



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

PATRICIA MARA CUPERTINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

ERECHIM

2017

PATRICIA MARA CUPERTINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS –
Campus de Erechim, como parte das exigências para
obtenção do título de bacharela, na área de Engenharia
Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Funghetto Fuzinatto

ERECHIM

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Cupertini, Patricia Mara
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO FUNGICIDA
TEBUCONAZOLE UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna*/
Patricia Mara Cupertini. -- 2017.
38 f.:il.

Orientadora: Cristiane Funghetto Fuzinatto.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia Ambiental e Sanitária , Erechim, RS , 2017.

1. Toxicidade aguda. 2. *Daphnia magna*. 3.
Multigerações. 4. Tebuconazole. I. Fuzinatto, Cristiane
Funghetto, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

PATRICIA MARA CUPERTINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS - Campus de Erechim, como parte das exigências para obtenção do título de bacharela, na área de Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristiane Funghetto Fuzinatto
UFFS – Erechim

Prof. Dr. Paulo Hartmann
UFFS – Erechim

Prof. Me. Marlon Luiz Neves da Silva
UFFS – Chapecó

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar durante toda esta caminhada, me dando forças para permanecer mesmo durante os maiores obstáculos.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Funghetto Fuzinato, minha orientadora, pelos conhecimentos repassados, dedicação e orientação para a concretização deste trabalho.

Aos meus pais Claudete e Valdecir Cupertini e minha irmã Lais, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio, carinho e afeto sempre prestados.

À equipe de trabalho do laboratório: Ana Flávia, Andressa B., Andressa Z., Vanessa e especialmente a minha grande amiga e companheira de testes Leila Cristina Bugs.

Aos membros da banca aos Professores Marlon e Paulo pela presença e pelas contribuições.

À Universidade Federal da Fronteira Sul, bem como todos os professores e funcionários.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, meu muito obrigado.

RESUMO

Os agrotóxicos adquiriram ao longo do tempo novas características que os garantem maior solubilidade em água, diminuição na capacidade de adesão e aumento na volatilização. Estes fatores acarretam no fácil carreamento pela água das chuvas podendo atuar como fonte geradora da contaminação das águas superficiais. A toxicologia juntamente com os testes de toxicidade aguda visam auxiliar na avaliação dos efeitos destas substâncias sobre os organismos expostos. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo verificar a toxicidade aguda do fungicida Tebuconazole para três gerações do microcrustáceo *Daphnia magna*. Os neonatos da 1ª geração foram obtidos dos lotes do cultivo, sem exposição a substância. Os testes realizados com a 2ª geração simularam duas condições diferentes: (1) os organismos parentais expostos individualmente em condição crônica e (2) organismos parentais expostos em lotes em condições subagudas. Os neonatos da 3ª geração foram obtidos dos organismos parentais da 2ª geração exposta em condição crônica. Os testes agudos realizados para 1ª geração já indicaram elevada toxicidade, com $CE_{50,48h}$ de 631,4 µg/L. Os resultados dos testes de toxicidade aguda para a 2ª geração demonstraram maior sensibilidade dos organismos em ambas as situações testadas, entretanto com um período maior de acompanhamento foi possível verificar que estes passam a apresentar resistência ao Tebuconazole. Este efeito foi verificado através da comparação da $CE_{50,48h}$ obtida neste período, com os resultados de toxicidade aguda verificados com os primeiros organismos da 2ª geração. Os resultados verificados para a 3ª geração demonstram essa resistência adquirida pelos organismos, sendo que os neonatos provenientes de organismos expostos na concentração de 60 µg/L, apresentaram $CE_{50,48h}$ superior à encontrada para organismos da 1ª geração. Mesmo que os organismos apresentem indícios de adquirir resistência á substancia ao longo do tempo, é necessário que se atente a toxicidade aguda verificada para os mesmos, já que a substância demonstrou ser extremamente tóxica e, portanto, uma potencial causadora de contaminação ambiental, o que compromete a permanência dos organismos no ambiente aquático e consequentemente pode desencadear efeitos sobre o equilíbrio do sistema.

Palavras chave: Toxicidade aguda, *Daphnia magna*, Multigerações, Tebuconazole.

ABSTRACT

The agrochemicals have acquired over time new characteristics that guarantee them greater solubility in water, decrease in the adhesion capacity and increase in the volatilization. These factors lead to the easy transport by rainwater and they can act as a source of surface water contamination. Toxicology together with the acute toxicity tests are intended to help assess the effects of these substances on exposed organisms. Thus, the present study aimed to verify the acute toxicity of the fungicide Tebuconazole to three generations of the microcrustacean *Daphnia magna*. First generation neonates were obtained from the culture lots without exposure to the substance. The tests performed with the second generation were simulated in two different conditions, (1) the parental organisms being individually exposed in chronic condition and (2) exposed in lots under subacute conditions. The third generation neonates were obtained from the parental organisms of the 2nd generation exposed in chronic condition. Acute tests performed for the 1st generation indicated high toxicity, with $EC_{50,48h}$ of 631,4 $\mu\text{g/L}$. The results of the acute toxicity tests for the 2nd generation demonstrated greater sensitivity of the organisms for both situations that were tested. However with a longer period of follow-up it was possible to verify that they are now resistant to Tebuconazole. This effect was verified by comparing $EC_{50,48h}$ obtained in this period, with the results of acute toxicity verified with the first organisms of the 2nd generation. The results verified for the 3rd generation demonstrate this resistance acquired by the organisms, and the neonates from organisms exposed in the concentration of 60 $\mu\text{g/L}$, presented $EC_{50,48h}$ higher than the one found for organisms of the 1st generation. Even if the organisms show signs of acquiring substance resistance over time, it is necessary to observe the acute toxicity verified for them, since the substance has proved to be extremely toxic and, therefore, it can be a potential cause of environmental contamination, which compromises the life of the organisms in the aquatic environment and consequently it can have effects on the balance of the system.

Key words: Acute toxicity, *Daphnia magna*, Multigenerations tests, Tebuconazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem do microcrustáceo <i>D. magna</i>	16
Figura 2 - Teste agudo utilizando o microcrustáceo <i>D. magna</i> com a substância Tebuconazole.	19
Figura 3 - Carta Controle de qualidade do organismo teste e estabelecimento da faixa aceitável, de $CE_{50,24h}$ do Dicromato de Potássio para o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	21
Figura 4 - Carta controle com valores de toxicidade aguda para <i>D. magna</i> ($CE_{50,48h}$) nas diferentes concentrações de exposição ao fungicida Tebuconazole.	23
Figura 5 - Resultado do teste de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) para (G2(1)) da <i>D. magna</i> exposta individualmente (condição crônica).	25
Figura 6 - Resultado do teste de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) da (G2(2)) da <i>D. magna</i> exposta em lotes (condição subaguda).	26
Figura 7 - Resultado do teste de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) para a G3 da <i>D. magna</i> exposta individualmente (condição crônica).	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informações referentes ao fungicida Tebuconazole com ingrediente ativo e inerte, nome comercial e tempo de meia vida.	16
Tabela 2 - Valores médios de $CE_{50,48\text{ h}}$ verificado nos testes de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> com intervalo de confiança (95%).	22
Tabela 3 - Resultado dos testes de toxicidade aguda ($CE_{50,48\text{ h}}$) para o organismo <i>D. magna</i> avaliando as multigerações expostas ao fungicida Tebuconazole.	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1	DETERMINAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE	16
2.2	ORGANISMO TESTE	16
2.3	CULTIVO DO MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i>	17
2.4	TESTE DE SENSIBILIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	17
2.5	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i>	18
2.5.1	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> 1ª geração (G0).....	18
2.5.2	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> 2ª e 3ª geração (G2 e G3).....	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1	TESTE DE SENSIBILIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	21
3.2	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i>	22
3.2.1	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> 1ª geração (G0).....	22
3.2.2	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> 2ª geração (G2).....	24
3.2.3	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> 3ª geração (G3).....	27
3.3	COMPARATIVO DAS MULTIGERAÇÕES DA <i>Daphnia magna</i>	28
4	CONCLUSÃO	30
5	RECOMENDAÇÕES	31
	REFERÊNCIAS	32
	ANEXOS.....	36

