

Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*)#

Toxicity evaluation of herbicides used in sugarcane crops to Zebrafish (*Danio rerio*)

Gabrieli Aparecida Sanches Tesolin*

Marina Menezes Marson*

Claudio Martín Jonsson**

Antônio José Arsénia Nogueira***

Daniel Andrade de Siqueira Franco*

Sydnei Dionísio Batista de Almeida*

Marcus Barifouse Matallo*

Monica Accai Marcondes de Moura****

Resumo

Na natureza, os organismos são constantemente expostos a mais de um agente tóxico e, apesar do fenômeno de interações químicas ser conhecido há tempos, são poucos os estudos realizados que privilegiam a observação dos efeitos decorrentes da exposição a duas ou mais substâncias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito combinado da mistura dos herbicidas Gesapax 500® (ametrina 500 g/L) e Velpar K® (diuron 468 g/kg + hexazinone 132 g/kg) sobre o paulistinha (*Danio rerio*). O ensaio foi baseado no teste FET da OECD, com duração de 96 horas. As concentrações testadas foram 0, 21,22, 29,52, 41,08, 57,17 e 79,56 mg/L de Gesapax 500 vs. 0, 15,21, 21,17, 29,46, 40,99 e 57,04 mg/L de Velpar K. Os testes foram conduzidos em triplicata e avaliados diariamente. As CL_{50-96h} determinadas foram $41,705 \pm 8,373$ mg/L para o Gesapax 500 e $55,460 \pm 20,826$ mg/L para o Velpar K. O modelo da mistura que melhor descreve a relação entre os dois componentes é a ação independente, sendo a toxicidade dose-dependente, ou seja, em baixas doses ocorre antagonismo e, em altas doses, sinergismo. Os *endpoints* edemas, atraso no desenvolvimento embrionário (*delay*) e na absorção do saco vitelínico e diminuição na frequência de cardíaca foram observados a partir das concentrações mais baixas da mistura. Pelos dados obtidos, concluiu-se que a mistura de Gesapax 500 e Velpar K é medianamente tóxica para o paulistinha e que os *endpoints* avaliados foram úteis na determinação de sua toxicidade.

Palavras-chave: Herbicidas - toxicidade. Diurona. Toxicidade Aguda. Misturas Complexas.

DOI: 10.15343/0104-7809.20143801086097

Pesquisa financiada pela Agência FAPESP; n. do processo 2012/17140-7 (IC), e pelo CNPQ-PIBIC, n. do processo 125506/2012-0.

* Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Laboratório da Ciência das Plantas Daninhas, Campinas-SP, Brasil.

** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Brasil.

*** Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro, Portugal.

**** Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Laboratório da Ciência das Plantas Daninhas, Campinas-SP, Brasil. E-mail: monica_moura@biologico.sp.gov.br

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Abstract

In nature, organisms are constantly exposed to more than one toxic agent, and although the phenomenon of chemical interactions are known for some time, there are few previous studies that emphasize observation of the effects resulting from exposure to two or more substances. The aim of this study was to evaluate the combined effect of the mixture of herbicide Gesapax 500® (ametrina 500 g/L) and Velpar K® (diuron 468 g/kg + hexazinone 132 g/kg) on zebrafish (*Danio rerio*). The test was based on the Fish Embryo Toxicity (FET) from OECD, lasting 96 hours. The concentrations tested were: 0, 21.22, 29.52, 41.08, 57.17 and 79.56 mg/L Gesapax 500 vs. 0, 15.21, 21.17, 29.46, 40.99 and 57.04 mg/L Velpar K. Tests were conducted in triplicate and evaluated daily. LC_{50-96h} was determined to 41.705 ± 8.373 mg/L to Gesapax 500 and 55.460 ± 20.826 mg/L to Velpar K. The mixture model that best describes the relationship between the two components is independent action and toxicity of the mixture is dose-dependent, occurring antagonism at low doses and synergism at high doses. The endpoints edema, delay in general development and in yolk sac absorption and decrease in frequency of heart-beat rate were observed from the lower concentrations of the mixture. From the data obtained, it is concluded that the mixture of Velpar K and Gesapax 500 is moderately toxic to zebrafish and that the endpoints evaluated were useful in determining its toxicity.

Keywords: Herbicides - toxicity. Diuron. Acute Toxicity. Complex Mixtures.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar empregada na produção de açúcar e etanol, um combustível que vem chamando cada vez mais atenção do resto do mundo por configurar-se como uma alternativa ao uso do petróleo, com vantagens ambientais e econômicas¹. Somente no ano de 2011 foram produzidas no estado de São Paulo, aproximadamente, 400 mil toneladas de cana-de-açúcar em uma área de cinco milhões de hectares plantados², colocando o estado como o maior produtor do país. Essa elevada produtividade só pôde ser alcançada graças ao uso intensivo de implementos e insumos, que acabam por levar ao comprometimento dos ecossistemas e à poluição dos corpos d'água adjacentes às áreas de cultivo³. Dentre os insumos mais utilizados pela agroindústria canavieira, encontram-se os herbicidas pré e pós-emergentes (80%), utilizados no combate às plantas daninhas.

Uma vez no ambiente aquático, os herbicidas apresentam distribuição complexa, determinada pela dinâmica dos processos de partição entre os ecótonos água, biota e sedimento. Mesmo que as concentrações do contaminante encontradas na água estejam dentro dos limites estabelecidos pela legislação competente, ele poderá se acumular, atingindo níveis elevados e causando efeitos deletérios aos organismos não-

-alvo. Tal processo é conhecido como bioacumulação e pode não ser notado até que quantidades significativas do contaminante sejam lançadas no meio⁴.

A maior parte dos estudos sobre o comportamento dos herbicidas diz respeito a ecossistemas aquáticos temperados, havendo ainda grandes lacunas no conhecimento de seus efeitos em clima tropical. O que já se pode afirmar é que, para muitas formulações largamente empregadas nas culturas comerciais brasileiras, as doses que podem levar ao declínio das comunidades aquáticas são mais restritivas do que aquelas empregadas em países de clima temperado, normalmente utilizadas como referência⁵.

Armas, et al⁶, realizaram um diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas em águas superficiais e no sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí, uma região com extensa área de cultivo de cana-de-açúcar (25,6% da atividade agrícola da bacia) e sob influência de elevado adensamento populacional. Segundo os autores, as triazinas (ametrina, atrazina e simazina), o hexazinone, o glifosato e o clomazone foram observados na água, sendo que as primeiras foram detectadas em níveis mais elevados, acima do padrão de potabilidade brasileiro, principalmente nas áreas de recarga do aquífero Guarani. A carga residual para a soma de agrotóxicos foi de duas a treze vezes maior que o limite máximo de 0,5 µg/L, estipulado pela Comunidade Europeia,

e os níveis de atrazina foram observados acima do padrão CONAMA 357⁷, configurando-se como um risco à biota aquática associada.

