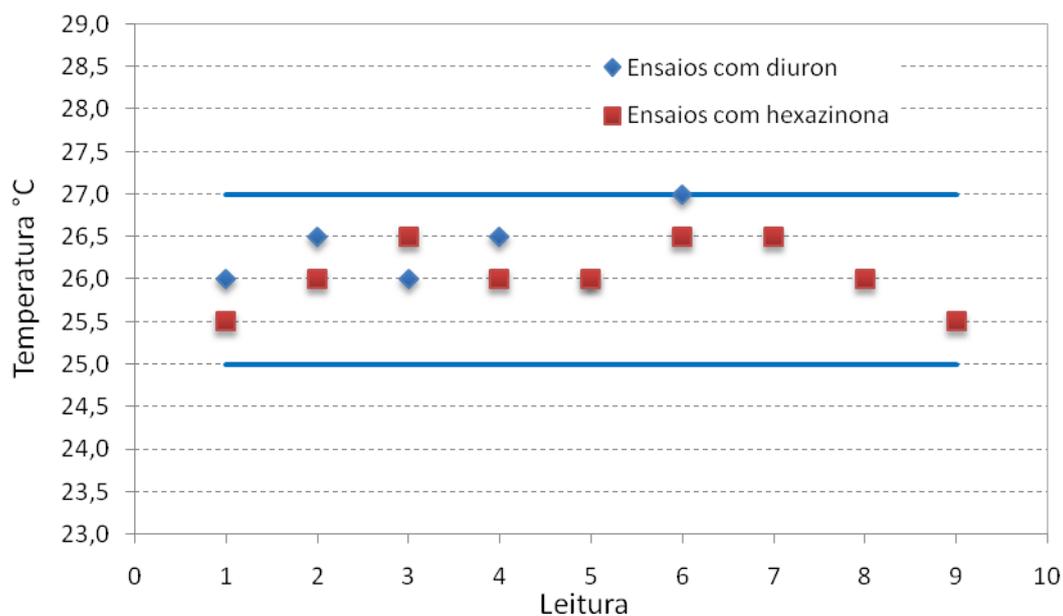


FIGURA 23 - Controle da temperatura durante os ensaios definitivos com diuron e com a hexazinona.

Os resultados do parâmetro de dureza total obtido durante o ensaio definitivo com hexazinona não apresentou nenhuma alteração significativa conforme descrito na Tabela 11.

TABELA 11 - Valores médios dos registros da variável dureza total da água dos testes de ecotoxicidade aguda com hexazinona.

Concentração hexazinona (mg/L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)		
	Início	24 horas	48 horas
Controle 1	43	43	43
66	42	43	43
73	42	43	43
Controle 2	41	41	41
86	41	41	41
92	41	41	41
99	41	41	41
Controle 3	41	41	41
106	42	41	42
112	41	41	41
119	41	41	41

Assim como nos ensaios realizados com hexazinona os valores da dureza total analisados durante os ensaios com diuron não tiveram alterações significativas conforme a tabela 12.

TABELA 12 - Valores médios dos registros da variável dureza total da água dos testes ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron.

Concentração diuron (mg/L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	44	43	44
1	44	44	44
5	45	44	45
10	44	44	44
Controle 2	43	43	42
20	42	42	43
30	43	43	43
40	44	43	43

As alterações de pH nos ensaios de ecotoxicidade aguda com hexazinona conforme a Tabela 13 não foram significativas.

TABELA 13 - Valores médios dos registros da variável pH da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida hexazinona.

Concentração hexazinona (mg/L)	pH		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	7,2	7,4	7,4
66	7,2	7,4	7,5
73	7,2	7,4	7,5
Controle 2	7,4	7,4	7,3
86	7,4	7,5	7,4
92	7,4	7,5	7,4
99	7,4	7,4	7,3
Controle 3	7,3	7,1	7,3
106	7,3	7,3	7,3
112	7,3	7,3	7,3
119	7,1	7,3	7,1

Nos ensaios realizados com o herbicida diuron conforme a Tabela 14 o pH também se manteve estável.

TABELA 14 - Valores médios dos registros da variável pH da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron.