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o artigo 2º da Lei Federal nº 7.802, juntamente com o Decreto nº 4.074 que regulamenta os agrotóxicos no Brasil (BRASIL, 1989), os agrotóxicos são definidos como:

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; e substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989, p. 1).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (2010), a diversidade de uso destes produtos provém dos seus diferentes modos de ação, que podem agir contra plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), microrganismos de solo (nematicidas), moluscos (moluscicidas), entre outros. Os fungicidas são empregados para o controle de fungos patogênicos de diversas culturas, porém, quando aplicados no ambiente podem erradicar ou influenciar uma grande diversidade de microrganismos considerados como organismos não-alvo (DA SILVEIRA, 2012).

Em função da sua toxicidade, os agrotóxicos estão distribuídos em quatro classes de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Saúde (MS), (BRASIL, 1992): Classe I – Extremamente tóxicos; Classe II – Altamente tóxicos; Classe III – Medianamente tóxicos; Classe IV - Pouco tóxicos. Também são classificados quanto à periculosidade ambiental pelo IBAMA (BRASIL, 1996): Classe I - Produtos altamente perigosos ao meio ambiente; Classe II - Produtos muito perigosos ao meio ambiente; Classe III - Produtos perigosos ao meio ambiente; Classe IV - Produtos pouco perigosos ao meio ambiente.

Segundo Carneiro *et al.*, (2012), o Brasil se destaca como sendo um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, situação que tem sido correlacionada com a contaminação da água e do solo (MOREIRA *et al.*, 2012). O consumo de agrotóxicos no Brasil tem se expandido rapidamente na última década (aumento de 190%), alcançando níveis superiores aos apresentados pelo mercado global (93%), fator que o fez alcançar o primeiro

lugar no ranking mundial do consumo de agrotóxicos desde o ano de 2008 (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Com o passar dos anos e a evolução tecnológica, os agrotóxicos adquiriram novas características como maior solubilidade em água, diminuição na capacidade de adesão e aumento na volatilização (VEIGA *et al.*, 2006). Fatores estes que implicam no fácil carreamento pela água das chuvas por meio do escoamento superficial, contaminando águas superficiais, ou por meio da lixiviação, conduzindo estes resíduos para dentro do perfil do solo, podendo ocasionar a contaminação do lençol freático (EDWARDS, 1973 *apud* VASCONCELOS, 2014).

O uso indiscriminado dos defensivos agrícolas é apontado como uma importante fonte geradora desta contaminação (BOESTEN *et al.*, 2007), sendo a sua presença intensificada nas últimas décadas, aumentando a preocupação dos diversos segmentos da sociedade em razão de seu potencial risco ambiental e a saúde humana (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Dentre a gama dos agrotóxicos mais comercializados no Brasil, no grupo químico dos triazóis o fungicida Tebuconazole se destaca devido ao seu vasto campo de aplicações (SEHNEM, 2009; ANVISA, 2005). O Tebuconazole ($C_{16}H_{22}ClN_3O$), nome químico ((RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol), está registrado no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2015) sendo portador do nome comercial RIVAL 200 EC. É empregado na agricultura no controle de fungos que incidem sobre as lavouras de cebola, batata, cevada, feijão, maçã, uva e recentemente, em lavouras de soja, bem como no uso como conservante de madeira (SEHNEM, 2009).

De acordo com a ANVISA (2005), o fungicida Tebuconazole é enquadrado na classe toxicológica IV, como pouco tóxico, entretanto a Ficha de Informação de Segurança do Produto Químico (FISPQ) o classifica como classe I - extremamente tóxico (RIVAL, 2001) e em relação ao meio ambiente como classe II - muito perigoso ao meio ambiente (RIVAL, 2001).

O fungicida Tebuconazole vem sendo amplamente utilizado na região sul do Brasil, em virtude da sua eficiente atuação no combate aos organismos alvo garantindo a produtividade econômica, entretanto sua aplicação pode resultar em impactos negativos devido à poluição sobre os recursos hídricos (MATTE, 2013). Para organismos aquáticos pode originar efeitos adversos, em longo prazo (TONI, 2010). Segundo Sehnem (2009), a aplicação dos fungicidas do grupo dos triazóis no solo desencadeia alterações na microbiota, dificultando a ciclagem dos nutrientes.

A Toxicologia surge como a ciência que estuda os impactos nocivos gerados por substâncias químicas sobre os organismos. Entre seus principais objetivos está a identificação dos riscos vinculados à exposição de determinada substância, bem como definir em quais condições de exposição estes riscos são induzidos (ZAKRZEWSKI, 1994; HODGSON, 2004; *apud* COSTA *et al.*, 2008).

O estudo da toxicologia ambiental parte da constatação que (a) a sobrevivência humana está vinculada ao bem estar de outras espécies, bem como à disponibilidade de elementos essenciais como ar puro, água e alimento; e (b) substâncias químicas antropogênicas, assim como as que advêm naturalmente no ambiente podem desencadear efeitos deletérios nos organismos vivos e nos processos ecológicos. O estudo da toxicologia ambiental permite e avaliar com precisão, os resultados de agentes químicos e físicos sobre os organismos vivos, populações e comunidades em seus ecossistemas integrando as formas de transporte dessas substâncias e suas interações com o ambiente (ZAGATTO, 2015).

Dentro da toxicologia ambiental os testes de toxicidade aquática, constituem um importante instrumento na avaliação da poluição do meio aquático. Ainda se apresentam como mecanismos para a compreensão dos efeitos de impactos antropogênicos sobre este compartimento (CAMPAGNA, 2005). Para a avaliação toxicológica são empregados organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). Por meio destes testes, tem sido possível avaliar o efeito de um grande número de produtos, substâncias químicas e misturas ambientais complexas sobre diferentes espécies (CAMPAGNA, 2005).

Segundo Bohrer (1995) *apud* Henrique & Brentano (2010), por meio da realização de testes toxicológicos é possível determinar os efeitos decorrentes das interações de compostos químicos, a determinação das diluições necessárias para diminuir ou prevenir efeitos tóxicos em águas receptoras, a avaliação do impacto nos corpos receptores, bem como a determinação da persistência da toxicidade do composto.

Os testes agudos são realizados com o intuito de determinar a toxicidade relativa de uma amostra sobre o organismo teste aquático selecionado, no qual o mesmo é exposto a diversas concentrações desta amostra, em um curto período de tempo (BRENTANO, 2006). Os resultados destes testes expressam a $CE_{50,48h}$ ou seja, concentração efetiva que causa imobilidade a 50% da população exposta após 48 horas de exposição (PARRISH, 1995 *apud* FUZINATTO, 2009).

Os efeitos avaliados diferem de acordo com o organismo analisado: mortalidade, no caso de peixes; imobilidade e letalidade, no caso de invertebrados; e crescimento, no caso de algas (BRENTANO, 2006).