Na natureza, os organismos são constantemente expostos a mais de um agente tóxico, podendo resultar num efeito da ação conjunta de poluentes sobre um sistema biológico⁸. Apesar do fenômeno de interações químicas ser conhecido há tempos, são poucos os estudos já realizados que privilegiam a observação dos efeitos decorrentes da exposição a duas ou mais substâncias. Assim, Macek⁹ avaliou a ação conjunta de 29 misturas binárias de formulações de agrotóxicos sobre “bluegills” (*Lepomis macrochirus*) e constatou que 11 delas possuíam efeito tóxico agudo maior do que aditivo, caracterizado por um sinergismo. A combinação dos inseticidas malathion e dioxathion na proporção 1:1 potencializou a toxicidade em trutas em aproximadamente 8 vezes, em relação à toxicidade de cada composto avaliado individualmente¹⁰.

A CL_{50-96h} determinada para embriões de paulistinha (*Danio rerio*), um ciprinídeo tropical exposto à ametrina, foi de $48,46 \pm 2,2$ (IC = 95%) mg/L, quando utilizado o padrão analítico (> 98% de pureza)¹¹. Porém, quando se utilizou o produto comercial, foi observada uma toxicidade maior para essa espécie ($CL_{50-96h} = 9,8$ mg/L)¹².

Silva, et al¹³, que trabalharam com paulistinha adulto, determinaram a CL_{50-96h} do Velpar K em 581,50 mg/L. Ou seja, nessas condições o produto é considerado praticamente não tóxico. Segundo esses autores, os ingredientes inertes da composição do herbicida comercial são os principais causadores da toxicidade aguda para essa espécie. Não existe, porém, informações sobre a toxicidade da mistura dos herbicidas Gesapax 500 e Velpar K para espécies tropicais.

As usinas de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo fazem uso da mistura do Velpar K WG[®] com a ametrina em dose de $2,0 \text{ kg ha}^{-1}$ de cada ingrediente ativo (i.a.), em um volume de calda de aplicação de 400 L/ha, o que resulta em uma concentração de 3,0 g/L por i.a. O impacto dessa atividade sobre organismos aquáticos ainda não é bem conhecido, sendo necessária a caracterização dos efeitos tóxicos e a fixação de *endpoints*, que representam o efeito biológico usado como índice de efeito de um agente químico sobre organismos ou sistemas¹⁴.

Estudos internacionais têm apontado o *Danio rerio* como uma alternativa bastante promissora em pesquisas em neurociências e sobre os efeitos do estresse no sistema nervoso central; no desenvolvimento de novos medicamentos e na avaliação ecotoxicológica de agroquímicos, produtos farmacêuticos e químicos industriais, todos estes como fontes de poluição de ecossistemas aquáticos. Como vantagens do uso dessa espécie, citam-se o ciclo de vida rápido, sendo que, com apenas quatro dias, vários de seus órgãos estão formados; a grande quantidade de embriões produzidos a cada postura e seu tamanho diminuto, pois com poucos milímetros de comprimento podem ser acomodados em poços de 2 mL de volume útil, tendo sua sensibilidade testada mesmo em baixíssimas doses de compostos químicos. Com o paulistinha é possível testar em meses e com alguns milhares de dólares o que levaria anos para ser feito com roedores e custaria milhões¹⁵.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda dos herbicidas Gesapax 500 (ametrina 500 g/L) e Velpar K (diuron 468 g/kg + hexazinone 132 g/kg), determinando se, quando em mistura, estes apresentam efeito combinado sobre o paulistinha.

MÉTODO

Foram testadas as formulações de herbicidas comerciais à base de ametrina (Gesapax 500[®]; suspensão concentrada; 500 g/L; Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., Lote: 0008-10-26100) e da mistura de diuron e hexazinona (Velpar K[®] WG; granulado dispersível; 468 g/kg diuron + 132 g/kg hexazinona; Du Pont do Brasil S.A., Lote: 234-11-3240). Avaliou-se também a mistura delas.

Testes single

Embriões

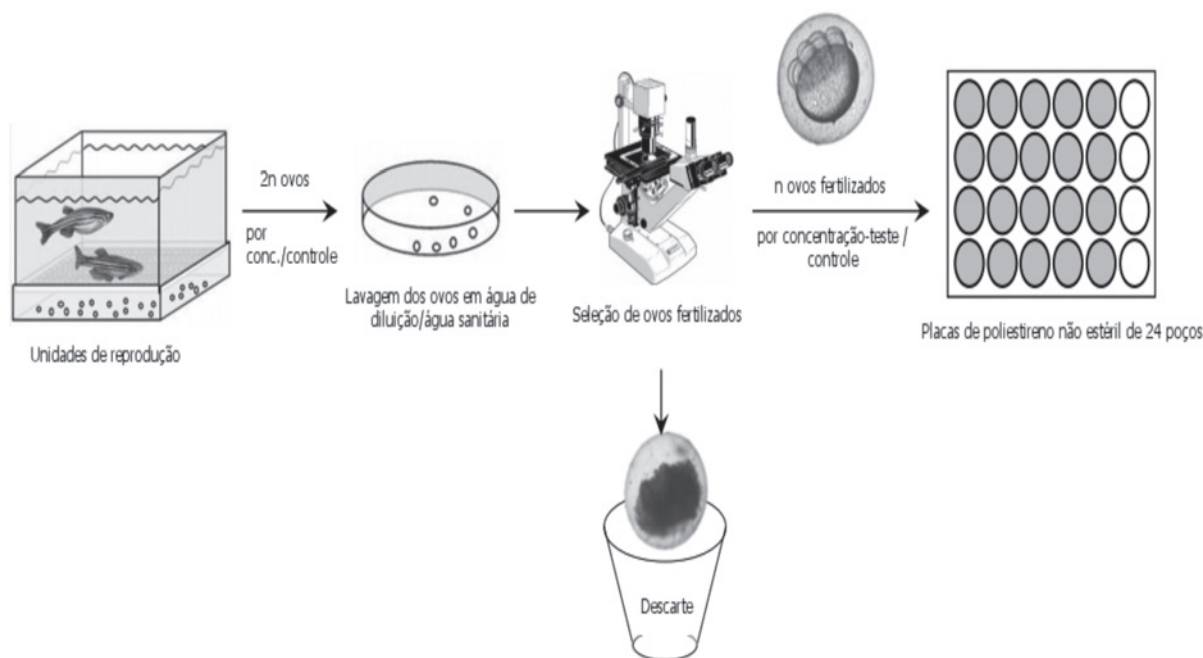
Os testes foram realizados no Laboratório das Plantas Daninhas, no Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas, baseados no protocolo do teste FET (*Fish Embryo Toxicity Test*)¹⁶ com embriões de paulistinha. Os ovos foram coletados cerca de 30 minutos após a fertilização e, em um prazo não superior a três

horas, expostos às concentrações-teste. Ovos não fertilizados, que sofreram irregulares durante a clivagem ou injúrias foram descartados (Figura 1).