Concentração diuron (mg/L)	pH		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	7,3	7,3	7,2
1	7,3	7,2	7,2
5	7,2	7,2	7,2
10	7,3	7,3	7,2
Controle 2	7,1	7,0	7,0
20	7,1	7,1	7,0
30	7,1	7,0	7,0
40	7,0	7,0	7,0

As concentrações de diuron e hexazinona utilizadas não foram suficientes para causar alterações significativas na condutividade durante os ensaios, permanecendo estável o parâmetro condutividade. Os valores encontrados das condutividades durante os ensaios são encontrados na Tabela 15 para o herbicida hexazinona e na Tabela 16 para o herbicida diuron.

TABELA 15 - Valores médios dos registros da variável condutividade da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida hexazinona.

Concentração hexazinona (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	141	141	141
66	140	139	140
73	140	140	141
Controle 2	130	131	132
86	131	131	131
92	131	132	132
99	131	133	132
Controle 3	134	133	132
106	135	134	134
112	135	135	134
119	135	134	134

TABELA 16 - Valores médios dos registros da variável condutividade da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron.

Concentração diuron mg/L	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	133	132	133
1	133	133	133
5	133	133	132
10	134	133	133
Controle 2	132	132	132
20	132	133	132
30	132	133	132
40	132	132	133

Durante os ensaios com a hexazinona e os ensaios com o diuron, ocorreram à diminuição da concentração do oxigênio dissolvido conforme os resultados apresentados na Tabela 17 e na Tabela 18 respectivamente, no entanto os níveis de oxigênio se mantiveram acima do limite mínimo de 4 mg/LO₂.

TABELA 17 - Valores médios dos registros da variável oxigênio dissolvido da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida hexazinona.

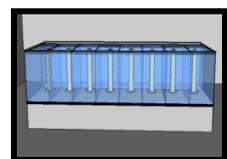
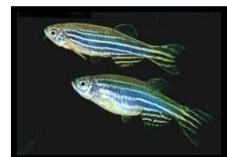
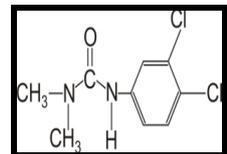
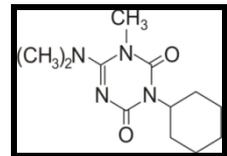
Concentração hexazinona (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L O ₂)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	7,3	6,8	6,4
66	7,3	6,8	6,1
73	7,3	6,7	6,2
Controle 2	7,4	6,5	6,6
86	7,3	6,7	6,4
92	7,3	6,5	6,1
99	7,2	6,8	6,3
Controle 3	7,2	6,6	6,4
106	7,3	6,7	6,5
112	7,3	6,8	6,2
119	7,3	6,8	6,0

TABELA 18 - Valores médios dos registros da variável oxigênio dissolvido da água dos testes de ecotoxicidade aguda com o herbicida diuron.

Concentração diuron (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L O ₂)		
	0 horas	24 horas	48 horas
Controle 1	7,9	7,3	6,7
1	7,9	7,3	6,8
5	7,8	7,2	6,7
10	7,9	7,1	6,8
Controle 2	7,4	7,1	6,7
20	7,8	7,2	6,6
30	7,8	7,1	6,7
40	7,8	7,1	6,7

Os ensaios realizados tanto com o herbicida diuron quanto com o herbicida hexazinona, nas concentrações que foram testadas, obtidas a partir do ensaio definitivo com o herbicida comercial, não apresentaram mortalidade e aparentemente não afetaram o comportamento natatório dos peixes.

A dificuldade de obtenção de trabalhos acerca do assunto estudado nesta pesquisa, onde especificamente utilizou-se o herbicida comercial composto por 46,8% em massa de diuron e 13,2% em massa de hexazinona, em conjunto com o bioindicador *Danio rerio*, motivou a realização desta pesquisa.



Conclusões e Recomendações

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas na presente pesquisa foram:

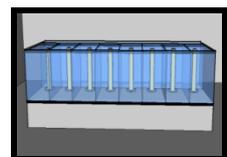
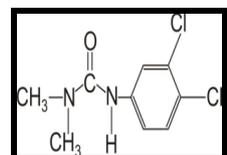
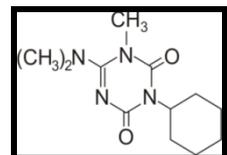
- Nas condições em que foram realizados os ensaios, o herbicida comercial estudado apresentou toxicidade CL_{50} de 581,5 mg/L para o organismo teste *Danio rerio*.
- Os organismos apresentaram alterações significativas no comportamento, onde foi observado hiperatividade, com um aumento na mobilidade, em concentrações entre 40 e 50 mg/L e em concentrações do herbicida comercial acima de 50 mg/L foi observado uma hipoatividade, demonstrada pela diminuição da mobilidade o que fica demonstrado que nestas concentrações podem ser observadas alterações que podem vir a causar impactos ambientais negativos em um nicho ecológico que esta espécie de organismo possa vir a representar.
- Para os principais compostos do herbicida comercial estudados separadamente, nas concentrações utilizadas, não foi observado nenhuma mortalidade ou alteração comportamental nos organismos teste.
- Os resultados dos ensaios de sensibilidade realizados com o organismo teste *Danio rerio* obtidos com a utilização da substância de referência dicromato de potássio demonstraram ser satisfatórios, pois o coeficiente de variação obtido esteve abaixo do limite estabelecido pelas normas USEPA (2002).

- Utilizando-se como parâmetro o limite do coeficiente de variação de 45% estabelecido pela USEPA (2002) para os ensaios de sensibilidade, o ensaio de repetibilidade realizado para a validação dos resultados dos ensaios com o herbicida comercial demonstrou ser válido.

Recomendações:

A partir resultados dos ensaios obtidos nesta pesquisa, para um maior aprofundamento acerca dos efeitos deletérios do herbicida comercial sobre o organismo teste *Danio rerio*, recomenda-se a realização de ensaios de ecotoxicidade crônica.

A utilização de organismos pertencentes a outros níveis tróficos tanto em ensaios de ecotoxicidade aguda, quanto crônica, também é recomendável para a elucidação dos efeitos tóxicos em diferentes níveis da cadeia alimentar.



Referências

7 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. Consultoria & Comércio. Disponível em (<http://www.fnp.com.br/>). Acesso em 3 de novembro de 2008.

ALSTOLF, E.; LANDONI, J.H. de; ALMEIDA, E. Curso sobre toxicologia de defensivos agrícolas, 3 ed, ANDEF. São Paulo, 159 p. 1984.

APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the examination the water and wastewater.18.ed. Washington, D.C. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1998.

ARAUCO, L.R.R.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J.G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 15, p. 55-64. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio em peixes. Rio de Janeiro. 2004.

BAGANZ, D. Comparing locomotor behaviour of fish species *Danio rerio* and *Leucaspilus delineatus* under the influence of Chemical stressors (tese de doutorado). Berlin: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, der Humboldt-Universität zu Berlin. 2005.

BATISTA, G.C. de. Introdução e ocorrência de defensivos agrícolas no meio ambiente. In: BATISTA, G.C. de. Curso de defensivos agrícolas, inseticidas e acaricidas – módulo 4. MEC/ABEAS. Brasília, 17p. 1988.

BRASIL. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 2005.

CASTRO, D. O uso do aquífero tem limites. Jornal Gazeta de Ribeirão. Edição 451, matéria publicada em 13 de julho de 2008.

CEMBROWSKI, G.S.; Westgard, J.O.; Groth, T. Effects of data rounding on the performance characteristics of statistical quality control rules. Clin. Chem. 26, 934. 1980.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em (www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#ensaios). Acesso em 24 de outubro de 2008.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. Cana-de-açúcar. Safra 2008 segundo levantamento. agosto de 2008. Disponível em (www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/cana.pdf). Acesso em 28 de outubro de 2008.

DAERP – Departamento de Águas e Esgotos de Ribeirão Preto – SP. Disponível em (www.ribeiraopreto.sp.gov.br/daerp). Acesso em 14 de outubro de 2008.

DUPONT. Ficha de informações de segurança do produto químico. 2003. Disponível em (<http://www.dupontagricola.com.br/lisFispqPDF.php?p=7&nomTbl=-1&codDado=0&itemExpandido=1&codCategoriaMenu=22&nomArea=FISPQ>). Acesso em 08 de maio de 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. fifth edition. Washington, DC. 2002.

FERRÃO-FILHO, A. S.; CUNHA, R.; MAGALHÃES, V. F.; SOARES, M. C. S.; BAPTISTA, D. F. Evaluation of sub-lethal toxicity of cyanobacteria on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. J. Braz. Soc. Ecotoxicol, Brazil. v. 2, n. 2. 2007.