O emprego de testes de toxicidade para avaliação de efeitos deletérios dos agentes químicos em organismos aquáticos vem sendo cada vez mais imprescindíveis, pois possibilitam a identificação dos produtos que manifestam menores riscos quanto ao impacto ambiental e a toxicidade (SILVA, 2015). A percepção das alterações sendo elas: fisiológicas, comportamentais, de crescimento ou de sobrevivência tanto para um organismo quanto para uma população, são de suma importância. Desta forma os testes, produzem informações a cerca da qualidade deste ambiente ou parte dele e ainda são capazes de indicar a concentração utilizada na qual um determinado produto causará letalidade (SILVA, 2015).

Estes tipos de testes são largamente empregados, pois fornecem uma resposta rápida sofrida pelos organismos expostos à determinada substância. Os mesmos são realizados em um curto período de tempo sobre condições ambientais controladas (PARRISH, 1995 *apud* FUZINATTO, 2009). De acordo com Aragão e Araújo (2006), ainda são de fácil execução, além de apresentarem um baixo custo.

Os testes de toxicidade empregando organismos aquáticos foram padronizados e são desenvolvidos em diversos países (FUZINATTO, 2009). Em nível internacional os testes de toxicidade foram padronizados pela Association Française de Normalisation - AFNOR (França); American Society for Testing and Materials - ASTM (Estados Unidos); American Water Work Association - AWWA (Estados Unidos); International Organization for Standardization - ISO (Estados Unidos); Organization for Economic Co-Operation and Development - OECD (Estados Unidos); Deutsches Institut für Normung - DIN (Alemanha) (SILVA, 2011; KNIE & LOPES, 2004). Sendo a Associação de Normas Técnicas (ABNT), a responsável pela normatização destes testes no Brasil (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

De acordo com Campos *et al.*, (2016), grande parte das diretrizes de testes toxicológicos visa unicamente avaliar os efeitos observados no período de uma geração, menosprezando os efeitos prejudiciais potenciais que podem surgir entre gerações. Os efeitos toxicológicos do contaminante podem diminuir ou aumentar entre as gerações ou até mesmo se manterem inalterados. Entretanto, por vezes o poluente pode afetar tanto os organismos expostos como a sua prole, pois os efeitos adversos são propensos de serem mais prejudiciais nas gerações subsequentes.

Os testes destinados a avaliar os efeitos multigeracionais para mamíferos e peixes já apresentam procedimentos padronizados (NAKAMURA *et al.*, 2015). Porém, não há testes equivalentes para invertebrados, embora os organismos apresentem ciclo de vida curto proporcionando um monitoramento econômico dos efeitos multigeracionais de substâncias tóxicas em indivíduos e populações (OLIVEIRA-FILHO; GRISOLIA; PAUMGARTTEN, 2009).

O microcrustáceo *Daphnia magna* STRAUS (1820), se destaca na seleção como organismo teste para realização de testes toxicológicos devido aos seguintes condicionantes apresentados por (KNIE & LOPES, 2004): facilidade de manutenção e cultivo; geração de prole idêntica; facilidade de manuseio devido ao pequeno porte; simples reprodução e curto período de vida, além de apresentar sensibilidade a diversas substâncias tóxicas. Ainda segundo Knie & Lopes (2004), os organismos do gênero *Daphnia* são amplamente reconhecidos como organismos teste em decorrência da sua vasta utilização em testes laboratoriais, sendo utilizado em diversas partes do mundo, possuindo sua metodologia internacionalmente normatizada (FUZINATTO, 2009).

De acordo a NBR 12.713 (ABNT, 2016) a *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea,) é um microcrustáceo zooplancônico de água doce, popularmente conhecido como “pulga d’água”, possui um comprimento de 0,5 mm na fase jovem e 5 - 6 mm na fase adulta. Na cadeia alimentar aquática atua como consumidor primário, que se alimenta através da filtração de materiais orgânicos particulados em suspensão, especialmente algas unicelulares. A presença deste organismo ocorre naturalmente com mais facilidade no Hemisfério Norte.

A reprodução da *D. magna* é assexuada, realizada por partenogênese, originando populações constituídas inteiramente por fêmeas, em condições ambientalmente adequadas (KNIE & LOPES, 2004). Ainda de acordo com estes autores, condições desfavoráveis no ambiente de cultura interferem na reprodução da *D. magna*, propiciando o aparecimento de machos e consequentemente de efípios. Estes consistem em ovos de resistência produzidos através da reprodução sexuada. A partir do momento em que as condições ambientais se tornam favoráveis novamente, os ovos do efípio eclodem, liberando fêmeas que irão se reproduzir partenogeneticamente (RUPPERT & BARNES, 1996).

A partir do 7º dia de vida a *D. magna* já começa a se reproduzir, inicialmente são originados poucos filhotes por matriz. Com 12 dias cada matriz produz cerca de 30 a 50 neonatos (KNIE & LOPES, 2004). Os machos são facilmente diferenciados das fêmeas, pois são menores, apresentam o corpo mais afinado e nadam mais rapidamente. Além do qual, as

fêmeas se distinguem pela presença da bolsa incubadora, na qual estão contidos os ovos e embriões bem visíveis (KNIE & LOPES, 2004).

De acordo com Clare (2007), as condições ideais do meio de cultura destes organismos abrangem temperatura variando em 20 ± 2 °C, pH entre 6,5 e 9,5 sendo o pH ótimo entre 7,2 e 8,5 e dureza acima de 150 mg/L de CaCO_3 (águas duras).

Ainda segundo Clare (2007), o tempo de vida desse organismo é influenciado pelo fator temperatura. A redução da temperatura no seu meio de cultivo favorece o aumento do seu período de vida, devido à atividade metabólica reduzida. A média de vida de *D. magna* é cerca de 40 dias a 25°C e cerca de 56 dias a 20°C (EPA, 2002).

Portanto, para realização dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* é necessário averiguar algumas condicionantes: tempo de exposição, temperatura, número de indivíduos e oxigênio dissolvido, permitindo deste modo se traçar um critério de avaliação na imobilidade dos organismos expostos (LOMBARDI, 2013). No Brasil, a normatização para o uso do organismo teste *D. magna* na realização dos testes é assegurada pela Associação Brasileira das Normas Técnicas (ABNT) que normatizou seu uso por meio da NBR 12.713 (ABNT, 2016).

Desta forma o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação da toxicidade aguda do fungicida Tebuconazole utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* como organismo teste. Para atingir tal objetivo foi necessária a realização de algumas etapas, tais como: (1) Verificar a toxicidade aguda do Tebuconazole para 1ª geração do microcrustáceo *Daphnia magna* (CE_{50}), utilizando diferentes concentrações do fungicida, durante o período de 48 horas. (2) Avaliar a 2ª geração dos organismos teste *Daphnia magna* mantidos em exposição crônica ao fungicida Tebuconazole. (3) Avaliar a 2ª geração dos organismos teste *Daphnia magna* mantidos em condição subaguda. (4) Verificar a toxicidade aguda para a 3ª geração dos organismos *Daphnia magna* mantidos em exposição crônica ao fungicida Tebuconazole.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DETERMINAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A substância escolhida para realização dos testes foi o fungicida RIVAL 200 EC que tem como princípio ativo o Tebuconazole, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o nº 06203.

Na Tabela 1, estão apresentadas as informações acerca das concentrações de ingrediente ativo e inerte, bem como o tempo de meia vida da substância na água e no solo.

Tabela 1- Informações referentes ao fungicida Tebuconazole com ingrediente ativo e inerte, nome comercial e tempo de meia vida.