Inicialmente, foram realizados os testes individuais com cada componente da mistura a ser testada, utilizando-se as seguintes concentrações: Gesapax 500 - 0 (controle), 20,00, 31,62, 50,00, 57,23, 65,52 e 75,00 mg/L; Velpar K - 0, 19,36, 25,00, 29,73, 35,35, 42,04 e 50,00 mg/L. Os embriões (n = 384) foram distribuídos individualmente em placas de poliestireno não estéril de

24 poços, contendo 2 mL de solução-teste e os ensaios, conduzidos em triplicata. Os embriões foram observados diariamente com auxílio de microscópio Eclipse E200, Nikon (aumento de 40x). Segundo o protocolo do teste FET, quatro *endpoints* devem ser avaliados como indicadores de letalidade aguda em peixe: 1) coagulação dos ovos fertilizados; 2) ausência da formação de somitos; 3) falta de separação entre a cauda e o saco vitelínico e, finalmente, a ausência de batimentos cardíacos.

Figura 1. Esquema do procedimento adotado no teste FET com paulistinha (*Danio rerio*) (da esquerda para a direita): produção, coleta e lavagem de ovos, seleção de ovos fertilizados com auxílio de microscópio binocular e distribuição em placas de 24-poços preparadas com as respectivas soluções teste / controle. n = número de ovos necessários / concentração



Fonte: Adaptado de OECD, 2013.

Adultos

Os ensaios foram realizados com os herbicidas Velpar e Ametrina, individualmente, baseados no protocolo OECD 203 (1992), com duração de 96 horas. Os peixes foram estocados em aquários com volume útil de 2,0 L, com aeração forçada e a taxa de estocagem variando de 1,89 – 2,0 g/L. As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizada (temperatura de 27,0 ±

2 °C, em ciclo de foto período claro / escuro de 16:08 horas).

Os peixes não foram alimentados durante os ensaios, sendo estocados no mínimo 10 peixes por concentração. As concentrações testadas do herbicida Gesapax 500 foram: 0 (controle); 2; 3,56; 6,32; 11,25 e 20 mg/L e do herbicida Velpar K, foram: 0; 12,9; 40,79; 72,54; 96,72 e 129 mg/L. Foram registradas informações a respeito da mortalidade e comportamento dos peixes.

Testes em mistura

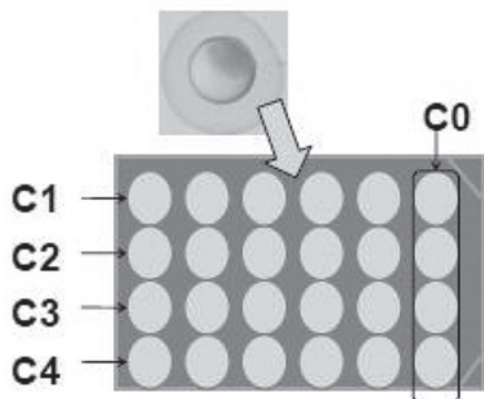
Os dados de mortalidade obtidos nos testes individuais em 96 horas de exposição foram lançados na planilha ToxCalc (desenvolvida no software Microsoft Excel, pelo Prof. Dr. António Nogueira, Universidade de Aveiro, Portugal), obtendo-se as concentrações a serem testadas no teste de mistura (Tabela 1). Foi empregado um desenho fatorial com 6 x 6 tratamentos, em triplicata. A concentração mais alta deve resultar preferencialmente em 100% de mortalidade e, a mais baixa, deve fornecer efeito não observado.

Tabela 1. Concentrações dos herbicidas Gesapax 500 (G) e Velpar K (V) empregados em mistura no teste FET com paulistinha (*Danio rerio*)

Gesapax 500 (mg/L)	Velpar K (mg/L)
0 (G0)	0 (V0)
21,22 (G1)	15,21 (V1)
29,52 (G2)	21,17 (V2)
41,08 (G3)	29,46 (V3)
57,17 (G4)	40,99 (V4)
79,56 (G5)	57,04 (V5)

No ensaio de mistura, os embriões (n = 452) foram distribuídos nas unidades experimentais conforme descrito nos testes individuais. Em 20 poços foram colocadas soluções-teste e, nos quatro poços restantes, apenas água, correspondendo ao controle interno. Cada poço recebeu 2 mL de solução-teste, sendo que 1 mL correspondia ao tratamento Velpar K e 1 mL, ao Gesapax 500 (Figura 2).

Figura 2. Esquema da distribuição dos embriões nos testes de toxicidade aguda de mistura



A CL_{50-96h} de cada componente da mistura foi calculada com o auxílio da planilha ToxCalc e a avaliação dos demais parâmetros, pelo módulo "One Way ANOVA", contido no pacote estatístico SigmaPlot versão 11.0. O nível de significância será estabelecido como sendo $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste single