HENARES, M.N.P.; CRUZ, C.; GOMES, G.R.; PITELLI, R.A.; MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do ditaque na brânquia e no fígado do piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 17, p. 107-1116. 2007.

HENDRICKS, E. E.; SHAEFFER, D. J.; PERRY, J. A. (1989) In: LEVIN, S. A.; HARWELL, M. A.; KELLY, J. R.; KIMBALL, K. D. Ecotoxicology: problems and approaches. Springer-Verlag, New York, cap. 13, p. 351-364. 1989.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/default.shtm>). Acesso em 24 de outubro de 2008.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289 p. 2004.

LANÇAS, F.M. “Estudo de resíduo de Diuron e Hexazinona em Água Superficial (de Rio), no Brasil”; RE-98-053^a.02; Laboratório de Cromatografia, Instituto de Química de São Carlos/USP, São Carlos. 2002.

LAVORENTTI, A.; LANÇAS, F. M. Monitoramento de hexazinona e diuron em águas de superfície (rios) em regiões canavieiras do Estado de São Paulo, relatório Dupont. 2003.

LEONARD, R.A. Movement of pesticides into surface waters. In: CHENG, H.H. ed. Pesticides in soil environment: Processes, impacts, and modeling. 2 ed. Madison, Soil Science Society of America. p.303-349. 1990.

LITTLE, E.E.; FAIRCHILD, J.F.; DE LONAY, A.J. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. American Fisheries Society Symposium 14: 67-76. 1993.

LOBO, E. A.; CALLEGARO, V. L. Avaliação da qualidade de águas doces continentais com base em algas diatomáceas epilíticas: Enfoque metodológico. p. 277- 300. In: TUCCI, C. E. M. & MARQUES, D. M. (Org.), Avaliação e Controle da Drenagem Urbana. Porto Alegre: Universidade/UFRGS. 558p. 2000.

LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. DE LOS A.P. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela Ed. cap. 11, p. 263-272. 2004.

MACHADO NETO, J.G. Ecotoxicologia de agrotóxicos. Revisão Bibliográfica. Funep, Jaboticabal, SP. 1991.

MENDONÇA, R.T.; MARINHO, J. L. Discussão sobre intoxicações por medicamentos e agrotóxicos no Brasil de 1999 a 2002. Revista Eletrônica de Farmácia, v.2, n.2, p.45-63. 2005.

NAKAGOME, F.K.; NOLDIN, J.A.; RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda de alguns de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o

peixe *Danio rerio*. Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 17, p. 117-122. 2007.

OPAZO, M. A. U. Gráficos de controle. 2008. Disponível em ([www.fag.edu.br/professores /pos /MATERIAIS /.../Aula%20.../Grafico-Controle-Cap 2A - 2008.pdf](http://www.fag.edu.br/professores/pos/MATERIAIS/.../Aula%20.../Grafico-Controle-Cap%202A-2008.pdf) -) Acesso em 5 de maio de 2008.

PESSOA, M.C.P.Y.; SCRAMIN, S.; CHAIN, A.; FERRACCINI, V. L. Avaliação do Potencial de Transporte de Agrotóxicos usados no Brasil por Modelos Screening e Planilha Eletrônica Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 24p. 2007. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 44).

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Hemisphere Publishing Corporation. Washington. 1985.

SAIZ, E.; MOVILLA, J.; YEBRA, L.; BARATA, C.; CALBET, A. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. Environmental Pollution 157, p. 1219–1226. 2009.

SÁNCHEZ, L.E. Avaliação de Impacto Ambiental: Conceitos e Métodos. Oficina de Textos, São Paulo, 495 p. 2006.

SCHRECK C.B.; OLLA B.L.; DAVIS, M.W. Behavioral response to stress. In: Iwama GK, Pickering, AAD, Sumpter JP, Schreck CB, editors. Fish stress and Health in Aquaculture. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 145-170. 1997.

SHELLEY, L. K.; Balfry, S. K.; Ross, P. S.; Kennedy, C. J. Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 92, p. 95-103. 2009.

SHEWHART, W. A. Economic Control of Quality of the Manufactured Product. Van Nostrand, New York, NY. 1931.