Nome Técnico	Nome Comercial	Concentração	Concentração	T _{1/2} (dias)	
		de ingrediente inerte (g.L ⁻¹)	de ingrediente ativo (g.L ⁻¹)	Solo	Água
Tebuconazole	Rival 200 EC	800	200	365	28

T_{1/2} = tempo de meia vida. Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

2.2 ORGANISMO TESTE

Para o desenvolvimento dos testes toxicológicos com o intuito de avaliar os efeitos do fungicida Tebuconazole, o microcrustáceo *D. magna* foi utilizado como organismo teste.

Figura 1- Imagem do microcrustáceo *D. magna*.



Fonte: A autora, 2017.

2.3 CULTIVO DO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

O cultivo e os testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *D. magna* foram realizados no Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim e executados em conformidade com a NBR 12.713 (ABNT, 2016). Para o cultivo, os organismos foram mantidos em béqueres de vidro de 2L cada, os quais permaneceram em incubadora com temperatura controlada de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Cada recipiente foi preenchido com volume aproximado de 1.250 mL de meio de cultura M4, de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2016), onde foram cultivados até 30 indivíduos. O meio M4 (Anexo 1) foi renovado três vezes por semana, sendo os organismos transferidos para o novo meio e alimentados, e o meio antigo foi descartado. A alimentação foi realizada no mesmo dia da troca do meio e o alimento utilizado foi a alga *Scenedesmus subspicatus*, inoculada em meio nutriente preparado no laboratório estando em conformidade com a norma NBR 12.713 (ABNT, 2016).

Na troca, apenas os indivíduos adultos foram transferidos para o novo recipiente, enquanto que os filhotes ou foram descartados em um recipiente com Hipoclorito de Sódio (NaClO) ou reservados para a posterior utilização em testes do laboratório.

2.4 TESTE DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Para validação dos testes de toxicidade aguda com o organismo *D. magna*, foram realizados semanalmente testes de sensibilidade com a substância de referência Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). A sensibilidade consiste em efetuar um teste expondo por 24 horas indivíduos jovens a diluições de uma solução de Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em meio ISO (Anexo 2). A metodologia aplicada a este teste é a mesma do teste agudo, porém as concentrações já são predefinidas, sendo 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3 mg/L. A faixa adequada da sensibilidade para *D. magna* é entre 0,6 e 1,7 mg/L (NBR 12.713, 2016). Os testes de sensibilidade foram aplicados para as três gerações do microcrustáceo avaliadas, sempre utilizando as concentrações pré-definidas de 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3 mg/L da substância de referência.

2.5 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade aguda foram verificados para três gerações da *D. magna*, a fim de avaliar como os organismos se comportariam ao longo de várias gerações expostas a substância: sendo os neonatos oriundos do cultivo (sem exposição) como a 1ª geração (G0), os neonatos provenientes da 1ª geração exposta ao fungicida como a 2ª geração (G2) e os neonatos provenientes da 2ª geração exposta ao fungicida como a 3ª geração (G3). Para obtenção dos neonatos da G2, foram cultivados neonatos oriundos do cultivo em solução ao fungicida a qual foi denominada de (G1).

Os testes de toxicidade aguda para as três gerações avaliadas foram realizados minimamente em triplicata a fim de verificar a homogeneidade dos resultados. A análise estatística dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* foi realizada com o auxílio do software computacional GraphPad Prism versão 6.01. A $CE_{50,48h}$ foi obtida através da análise de regressão não linear entre as concentrações testadas e a porcentagem de organismos imóveis para cada concentração.

2.5.1 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna* 1ª geração (G0)

Para os testes agudos com duração de 48 horas foram expostos um total de 20 indivíduos jovens de *D. magna* da G0 por diluição (duas réplicas de 10 organismos) e, ao final do mesmo, foi verificado quantos organismos se encontravam imóveis em cada diluição.

Cada recipiente que foi utilizado no teste possui capacidade máxima de 50 mL. As diluições inseridas em cada béquer possuem volume máximo de 25 mL. Não ocorreu troca do meio nem alimentação durante a execução dos testes – teste estático. Os testes foram realizados em réplicas e possuíam um teste controle somente com água reconstituída ISO (Anexo 2) capaz de validar o teste. O controle positivo foi realizado com diluições de uma solução de 10 mg de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$).

Para realização dos testes foi preparada a solução mãe de 50.000 µg/L do fungicida e com base em testes preliminares, optou-se por investigar a faixa de concentrações de 130 µg/L a 1.500 µg/L. As concentrações da solução mãe utilizadas no teste agudo para a G0 da substância Tebuconazole foram: 130 µg/L; 250 µg/L; 500 µg/L; 750 µg/L; 1.000 µg/L; 1.250 µg/L e 1.500 µg/L.

Figura 2 - Teste agudo utilizando o microcrustáceo *D. magna* com a substância Tebuconazole.



Fonte: A autora, 2017.

2.5.2 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna* 2ª e 3ª geração (G2 e G3)

A G2 dos organismos da *D. magna* foi avaliada diante de duas situações: Na 1ª situação (G2(1)) os organismos da G1 foram expostos individualmente e sob exposição crônica e a 2ª situação (G2(2)) os organismos da G1 foram expostos em lotes de 20 - 30 organismos sob exposição subaguda.

Os organismos da (G2(1)) foram obtidos da G1, onde foram expostos á substância teste cronicamente em quatro concentrações diferentes (20; 40; 60; 80 µg/L) e mantidos em recipientes individuais. O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando 20 neonatos por diluição separados em réplica A e B, e testados nas mesmas concentrações da G0 de 130; 250; 500 e 750 µg/L de acordo com a concentração que a G1 parental foi exposta. As concentrações 1.000; 1.250 e 1.500 µg/L não puderam ser testadas devido a pouca oferta de filhotes.

Para obter a 2ª situação (G2(2)) a que se pretendeu avaliar, os organismos da G1 foram obtidos do cultivo e mantidos em béqueres de 500 mL com média de 40 neonatos por lote e expostos nas concentrações subagudas do fungicida de 130; 250 e 500 µg/L. Porém, devido as altas concentrações avaliadas e a alta densidade populacional os mesmos não conseguiram se alimentar o que acarretou em mortalidade total dos lotes nos primeiros dias de exposição.

A situação foi repetida, utilizando menores concentrações da substância teste baseadas na $CE_{50,48h}$ da G0, as quais foram definidas como 30 e 60 µg/L e reduzido o número de indivíduos por recipiente. O teste de toxicidade aguda da (G2(2)) foi realizado utilizando 20 neonatos por diluição separados em réplica A e B, e testados nas concentrações 60; 80; 130 e

250 µg/L. Na realização dos testes os organismos foram divididos nos grupos de acordo com a concentração que a G1 parental foi exposta.

O teste agudo para G3 seguiu a mesma metodologia das demais gerações. Os organismos foram testados separadamente de acordo com a concentração crônica a qual a G2 parental foi exposta de 20; 40; 60 µg/L. As concentrações da substância teste utilizadas no teste de toxicidade aguda foram: 130; 250; 500; 750 e 1.000 µg/L.