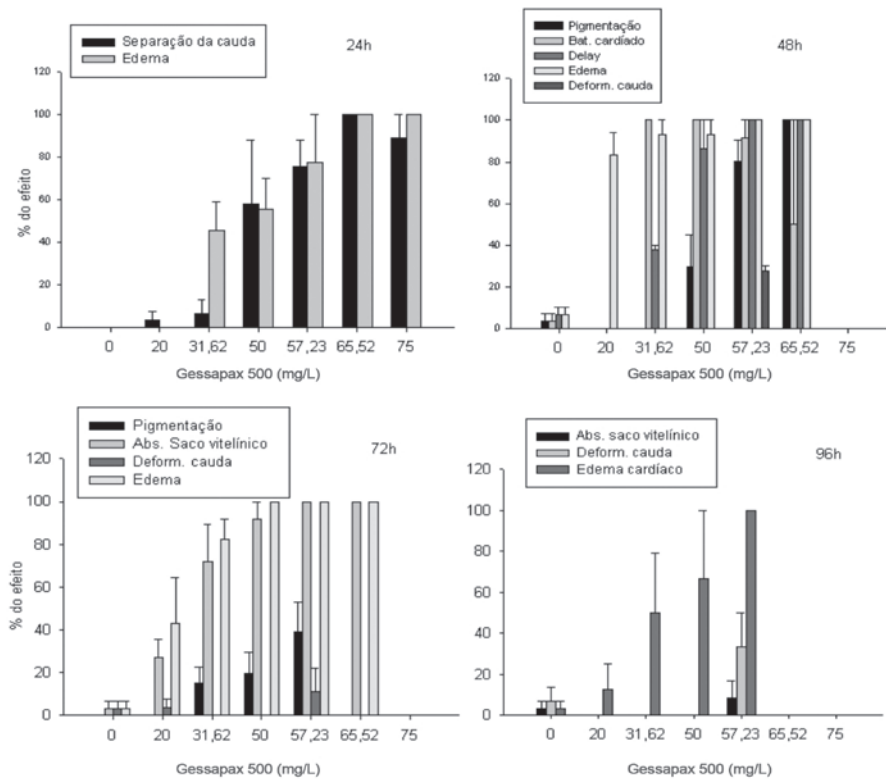
Embriões

A partir dos testes agudos individuais, foi possível determinar a CL_{50-96h} para os peixes expostos ao Gesapax 500 em $53,23 \pm 3,25$ mg/L. Moura, et al¹⁷, trabalhando com o padrão analítico da ametrina (> 98% de pureza) determinaram valores semelhante (CL_{50-96h} $48,46 \pm 2,20$ mg/L) para essa espécie ($p < 0,05$). No caso do Velpar K a CL_{50-96h} foi determinada como $37,45 \pm 1,741$ mg/L. Silva, et al¹³, trabalhando com o *D. rerio* adulto exposto à mistura comercial de diuron + hexazinone de composição similar à testada neste trabalho, obtiveram uma CL_{50-96h} de 581,50 mg/L, mostrando-se menos tóxica a essa fase de desenvolvimento. Segundo Chasin e Azevedo¹⁸ muitos contaminantes apresentam toxicidade maior para indivíduos jovens e sua habilidade em biotransformar e detoxificar as substâncias é menor do que nos adultos, o que pode justificar as diferenças observadas neste trabalho.

Os parâmetros de desenvolvimento embrionário do paulistinha mostraram-se como excelentes indicadores da toxicidade dos herbicidas testados. Nas Figuras 3 e 4 observam-se os *endpoints* avaliados e as doses dos herbicidas que podem causar efeito adverso. Em ambos os casos, observa-se que os *endpoints* mais encontrados durante os ensaios agudos foram edema, *delay* (atraso no desenvolvimento), atraso na absorção do saco vitelínico e deformidade da cauda. A partir de 20 mg/L dos dois herbicidas, houve mais de 90% de ocorrência de deformidades na coluna vertebral.

Neste trabalho, observou-se apenas nas primeiras 24 horas a ausência de separação da cauda; a diminuição de frequência cardíaca foi mais observada no final dos testes. Os demais *endpoints* citados no protocolo do teste FET não foram observados.

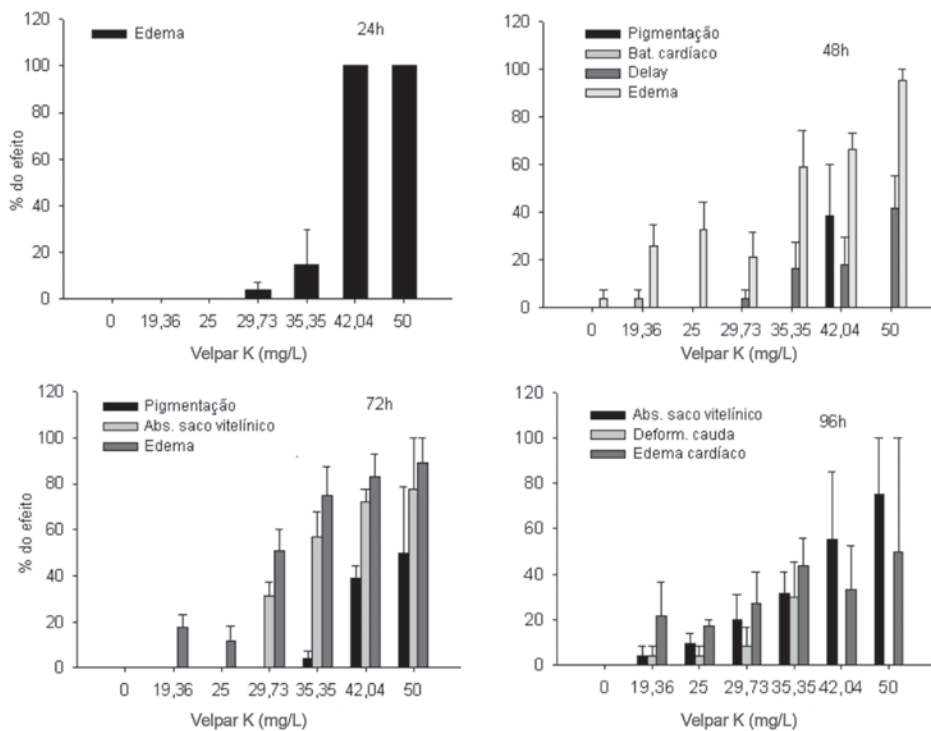
Figura 3. Endpoints observados em embriões de paulistinha expostos ao Gesapax 500



Moura, et al¹¹, também observaram que embriões de paulistinha expostos à ametrina (padrão analítico com > 98% de pureza) por 96h apre-

sentaram *delay*, atraso na absorção do saco vitelínico e presença de edemas pericárdicos, quando submetidos a concentrações $\geq 16,8$ mg/L.

Figura 4. Endpoints observados em embriões de paulistinha expostos ao Velpar K



Nas Figuras 5 e 6 observam-se os efeitos dos herbicidas no desenvolvimento embrionário. O Gesapax 500 mostrou-se mais tóxico que o Velpar K, pois no tratamento 20 mg/L de Gesapax

500 houve cerca de 42% de eclosão em 96h de exposição. Enquanto que, no teste com o Velpar K, no tratamento 19,36 mg/L houve cerca de 78% de eclosão.