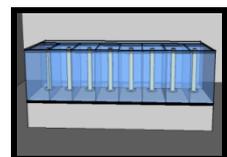
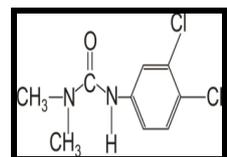
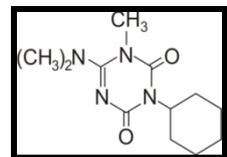
SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para defesa. Disponível em (www.sindag.com.br/index). Acesso em 13 de junho de 2008.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Zoologia geral. 6 ed. Companhia Editora Nacional. São Paulo. 816 p. 2000.

TRIEBSKORN, K.W.; KOLER, H.R; HONNEN, W.; SCHRAMM, M.; ADAMS, S.M.; MULLER, E.F. Induction of heat shock proteins, changes in liver structure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J Aquat Ecosystem Stress and Recovery*; p. 57-73. 1997.

UNICA – União Da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em (<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>). Acesso em 18 de setembro de 2008.

VOUTSAS, E.; MAGOULAS, K.; TASSIOS, D. Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. *Chemosphere*, 2002.



Apêndices

APÊNDICE A

TABELA 19 - Resultados do parâmetro condutividade do ensaio definitivo com herbicida comercial.

Concentração (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	148	147	147	148	143	141
500	164	163	165	164	160	162
550	165	166	168	166	163	162
Controle 2	151	151	151	152	151	153
650	165	167	166	168	167	168
700	168	169	170	171	171	172
750	170	172	173	173	173	174
Controle 3	149	150	151	151	150	149
800	170	172	172	173	175	174
850	175	174	174	175	173	174
900	177	177	177	177	175	174

TABELA 20 - Resultados do parâmetro oxigênio dissolvido do ensaio definitivo com herbicida comercial.

Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L O_2)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	7,1	7,2	6,8	6,7	5,7	5,7
500	7,1	7,1	6,7	6,7	5,8	5,7
550	7,2	7,1	6,7	6,8	4,8	4,6
Controle 2	7,2	7,0	6,5	6,4	5,4	5,5
650	7,0	7,1	6,5	6,5	5,2	5,4
700	7,1	7,1	6,6	6,7	5,3	5,6
750	7,1	7,1	6,6	6,5	5,6	5,6
Controle 3	7,2	7,2	6,7	6,8	6,0	6,1
800	7,2	7,2	6,8	6,8	6,3	6,1
850	7,2	7,1	6,8	6,7	5,9	5,7
900	7,2	7,1	6,8	6,7	5,8	5,8

TABELA 21 - Resultados do parâmetro de dureza total do ensaio definitivo com herbicida comercial.

Concentração (mg/L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	42	42	43	43	42	42
500	45	45	45	45	45	45
550	45	45	45	44	45	45
Controle 2	44	44	44	42	44	44
650	48	49	48	47	48	48
700	48	49	48	47	49	48
750	48	48	48	47	49	48
Controle 3	45	46	44	45	45	46
800	47	47	47	48	48	48
850	47	48	48	49	48	48
900	49	49	50	50	49	50

TABELA 22 - Resultados do parâmetro pH do ensaio definitivo com herbicida comercial.

Concentração (mg/L)	pH					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	7,4	7,4	7,4	7,4	7,3	7,4
500	7,5	7,5	7,3	7,4	7,2	7,2
550	7,5	7,4	7,2	7,1	7,2	7,2
Controle 2	7,6	7,6	7,6	7,6	7,5	7,5
650	7,7	7,7	7,4	7,5	7,2	7,3
700	7,7	7,8	7,4	7,4	7,3	7,2
750	7,8	7,8	7,3	7,4	7,2	7,3
Controle 3	7,5	7,5	7,4	7,4	7,2	7,2
800	7,7	7,7	7,4	7,3	7,3	7,2
850	7,8	7,8	7,3	7,3	7,3	7,4
900	7,8	7,8	7,4	7,4	7,3	7,3

APÊNDICE B

TABELA 23 – Resultados do parâmetro de condutividade do ensaio definitivo com hexazinona.

Concentração (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	141	141	141	141	141	141
500	141	140	139	139	141	140
550	140	140	140	140	141	141
Controle 2	130	130	131	131	131	132
650	131	131	132	131	131	131
700	131	131	132	132	131	132
750	131	131	132	133	132	131
Controle 3	133	134	132	133	132	132
800	134	135	134	134	134	134
850	135	135	135	135	134	134
900	135	135	133	134	134	134

TABELA 24 - Resultados do parâmetro oxigênio dissolvido do ensaio definitivo com hexazinona.

Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido ($\text{mg}/\text{L O}_2$)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	7,3	7,2	6,8	6,8	6,4	6,3
500	7,3	7,2	6,7	6,8	6,2	6,0
550	7,3	7,2	6,7	6,7	6,3	6,1
Controle 2	7,4	7,3	6,4	6,6	6,5	6,7
650	7,3	7,3	6,7	6,6	6,4	6,3
700	7,3	7,2	6,6	6,4	6,2	6,0
750	7,2	7,2	6,9	6,6	6,5	6,1
Controle 3	7,1	7,2	6,6	6,6	6,3	6,4
800	7,3	7,3	6,6	6,7	6,5	6,5
850	7,3	7,2	6,8	6,8	6,1	6,3
900	7,2	7,3	6,9	6,7	5,9	6,1

TABELA 25 - Resultados do parâmetro dureza total do ensaio definitivo com hexazinona.

Concentração (mg/L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	43	43	43	42	42	43
500	42	43	43	43	43	43
550	42	42	43	43	43	43
Controle 2	41	41	41	41	41	41
650	41	41	41	41	41	40
700	41	41	41	41	41	41
750	41	41	41	41	41	41
Controle 3	41	41	41	41	41	41
800	41	41	41	41	42	41
850	41	41	41	41	41	41
900	41	41	41	41	40	41

TABELA 26 - Resultados do parâmetro pH do ensaio definitivo com hexazinona.

Concentração (mg/L)	pH					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	7,2	7,2	7,4	7,4	7,4	7,5
500	7,2	7,2	7,3	7,4	7,4	7,5
550	7,2	7,2	7,4	7,3	7,5	7,4
Controle 2	7,4	7,4	7,4	7,5	7,2	7,3
650	7,4	7,4	7,5	7,5	7,4	7,4
700	7,4	7,4	7,5	7,4	7,4	7,3
750	7,4	7,4	7,4	7,3	7,3	7,3
Controle 3	7,3	7,3	7,1	7,2	7,3	7,3
800	7,4	7,4	7,3	7,3	7,4	7,3
850	7,4	7,4	7,3	7,3	7,3	7,3
900	7,4	7,4	7,3	7,3	7,3	6,9

APÊNDICE C

TABELA 27 - Resultados do parâmetro condutividade do ensaio com diuron.

Concentração (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	133	133	132	132	133	133
1	133	133	132	133	133	133
5	133	133	133	133	132	132
10	133	134	133	133	133	133
Controle 2	132	131	132	132	132	132
20	132	132	132	133	132	132
30	131	132	132	133	132	132
40	132	132	132	132	132	133

TABELA 28 – Resultados do parâmetro oxigênio dissolvido do ensaio com diuron.

Concentração (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L O_2)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	7,9	7,9	7,3	7,2	6,7	6,6
1	7,9	7,8	7,3	7,3	6,8	6,7
5	7,8	7,8	7,2	7,2	6,7	6,7
10	7,9	7,8	7,2	7,0	6,9	6,7
Controle 2	7,0	7,8	7,1	7,0	6,7	6,6
20	7,7	7,8	7,2	7,1	6,6	6,6
30	7,8	7,8	7,1	7,1	6,7	6,6
40	7,8	7,8	7,1	7,1	6,7	6,7

TABELA 29 - Resultados do parâmetro dureza total do ensaio definitivo com diuron.

Concentração (mg/L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	44	44	43	43	44	43
1	44	44	44	44	44	43
5	45	44	44	44	45	45
10	44	44	44	44	44	44
Controle 2	43	42	43	43	42	42
20	42	42	42	42	42	43
30	43	43	42	43	42	43
40	43	44	43	43	42	43

TABELA 30 - Resultados do parâmetro pH do ensaio definitivo com diuron.

Concentração (mg/L)	pH					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
Controle 1	7,3	7,3	7,3	7,2	7,2	7,2
1	7,3	7,3	7,2	7,2	7,2	7,2
5	7,3	7,2	7,2	7,2	7,2	7,1
10	7,2	7,3	7,2	7,3	7,2	7,2
Controle 2	7,1	7,1	7,0	7,0	7,0	7,0
20	7,1	7,1	7,1	7,0	7,0	7,0
30	7,0	7,1	7,0	7,0	6,9	7,0
40	6,9	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)