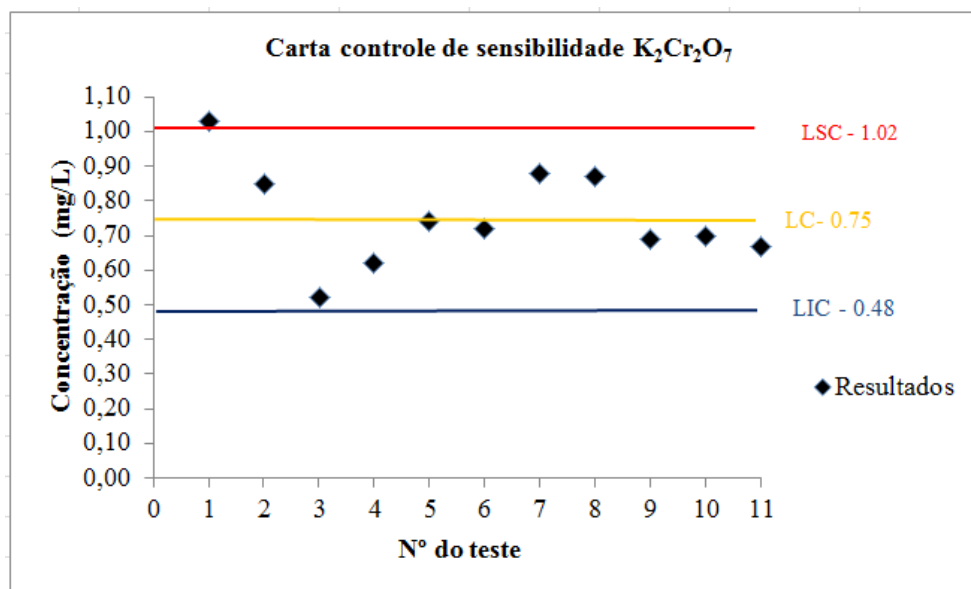
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTE DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Foram realizados onze testes de sensibilidade com organismos teste do cultivo utilizando a substância de referência Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$ - 10 mg/L), intercalados, entre os experimentos com o fungicida. O valor médio obtido para sensibilidade, $CE_{50,24h}$ foi de 0,75 mg/L, com desvio padrão de 0,14 e coeficiente de variação (CV) de 18,9% que se enquadrou dentro do limite do coeficiente de variação de 45% proposto pela USEPA (2002).

Para apresentação dos resultados da sensibilidade foi elaborada uma carta controle. O modelo de carta controle traz os pontos de dispersão que representam os valores de $CE_{50,24h}$ para cada teste, uma linha de limite central (LC), uma linha de limite superior de controle (LSC) que considera a média mais dois desvios padrão e um limite inferior de controle (LIC) que considera a média menos dois desvios padrão. Esses limites são calculados, a fim de que estabeleçam uma faixa onde os valores obtidos tenham validade estatística.

Figura 3 - Carta Controle de qualidade do organismo teste e estabelecimento da faixa aceitável, de $CE_{50,24h}$ do Dicromato de Potássio para o microcrustáceo *Daphnia magna*.



Fonte: A autora, 2017.

Os testes de sensibilidade realizados com os organismos já expostos a substância teste também indicaram que os mesmos estavam aptos e dentro da faixa aceitável para serem utilizados nos testes de toxicidade aguda com $CE_{50,24h}$ média de 0,71 mg/L.

3.2 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

3.2.1 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna* 1ª geração (G0)

Os resultados obtidos de $CE_{50,48h}$ para os testes agudos realizados com o organismo teste *D. magna* para G0 estão apresentados no Tabela 2, juntamente com a média e o desvio padrão.

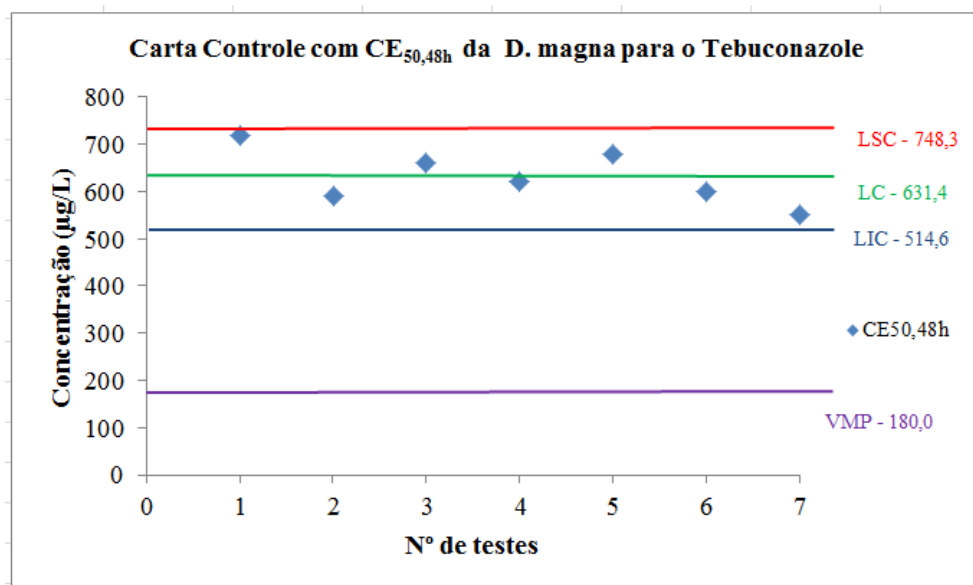
Tabela 2 - Valores médios de $CE_{50,48h}$ verificado nos testes de toxicidade aguda com *D. magna* com intervalo de confiança (95%).

Nº do teste	$CE_{50,48h}$ µg/L	Intervalo de Confiança (95%)
1	720	(610 – 840)
2	590	(460 – 760)
3	660	(540 – 810)
4	620	(520 – 730)
5	680	(600 – 780)
6	600	(510 – 710)
7	550	(460 – 660)
Média = 631,4µg/L		
Desvio Padrão (S)= 58,43		

Fonte: A autora, 2017.

Com os valores de $CE_{50,48h}$ foi elaborada a carta controle apresentada na Figura 4, onde estão delimitadas a LC, LSC, LIC e a linha do valor máximo permitido (VMP) para a substância de acordo com a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

Figura 4 - Carta controle com valores de toxicidade aguda para *D. magna* ($CE_{50,48h}$) nas diferentes concentrações de exposição ao fungicida Tebuconazole.



Fonte: A autora, 2017.

Estudos que avaliaram a toxicidade aguda do fungicida Tebuconazole para o microcrustáceo *D. magna* encontraram resultados de $CE_{50,48h}$ na faixa de 100 – 1.000 $\mu\text{g/L}$ (HOROS, 2012), $CE_{50,48h}$ de 7.300 $\mu\text{g/L}$ (HORIZON, 2015), $CE_{50,48h}$ 2.790 $\mu\text{g/L}$ (LOUSAL, 2015) e $CE_{50,48h}$ 1.410 $\mu\text{g/L}$ para *Daphia similis* (TEBUZIM, 2015). Conforme apresentado na Tabela 2, o valor médio de $CE_{50,48h}$ encontrado para o teste agudo da G0 neste trabalho foi de 631,4 $\mu\text{g/L}$, demonstrando que a substância teste Tebuconazole é extremamente tóxica para o microcrustáceo *D. magna*.

A substância também já foi administrada para outros organismos representativos do ambiente aquático. Toni (2010), avaliou os efeitos sobre carpas (*Cyprinus carpio*), onde obteve uma $CL_{50,96h}$ de 2.370 $\mu\text{g/L}$; Sancho *et al.*, (2009b) testaram a toxicidade sobre o organismo *Danio rerio* obtendo $CL_{50,24h}$ 23.000 $\mu\text{g/L}$ e $CL_{50,48-96h}$ 19.630 $\mu\text{g/L}$.

Estudos desenvolvidos por Sancho *et al.*, (2009a) demonstraram que o Tebuconazole foi moderadamente tóxico para o microcrustáceo *D. magna*, com uma $CE_{50,48h}$ de 40.100 $\mu\text{g/L}$. Entretanto, mesmo com uma toxicidade moderada, o mesmo prejudica gravemente as funções metabólicas, acarretando em alterações nos constituintes bioquímicos da *D. magna* (SANCHO *et al.*, 2009a), bem como acarreta em danos a vida aquática devido a sua subsistência no ambiente, comprometendo a reprodução e a fertilidade para peixes (SANCHO *et al.*, 2009b; YU *et al.*, 2013).