Figura 5. Efeito do Gesapax 500 no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*

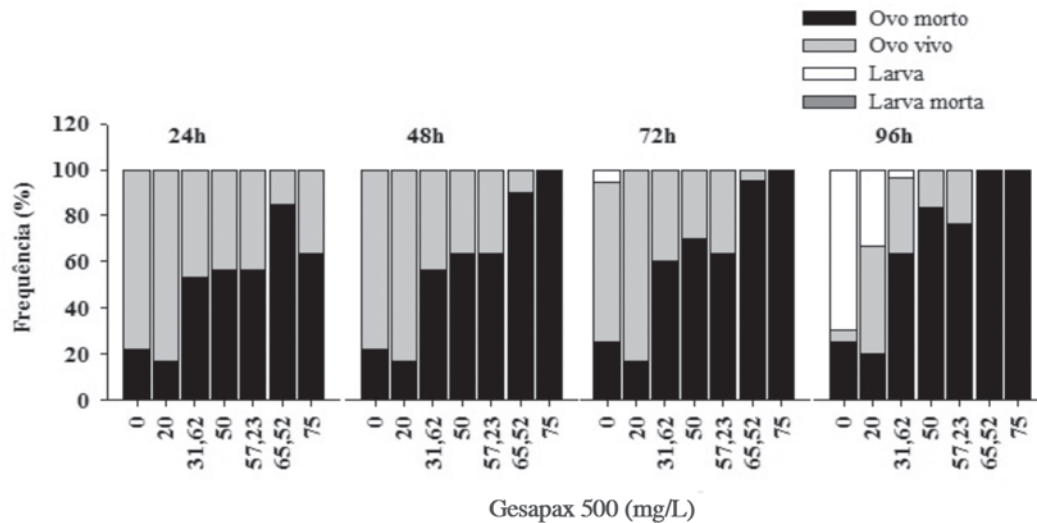
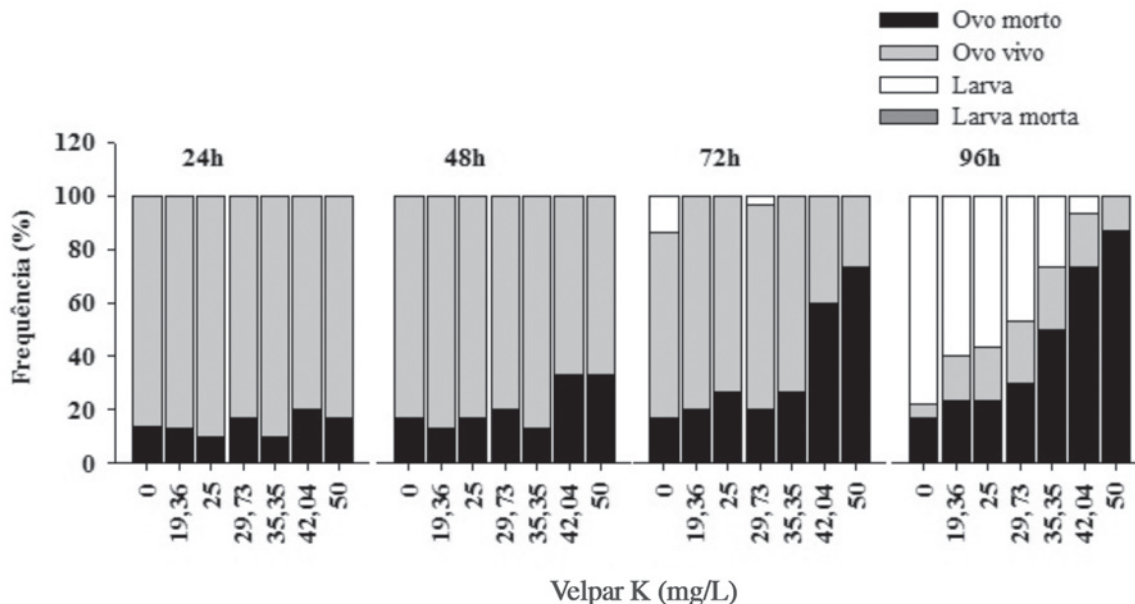


Figura 6. Efeito do Velpar K no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*



Adultos

Em relação à mortalidade, a CL_{50-96h} para o adulto de paulistinha exposto ao Gesapax 500 foi determinada em $11,68 \pm 14,18$ mg/L (erro padrão) e para o Velpar K, em $50,41 \pm 10,17$ mg/L. Não foi observada diferença significativa entre trata-

mentos tanto no caso do Gesapax 500 (Kruskal Wallis $H = 13,297$, $P = 0,021$), como para o Velpar K (Kruskal Wallis $H = 10,738$, $P = 0,057$).

Em relação ao comportamento, a partir das concentrações mais baixas testadas (2 mg/L de Gesapax 500 e 10 mg/L para o Velpar K) todos os

peixes apresentaram distúrbios, permanecendo no fundo dos aquários, com períodos de natação errática e perda de equilíbrio, intercalados com períodos de paralisia, porém ainda reagindo a estímulos mecânicos. A exposição de peixes a pesticidas, mesmo em concentrações subletais, pode levar a um aumento na lesão de células cerebrais, disfunção neuromotora e diminuição de motilidade. Peixes expostos a herbicidas como glifosato e di-tiopiridina apresentaram redução de atividade bioquímica, principalmente da enzima colinesterase (ChE), resultando em alterações comportamentais e hiperestimulação muscular, que pode causar tetania, paralisia, interrupção da respiração e morte¹⁹.

O acará (*Geophagus brasiliensis*) exposto ao herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), um pesticida comumente empregado em pastagens e no controle de macrófitas aquáticas, apresentou uma redução significativa na estabilidade da membrana lisossômica (Teste do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro – TRVN) (> 10 mg/L) e no consumo de oxigênio dissolvido na água e um aumento da excreção de amônia (> 25 mg/L), provavelmente relacionados ao acúmulo e metabolização do contaminante no lisossomo e outras alterações metabólicas. Quando exposto a concentrações ainda maiores (80 mg/L), o que se observou foi a destruição dos filamentos branquiais e morte dos peixes²⁰.

A exposição de tilápia do Nilo ao Folidol 600, um inseticida organofosforado cujo princípio ativo é o paration metílico e que é usado nos tanques de aquicultura para eliminação de larvas de insetos predadores, promoveu não somente uma redução significativa no consumo de oxigênio dissolvido na água ($> 1,0$ mg/L) e aumento da excreção de amônia ($> 0,1$ mg/L), mas também um aumento de parâmetros hematológicos (hematócrito e concentração de hemoglobina) e uma inibição da atividade das colinesterases (AChE, BChE e PChE) ($> 0,1$ mg/L), conforme o aumento da concentração e do tempo de exposição. Novamente, é apontada como causa possível dessas alterações a lesão do tecido branquial e, também, a perda de habilidade na manutenção da homeostase. Tanto em baixas quanto altas concentrações do pesticida, a atividade das colinesterases foi inibida, o que pode refletir uma tentativa de compensação dos peixes para continuarem vivos²¹.