A diferença nos resultados obtidos nesta pesquisa com os obtidos por Sancho *et al.*, (2009a), podem estar condicionados a fatores externos que não foram considerados nesta pesquisa e também as diferentes formulações do fungicida testado. De acordo com Saavedra Barroso (2009), os fatores abióticos exercem influencia na resposta fisiológica, no crescimento, reprodução e nos efeitos toxicológicos desencadeados pela exposição a substância para os organismos aquáticos.

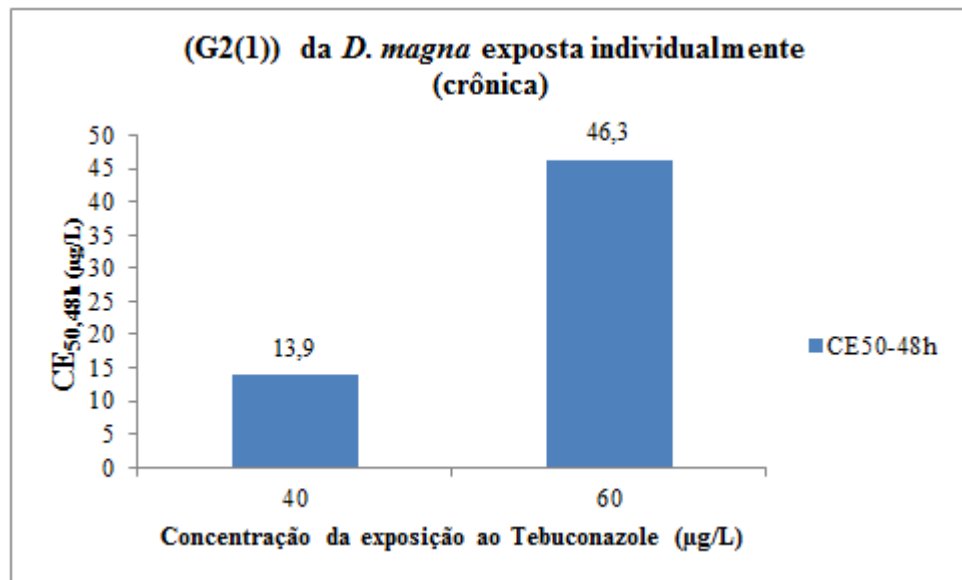
As pesquisas citadas já demonstravam uma toxicidade aguda elevada da substância Tebuconazole para o microcrustáceo *D. magna*, corroborando para os resultados encontrados nesta pesquisa, os quais indicam a toxicidade ainda mais severa do fungicida. Entretanto os resultados obtidos apresentam discordância com o definido pela ANVISA, a qual atribui que a substância apresenta pouca toxicidade, mesmo que a FISPQ do próprio fungicida afirme o contrário. De acordo com Souza (2008), quanto menor for o valor CL_{50} ou CE_{50} encontrado, mais perigoso é o agrotóxico para o ambiente.

Com os resultados de $CE_{50,48h}$ obtidos do teste agudo para organismos da G0, foi realizado um acompanhamento das gerações seguintes a fim de averiguar quais seriam os efeitos multigeracionais causados pela substância teste.

3.2.2 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna* 2ª geração (G2)

Para os organismos provenientes da G1 expostos individualmente e em condições crônica (G2(1)) as concentrações de $CE_{50,48h}$ encontradas para cada diluição estão apresentadas na Figura 5:

Figura 5 - Resultado do teste de toxicidade aguda ($CE_{50, 48h}$) para (G2(1)) da *D. magna* exposta individualmente (condição crônica).

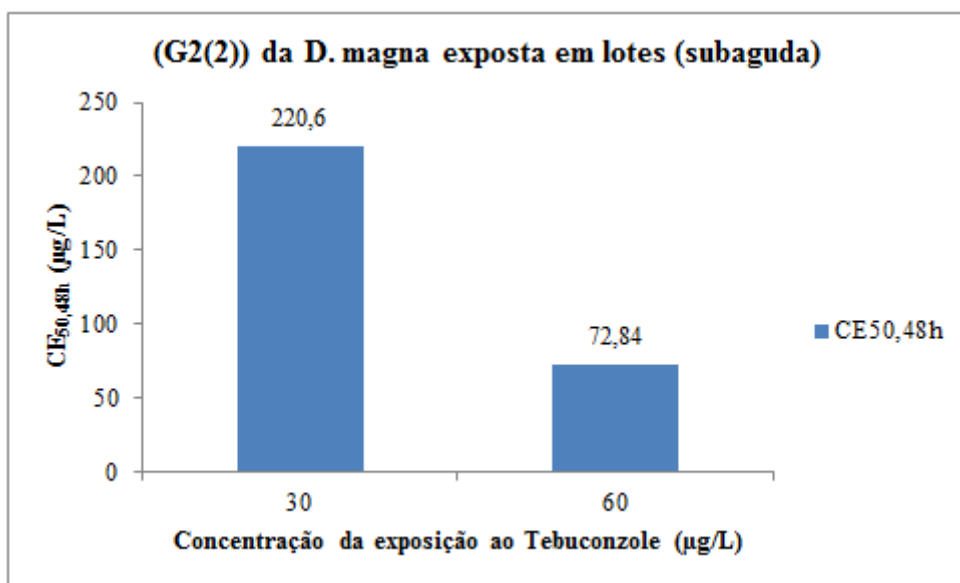


Fonte: A autora, 2017.

Devido a elevada mortalidade dos organismos parentais expostos na concentração de 20 µg/L, a oferta de neonatos foi reduzida, impossibilitando a realização do teste agudo para os neonatos provenientes desta concentração da exposição ao fungicida Tebuconazole.

Para os organismos provenientes da G1 expostos em lotes e em condições subagudas (G2(2)) os valores de $CE_{50,48h}$ encontradas para cada diluição estão apresentados na Figura 6:

Figura 6 - Resultado do teste de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) da (G2(2)) da *D. magna* exposta em lotes (condição subaguda).



Fonte: A autora, 2017.

De modo geral, como pode ser verificado nas Figuras 5 e 6 que os organismos da G2 se mostraram ainda mais sensíveis a substância teste ao serem comparados aos organismos da G0 que nunca haviam sido expostos a nenhum contaminante, com exceção do verificado para os organismos da (G2(2)) expostos na concentração de 30 µg/L. Nesta concentração os organismos apresentaram uma $CE_{50,48h}$ menor do que as demais verificadas para esta geração, demonstrando que com o decorrer do tempo os organismos adquirem uma possível resistência a substância exposta.

Os primeiros testes realizados para (G2(1)) e (G2(2)) demonstravam que os organismos se apresentavam mais sensíveis, ou seja, que a substância causava o mesmo efeito mesmo que os organismos estivessem expostos em condições diferentes. Os resultados, portanto, demonstram estar em conformidade com o encontrado por Campos *et al.*, (2016) ao testar os efeitos tóxicos de três substâncias sobre a 2ª geração da *D. magna*, demonstrando que os efeitos tóxicos foram agravados através das gerações.

Os resultados obtidos para (G2(2)), nos primeiros testes podem ser atribuídos aos estressores que os organismos parentais estiveram expostos. Os mesmos foram mantidos em recipientes com alta densidade populacional, que acarretava em disputa por espaço, alimentação, além de ser um ambiente adverso, o que é evidenciado pelo retardamento no início da postura. Para os organismos da (G2(1)) a média de reprodução parental ocorreu no 13º dia de vida, enquanto que para os organismos da (G2(2)) esta ocorreu no 20º dia de vida.

Miller (1967) *apud* Gergs; Preuss; Palmqvist (2014), salienta que a aglomeração, juntamente com a sobre-exploração de recursos, infere na fecundidade e sobrevivência dos organismos. Essas condicionantes foram testadas com o intuito de simular o ambiente natural, pois no ambiente os organismos disputam alimento e espaço tanto com a própria espécie como com os demais organismos ali presentes.

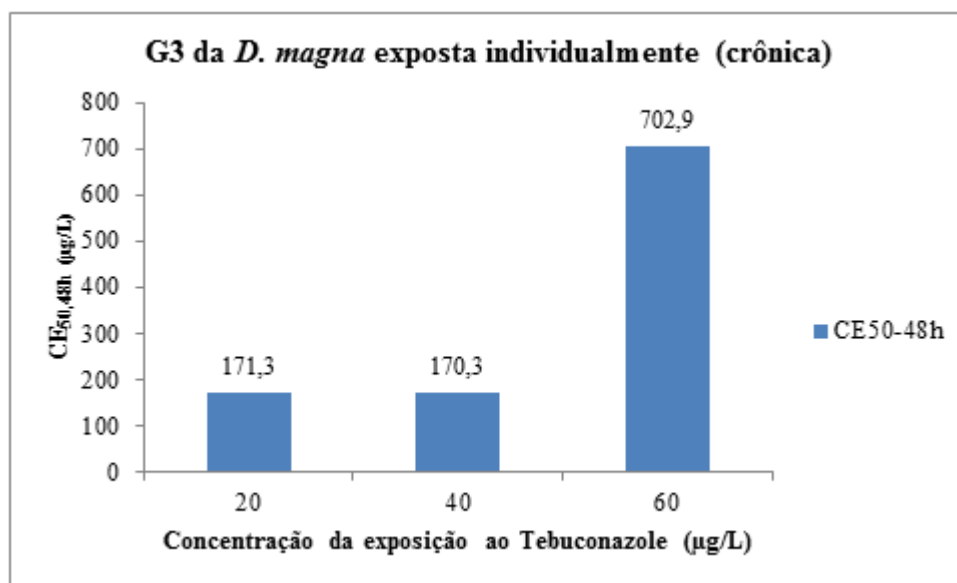
Comparando as Figuras 5 e 6, pode-se constatar que os organismos expostos na (G2(2)) foram menos sensíveis a exposição da substância do que os expostos na (G2(1)). Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que os organismos da (G2(2)) foram monitorados por um período maior de tempo, ou seja, os organismos parentais permaneceram por um período mais longo de exposição, gerando organismos mais resistentes à substância, devido ao retardamento na postura propiciando a constatação do efeito que a mesma desencadeia à longo prazo.

3.2.3 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna* 3ª geração (G3)

Para avaliar a toxicidade do fungicida Tebuconazole apresentada pelos organismos da G3, estes foram separados em quatro grupos de acordo com a exposição que a G2 parental foi submetida.

A Figura 7, traz a média da $CE_{50,48h}$ obtida para cada grupo de organismos expostos. Ressalta-se que não foi possível verificar os efeitos nos organismos da concentração 80 µg/L devido a elevada mortalidade verificada com os organismos parentais da G2 expostos nesta concentração.

Figura 7 - Resultado do teste de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) para a G3 da *D. magna* exposta individualmente (condição crônica).



Fonte: A autora, 2017.

Ao analisar a Figura 7 pode-se verificar de forma geral que os organismos da G3 apresentaram uma $CE_{50,48h}$ maior que a verificada para os organismos da G2. O resultado encontrado pode ser devido aos organismos já estarem em contato com o ambiente adverso por duas gerações e, portanto, terem adquirido uma possível resistência às condições que estavam propensos. Na comparação entre os organismos da G3, pode-se verificar que nas concentrações de 20 e 40 µg/L, foram as que apresentaram $CE_{50,48h}$ menores, que indicam que os organismos estavam mais sensíveis, também devido aos organismos parentais terem sido expostos a concentrações inferiores quando comparado aos organismos da concentração de 60 µg/L.

3.3 COMPARATIVO DAS MULTIGERAÇÕES DA *Daphnia magna*

A Tabela 3, apresenta os resultados de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) verificada para as três gerações avaliadas, de acordo com a exposição á que os organismos parentais foram mantidos.

Como pode ser verificado os organismos que apresentaram maior sensibilidade ao Tebuconazole foram os organismos da G2. Tanto os organismos da (G2(1)), quanto da (G2(2)), estes são descendentes de organismos que tiveram seu desenvolvimento em ambiente adverso (presença de contaminante). Este ambiente desfavorável permitiu que os mesmos

crecessem e se reproduzissem, porém acarretou em efeitos para os descendentes, neste caso a maior sensibilidade aos efeitos da substância.

Tabela 3 - Resultado dos testes de toxicidade aguda ($CE_{50,48h}$) para o organismo *D. magna* avaliando as multigerações expostas ao fungicida Tebuconazole.

Gerações	[] exposta geração parental ($\mu\text{g/L}$)	$CE_{50,48h}$ ($\mu\text{g/L}$)
G0	-	631,4
(G2(1)) (crônica)	40	13,9
	60	43,6
(G2(2)) (subaguda)	30	220,6
	60	72,8
G3 (crônica)	20	171,3
	40	170,3
	60	702,9

Fonte: A autora, 2017.

Os organismos parentais da (G2(2)) proveniente de organismos mantidos em condição subaguda permaneceram por mais tempo sendo monitorados, proporcionando a verificação de que ao longo do tempo estes organismos tendem a apresentar resistência a substância.

Os resultados obtidos para a G3 demonstram essa resistência apresentada pelos organismos, sendo que os neonatos provenientes de organismos expostos na concentração de 60 $\mu\text{g/L}$, apresentaram $CE_{50,48h}$ superior a encontrada para G0. Estudos realizados por Gong *et al.*, (2016), avaliando a exposição do organismo *D. magna*, sobre o efeito das nanopartículas de níquel, indicaram aumento da toxicidade com tempo de exposição e dosagem. Völker *et al.*, (2013), analisaram três espécies de *D. magna* avaliando a toxicidade das nanopartículas de prata, na qual constatou que os efeitos são percebidos de modo distinto pelas espécies e que os efeitos se alteram conforme a duração da exposição.

Entretanto, é necessário verificar que alguns dos resultados de $CE_{50,48h}$ encontrados para os organismos da G2 e da G3, estão abaixo do VMP estabelecido pela Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). O VMP para o Tebuconazole estabelecido pela Portaria 2.914/2011 em seu anexo VII considera corpos d'água que apresente até 180 $\mu\text{g/L}$ da substância como estando em conformidade com o padrão de potabilidade para substâncias químicas que configuram risco à saúde. Entretanto o VMP estabelecido pela Portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde demonstra proximidade com os resultados obtidos para este estudo, o qual indicou que concentrações inferiores a estas também provocam efeitos negativos sobre os organismos expostos, podendo desencadear

efeitos para o ambiente e consequentemente para a saúde humana. Os resultados obtidos demonstram que o fungicida Tebuconazole se mostrou extremamente tóxico para todas as gerações avaliadas e, portanto, seus efeitos desencadeiam consequências para toda cadeia trófica, já que o microcrustáceo *D. magna* constitui a base desta cadeia, como consumidor primário. Esses efeitos sendo propagados para níveis superiores inferem na desestabilização de todo sistema.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesta pesquisa foi possível inferir que o fungicida Tebuconazole possui um alto potencial tóxico para o organismo teste *D. magna*. Ao se avaliar a toxicidade aguda ao longo das gerações pode-se constatar que na G0 onde os organismos ainda não haviam tido nenhum contato com a substância o efeito já era considerado extremamente tóxico com $CE_{50,48h}$ de 631,4 µg/L.