Teste em mistura

A partir dos ensaios agudos com a mistura dos herbicidas, foi determinada uma CL_{50-96h} de 34,880 \pm 5,324 mg/L para o Gesapax 500 e de 32,103 \pm 3,216 mg/L para o Velpar K. Quando em mistura, tanto o Gesapax 500 quanto o Velpar k tornam-se mais tóxico para o paulistinha, quando comparado com a exposição individual a cada componente da mistura (houve sobreposição dos intervalos de confiança) ($p < 0,05$).

Em relação à mortalidade, o modelo da mistura que melhor descreve a relação entre os dois componentes é a ação independente, ou seja, Gesapax 500 e Velpar K quando em conjunto, apesar de sua ação dissimilar, interagem levando a *endpoints* toxicológicos semelhantes. A toxicidade dessa mistura é dose-dependente, sendo que em baixas doses ocorre antagonismo, mas em altas doses o que se observa é o sinergismo entre seus componentes. Segundo o modelo ajustado pelo ToxCalc, o Gesapax 500 é o componente responsável pelo sinergismo nessa mistura, ou seja, é o herbicida que promove uma ação de maior toxicidade quando os dois componentes agem em conjunto sobre o paulistinha.

Na Tabela 2 podem ser observadas as CE_{50-96h} para os *endpoints* determinados. Mais uma vez, esses mostraram-se como excelentes indicadores da toxicidade dos herbicidas. Dos *endpoints* estabelecidos no protocolo do teste FET, observou-se nas primeiras 24 horas apenas a ausência de separação da cauda e, a partir de 72 horas, a diminuição de frequência cardíaca. Na Figura 7 encontram-se os demais *endpoints* observados no ensaio em mistura. Edemas, *delay*, atraso na absorção do saco vitelínico e deformidade da cauda foram os mais frequentemente observados.

Quando se analisa os *endpoints* absorção do saco vitelínico, atraso da frequência de batimentos cardíacos e *delay* observa-se que a toxicidade dessa mistura é dose-dependente, ocorrendo antagonismo entre os componentes. Os valores de CE_{50-96h} para absorção e *delay* para os peixes expostos ao Gesapax 500 são bastante inferiores quando comparados ao Velpar K, demonstrando novamente que o Gesapax 500 é o componente mais tóxico dessa mistura. No caso do batimento cardíaco observou-se uma toxicidade semelhante entre os componentes da mistura (valores próximos de CE_{50-96h}). Em relação ao edema pericárdico os valores de CE_{50-96h} foram semelhantes entre os dois compostos, mas ao

contrário do observado em relação aos *endpoints* citados acima, ocorreu sinergismo entre os componentes da mistura, ou seja, quando em conjunto estes apresentam ação mais tóxica sobre o paulistinha. Esse *endpoint* foi o mais determinado entre todos os tratamentos.

Scheil, et al²², avaliaram o efeito do 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), um produto de degradação do herbicida diuron, entre outros pesticidas, sobre as fases iniciais de desenvolvimento do paulistinha. Os autores expuseram os ovos às seguintes concentrações: 0,5, 0,7, 1, 1,5 e 2 mg/L de 3,4-DCA por um período de quatro dias (96h) e 0,005, 0,01, 0,1, 0,25, 0,5 e 1 mg/L de 3,4-DCA por 11 dias. A partir de 1 mg/L de 3,4-DCA foi observado um aumento significativo de edemas na cabeça e em torno do saco vitelínico (96h). Quando a exposição foi prolongada, as deformidades já eram observadas a partir de 0,5 e 1 mg/L (cinco e quatro dias de exposição) e > 0,25 mg/L de 3,4-DCA (> 9 dias). Entre as principais deformidades observadas pelos autores, 98,3% corresponderam a edemas e 65,7% à deformidade da coluna vertebral. A CL_{50-11dias} foi determinada em 0,388 mg/L 3,4-DCA.

O edema tem sido uma das malformações mais observadas nos testes de toxicidade com *D. rerio*. Hallare, et al²³, avaliaram a efeito combinado de temperatura e cádmio sobre o desenvolvimento do *D. rerio*, sendo o edema a malformação mais proeminente encontrada. Segundo esses autores, o edema também pode ocorrer em exposição a poluentes orgânicos e deve-se à disfunção cardíaca, funcionando como indicador de disrupção osmótica ou metabólica.

Scheil, et al²², também avaliaram o efeito do 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) em mistura com o inseticida Diazinon sobre larvas do paulistinha (11 d), determinando como modelo que melhor descreve a mistura a adição de concentrações, quando os *endpoints* avaliados foram locomoção, taxa de deformação e mortalidade. Em relação à mortalidade, esses dados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, em que foi determinada a adição de concentrações entre Gesapax 500 e Velpar K.

Em relação aos compostos individuais, as primeiras alterações foram observadas em paulistinhas expostos a 20 e 25 mg/L de Gesapax 500 e Velpar K, respectivamente. Quando em mistura, os herbicidas promoveram alterações em concentrações ainda mais baixas (V1 = 15,21 mg/L). Ambas CEO (Concentrações de Efeito Observado) são superiores àquelas observadas por outros autores em trabalhos de quantificação em ambientes naturais (ex. 0,7 a 2,9 µg/L para ametrina e 0,3 a 0,5 µg/L para a hexazinone)⁶. Apesar disso, essas substâncias são solúveis em água e sua entrada no ambiente aquático pode ocorrer em pulsos com uma concentração mais elevada (lixiviação). A exposição crônica em baixas concentrações também pode levar a efeitos similares aos observados em exposições agudas em altas concentrações desses herbicidas. Desse modo, os resultados obtidos neste trabalho devem ser levados em consideração quando se pensa principalmente na exposição das comunidades aquáticas em ambientes naturais.

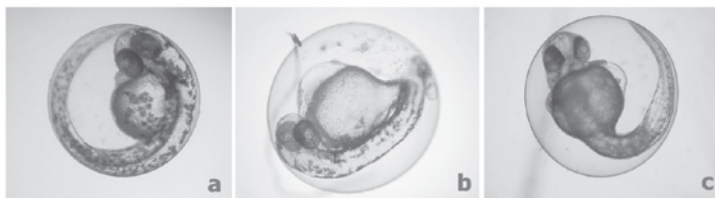
Tabela 2. Modelos ajustados para *endpoints* determinados durante Teste FET com embriões de *Danio rerio* expostos aos herbicidas Gesapax 500 e Velpar K, em exposição individual e sua mistura binária, em 96 horas

Teste	Endpoints	Parâmetros						Modelo ^d	Efeito de Inibição
		Gesapax 500 (mg/L)			Velpar K (mg/L)				
		CENO ^a	CEO ^b	CE ₅₀ ^c (IC 95%)	CENO ^a	CEO ^b	CE ₅₀ ^c (IC 95%)		
Single	Mortalidade			53,231 (3,248)			38,299 (2,571)		
	Edema	-	> 32		-	> 25			
	Abs. Saco ^e	50	57		-	> 25			
	Def. cauda ^f	50	57		-	> 25			
Mistura	Mortalidade			34,880 (5,354)			32,103 (3,216)	A.I. ⁱ Antagonismo em ↓ dose e sinergismo em ↑ dose	
	Edema	-	> 21,22	24,200 (23,927)	-	> 15,21	22,802 (8,415)	A.I. ⁱ Sinergismo	
	Abs. Saco ^e	-	> 21,22	6,665 (-)	15,21	> 21,17	22,309 (-)	A.I. ⁱ Antagonismo	
	Bat. Card ^g	-	> 21,22	31,446 (4,708)	15,21	> 29,46	26,338 (-)	A.I. ⁱ Antagonismo	
	Delay ^h	-	> 21,22	1,678 (-)	-	> 15,21	19,096 (5,447)	A.C. ^j Antagonismo	

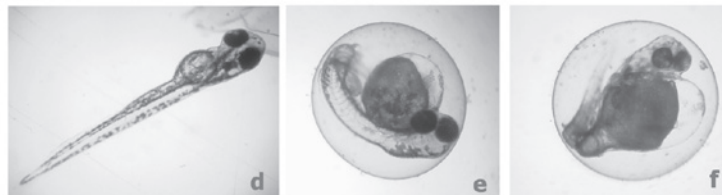
a. Concentração de Efeito Não Observado; b. Concentração de Efeito Observado = a menor das concentrações testadas em que se verificam alterações; c. Concentração efetiva a 50% dos indivíduos expostos (Intervalo de Confiança a 95%); d. Modelo que melhor descreve a mistura; e. Absorção do saco vitelínico; f. Deformidade da cauda; g. Diminuição da frequência de batimentos cardíacos; h. Atraso geral no desenvolvimento; i. Ação Independente; j. Adição de concentrações; ↓baixa; ↑alta; “-” não determinado.

Figura 7. Anomalias em embriões / larvas de paulistinha expostos a mistura dos herbicidas (Gesapax 500 + Velpar K), no aumento de 40x

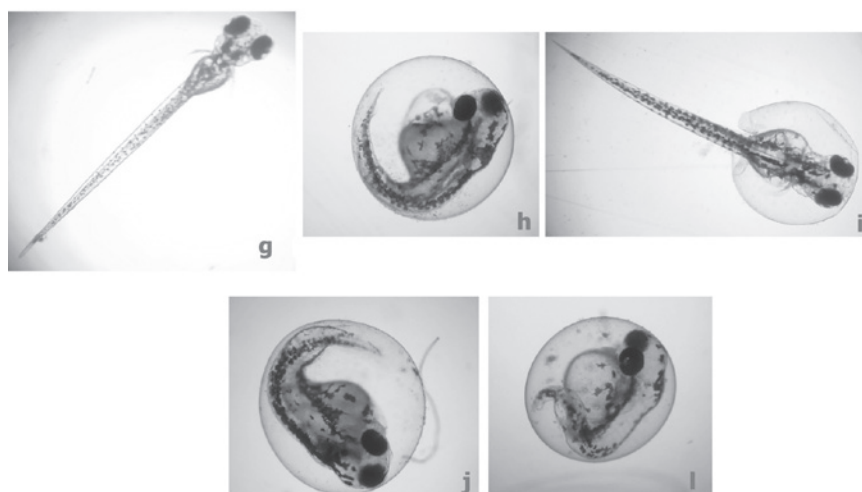
48 horas



72 horas



96 horas



a. controle; b. G1 + V0: edema e falta de pigmentação; c. G3 + V2: edema e atraso na absorção do saco vitelínico; d. controle; e. G3 + V2: edema e atraso na absorção do saco vitelínico; f. G4 + V4: edema e delay; g. controle; h. G1 + V3: edema pericárdico, atraso na absorção do saco vitelínico e delay; i. G2 + V1: edema; j. G2 + V1: delay e deformidade da cauda e l. G4 + V1: atraso na absorção do saco vitelínico, deformidade da cauda e delay.

Em relação à taxa de eclosão dos ovos, observou-se um atraso nos tratamentos com Gesapax 500: 25% no tratamento G1V0 (21,22 mg/L) e, nas misturas - 41,7% em G1V1 (21,22 mg/L Gesapax 500 x 12,21 mg/L de Velpar K) e 23% em G1V2 (21,22 mg/L de Gesapax 500 x 21,17 mg/L de Velpar K). Esses valores foram inferiores aos observados quando os embriões foram expostos ao Velpar K isoladamente (54,17% em G0V1 e 50% em G0V2). Nos demais tratamentos não houve eclosão dos ovos.

Analisando-se esses dados, observou-se haver diferença significativa entre os tratamentos (Kruskal–Wallis One Way ANOVA on Ranks, $H =$

41,166, $P = 0,005$), porém não foi possível isolar os tratamentos que diferiram do controle (86% de eclosão), usando um procedimento de múltiplas comparações (Método Dunn, $p < 0,05$). Tampouco foi possível determinar-se a CE_{50-96h} para a eclosão dos ovos pelo ToxCalc. Mas, analisando-se esse *endpoint*, novamente fica evidente que o Gesapax 500 é mais tóxico para essa espécie, dada a menor taxa de eclosão observada mesmo na concentração mais baixa utilizada.

Padilla, et al²⁴, também observaram que os herbicidas ametrina e diuron (na concentração de 80 mM, equivalente a 12,97 mg/L) são tóxicos para embriões / larvas de *Danio rerio*. Segundo os

autores, esses dois compostos apresentam uma transição gradual entre não-efeito e letalidade, sendo que as concentrações intermediárias a esses dois eventos produzem malformações significativas e/ou atraso na eclosão dos ovos. Em relação à hexazinone, componente do Velpar K, esta não apresenta toxicidade para o paulistinha, o que nos leva a concluir que o diuron é o componente mais tóxico do Velpar K para essa espécie. Futuros trabalhos devem contemplar a avaliação do efeito desses herbicidas para espécies nativas, a fim de confirmar a adequação do paulistinha como modelo para estudos de avaliação de risco em condições brasileiras.

Os resultados aqui apresentados foram úteis em demonstrar a adequação do *Danio rerio* para estudos do efeito combinado de herbicidas em ambientes aquáticos continentais. Futuros estudos devem avaliar os efeitos agudos e subletais desses herbicidas para outras espécies, incluindo-se as nativas, em diferentes níveis tróficos e biológicos, como as alterações histológicas e bioquímicas decorrentes dessa exposição. Espera-se que este estudo auxilie no estabelecimento de concentrações máximas permissíveis dos herbicidas ametrina, diuron e hexazinona nos mananciais de água doce, com vistas à preservação de sua biota aquática associada.

CONCLUSÃO

Ao contrário do que se observou nos ensaios individuais, quando em mistura, o Gesapax 500 é

mais tóxico, apresentando uma CL_{50-96h} menor em relação ao Velpar K.

Os *endpoints* avaliados foram úteis para demonstrar o efeito destes herbicidas como contaminantes ambientais.

Dada a capacidade de transporte dos herbicidas no ambiente aquático, conclui-se ainda, que estes podem representar um risco aos diferentes níveis tróficos, mesmo longe das áreas de cultivo de cana-de-açúcar.

Para a maior parte dos *endpoints* avaliados observou-se haver ação independente entre Gesapax 500 e Velpar K, havendo mais frequentemente antagonismo entre os componentes da mistura. No caso da mortalidade e da ocorrência de edemas, observou-se o sinergismo entre esses herbicidas, ou seja, quando presentes no ambiente, Gesapax 500 e Velpar K apresentam uma efeito mais tóxico para o paulistinha.

Ambas as substâncias, bem como sua mistura binária, levaram a severas alterações em embriões e larvas de *Danio rerio*.

A abordagem em vários níveis foi efetivamente empregada para demonstrar que diferentes *endpoints* podem reagir em diferentes níveis de sensibilidade, dependendo do xenobiótico.

Ainda que as alterações observadas não levem à mortalidade nas concentrações mais baixas, podem comprometer a capacidade de alimentação, fuga à predação e reprodução dos peixes, o que, em longo prazo, pode colocar em risco a manutenção das comunidades aquáticas.

REFERÊNCIAS

1. Piacente FJ. Agroindústria Canavieira e o Sistema de Gestão Ambiental: o caso das usinas localizadas nas Bacias Hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá [Internet]. Campinas: UNICAMP; 2005 [acesso 22 Jul 2012]. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000386200>
2. IEA. Instituto de Economia Agrícola. Área e produção dos principais produtos da agropecuária do Estado de São Paulo [Internet]. São Paulo: IEA; 2012 [acesso 20 Abr 2011]. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>
3. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 518 de 25/03/2004 [Internet]. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade [acesso 22 Nov 2007]. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>
4. Buratini SV, Brandelli A. Bioacumulação. In: Zagatto PA, Bertoletti E, editores. Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações. São Paulo: RIMA; 2006. p. 55-88.
5. Moura MAM, Franco DAS, Matallo MB. Impacto de Herbicidas sobre os Recursos Hídricos. Tecnol Inovação Agropecuária APTA. 2008;1(1):142-51.
6. Armas ED, Monteiro RTR, Antunes PM, Santos MAPF, Camargo PB, Abakerli RB. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. Quím Nova. 2007;30(5):1119-27. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000500013>

7. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005 [Internet]. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento [acesso 22 Nov 2007]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>
8. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(3):865-72.
9. Macek KJ. Acute toxicity of pesticide mixtures to bluegills. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1975;14(6):648-52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01685237>
10. Marking LL. Toxicity of chemical mixtures. In: Rand GM, Petrocelli SR, editors. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application*. Washington (DC): Hemisphere Publishing Corporation; 1985. p. 164-76.
11. Moura MAM, Domingues I, Oliveira R, Jonsson CM, Nogueira AJA. Toxicity of the sugar cane herbicides diuron and tebuthiuron in zebrafish (*Danio rerio*) early-life stages. In: SETAC Europe Annual Meeting. Milão: SETAC; 2011. p. 176.
12. Lopes RS, Lopes FRAS, Maranhão LA, Lopes RB, Tornisielo VL. Avaliação da toxicidade da ametrina e atrazina sobre *Danio rerio* (paulistinha). In: 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP [Internet]. 2004 [acesso 01 Ago 2013];102(06). Disponível em: <https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoObter?numeroInscricaoTrabalho=2371&numeroEdicao=12&print=S>
13. Silva BM, Ravaneli MAC, Paschoalato CFPR. Toxicidade Aguda dos Herbicidas Diuron e Hexazinona à *Danio rerio*. *Pesticidas Rev Ecotoxicol Meio Ambiente*. 2010;20(1):17-28.
14. USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Toxicology Handbook*. Washington (DC): Government Institutes Inc; 1989.
15. Zorzetto R, Guimarães M. Um peixe modelo. *Rev Pesquisa FAPESP* [Internet]. 2013 [acesso 8 Out 2013]. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2013/07/016-021_CAPA_cobaias_209.pdf
16. OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test [Internet]. 2006 [cited 2010 Apr 22]. Available from: <http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf>
17. Moura MAM, Domingues I, Oliveira R, Medeiros KR, Jonsson CM, Nogueira AJA. Effects of ametryn sugarcane herbicide on early-life stages and adults of a tropicalfish (*Danio rerio*). *Proceedings of the 6th SETAC World Congress/SETAC Europe 22nd Annual Meeting; 2012 May 20-24; Berlin, Germany*. Milão: SETAC; 2012. p. 459-60.
18. Chasin AAM, Azevedo FA. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: Azevedo FA, Chasin AAM, coordenadores. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos (SP): Rima; 2003. p. 127-65.
19. Morsy GM. Bioaccumulation and neurotoxicity of dithiopyridine herbicide in the brain of freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Toxicol Ind Health*. 2013;1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0748233713487248>
20. Barbieri E. Effect of 2,4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). *Ecotoxicology*. 2008;18(1):55-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0256-3>
21. Barbieri E, Ferreira LAA. Effects of the Organophosphate Pesticide Folidol 600® on the Freshwater Fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pestic Biochem Physiol*. 2011;99(3):209-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.09.002>
22. Scheil V, Kienle C, Osterauer R, Gerhardt A, Köhler HR. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicology*. 2008;18(3):355-63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0291-0>
23. Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Köhler HR, Tribskorn R. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Therm Biol*. 2005;30(1):7-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>
24. Padilla S, Corum D, Padnos B, Hunter DL, Beam A, Houck KA, et al. Zebrafish developmental screening of the ToxCast Phase I chemical library. *Reprod Toxicol*. 2012;33(2):174-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.10.018>