Os testes realizados com a G2 do organismo, tanto os provenientes de exposição individual e em condição crônica (G2(1)), quanto os expostos em lote e em condição subaguda (G2(2)) apresentaram elevação do grau de toxicidade, ou seja, demonstraram maior sensibilidade a substância. Para os organismos da (G2(1)) a faixa de $CE_{50,48h}$ obtida foi de 13,9 µg/L – 43,6 µg/L. Porém, com o maior período de acompanhamento dos organismos expostos em lote e sobre condição subaguda (G2(2)), pode-se constatar que os organismos que sobrevivem nestas condições acabam apresentando maior resistência como pode ser verificada com $CE_{50,48h}$ de 220,8 µg/L para os organismos provenientes da exposição parental de 30 µg/L. Tais resultados demonstram que estes organismos ao longo do tempo geram descendentes mais propensos a suportarem tais condições.

Na avaliação da G3, a toxicidade encontrada esta correlata a verificada nos testes anteriores, que indicam que os organismos apresentam resistência ao contaminante, sendo verificado através da realização do teste agudo o qual indicou uma $CE_{50,48h}$ de 702,9 µg/L, para os organismos provenientes da exposição parental de 60 µg/L, esta é até superior a encontrada para os organismo da G0.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o fungicida Tebuconazole apresenta potencial de causar contaminação ambiental, bem como desencadear danos ainda maiores se não for manuseado e aplicado de forma correta, acarretando em sérios danos a vida aquática e aos possíveis consumidores que de algum modo façam uso deste corpo d'água.

5 RECOMENDAÇÕES

Devido aos poucos estudos referentes ao fungicida Tebuconazole com o organismo teste *D. magna* e aos resultados obtidos é indicado que se realize estudos futuros que englobam:

- Realizar testes de toxicidade aguda para outros organismos representativos do ambiente aquático a fim de verificar os efeitos de toxicidade em concentrações inferiores ao VMP.
- Acompanhamento de gerações posteriores a G3 tanto para os provenientes de exposição crônica como subaguda, a fim de verificar se os organismos continuam apresentando resistência a substância.
- Verificar quais seriam os efeitos desencadeados a nível celular para que microcrustáceo *D. magna* tenham adquirido esta possível resistência ao fungicida Tebuconazole.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 67, de 15 de setembro de 2005**. Disponível: < [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[11760-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[11760-1-0].PDF)>. Acesso em: jan. 2017.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.) **Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea): NBR 12.713. Rio de Janeiro. 2016.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências**. Diário Oficial. Brasília, DF. 11 de jul. 1989. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 25 de ago. 2016.

_____. Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. **Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes a orientações de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos, e da outras providências**. Diário Oficial. Brasília, DF. 4 de fev. 1992. Disponível em: < http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/JOAQUIMGONCALVESMACHADONETO/port_%200392_anvisa_class_toxicol.pdf>. Acesso em: 16 out. 2016.

_____. Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996. **Estabelecer procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins**. Diário Oficial. Brasília, DF. 15 out. 2016. Disponível em: < http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 10 out. 2016.

_____. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências**. Diário Oficial. Brasília, DF. 4 de jan. 2002. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 16 out. 2016.

_____. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Data da legislação: 12/12/2011 – Publicação DOU, de 14/12/2011. Disponível em: < <http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/PORTARIA%20No-77%202.914,%20DE%2012%20DE%20DEZEMBRO%20DE%202011.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

- BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. 2006. 149f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Santa Catarina. 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88729/230242.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 16 de ago. 2016.
- BOESTEN, J. J. T. I. *et al.* Conceptual model for improving the link between exposure and effects in the aquatic risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66. p. 291-308, 2007.
- CAMPAGNA, A. F. **Toxicidade dos sedimentos da bacia hidrografica do rio Monjolinho (São Carlos – SP): ênfase nas substâncias cobre, aldrin e heptacloro**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. p. 268, 2005.
- CAMPOS, B. *et al.*, Two-generational effects of contaminants in daphnia magna: effects of offspring quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 35. p. 1470-1477. 2016.
- CARNEIRO, F. F. *et al.*, **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, Rio de Janeiro, 2012. 1ª parte. p. 98. Disponível: <http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: 6 out. 2016.
- CLARE, J. **Daphnia: Na aquarist's guide**. Disponível em: <<http://www.caudata.org/daphnia/>>. Acesso em: 19 de agosto 2016
- COSTA, C. R. *et al.*, A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- DA SILVEIRA, S. B.; **Toxicidade do Tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais**. 2012. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em biologia de ambientes aquáticos continentais do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande, FURG, (SC) 2012. Disponível em: <<http://www.argo.furg.br/bdtd/0000010069.pdf>> Acesso em: 30 de agosto 2016.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. 2002. Disponível em : <https://www3.epa.gov/region6/water/npdes/wet/wet_methods_manuals/atx.pdf>. Acesso em: 25 agosto 2016.
- FUZINATTO, C. F. **Avaliação da qualidade da água de rios localizados na ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o índice de qualidade de água**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, 2009. Disponível em:<<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/92241>>. Acesso em: 16 de ago. de 2016.
- GERGS. A.; PREUSS, T.G.; PALMQVIST, A. **Double Trouble at High Density: Cross-Level Test of Resource-Related Adaptive Plasticity and Crowding-Related Fitness**. PLOS ONE. 2014.

GONG, N. *et al.*, Acute and chronic toxicity of nickel oxide nanoparticles to *Daphnia magna*: The influence of algal enrichment. **NanoImpact** , v. 3–4, p. 104–109, 2016.

HENRIQUE, F. L.; BRENTANO, D. M.; **Avaliação da toxicidade da água do Rio Papaquara, Município de Florianópolis/SC, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna***. IFSC, Florianópolis, v.02. nº1. p.71-75, 2010.

HORIZON. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Tebuconazole HORIZON EW250**. Bayer CropScience (Portugal) Ltda. 2015.

HOROS. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico: **Tebuconazole HOROS**. Adama Brasil S/A. 2012.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental** / Rafaela Maciel Rebelo et al.- Brasília: Ibama, 2010.

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

LOMBARDI, J. V; **Fundamentos De Toxicologia Aquática** Pesquisador Científico - Instituto de Pesca – SP. 2013. Disponível em: http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm. Acesso em: 16 de ago. de 2016.

LOUSAL. Ficha de Dados de Segurança: **Tebuconazole LOUSAL**. SAPEC AGRO, S.A. 2015.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrotóxicos**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrotóxicos>>. Acesso em: 20 de ago. 2016.

MATTE, V. L. **Efeito da ação de agroquímicos e do estresse sobre o metabolismo de carboidratos de jundiás (*Rhamdia quelen*)**. Dissertação (Mestrado em Avaliação de Impacto Ambiental). Centro Universitário La Salle. Canoas, 2013.

MOREIRA, J. C. *et al.* Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do Estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 6. nº.17, p. 1557 – 1568, 2012.

NAKAMURA, A. *et al.* Fish multigeneration test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of Applied Toxicology**. v.35. p. 11-23, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GRISOLIA, C.K.; PAUMAGARTTEN, F.J. Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: a multigeneration study. **Chemosphere**. v. 75. p. 398-404. 2009.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**. v. 30. p.1-3, Rio de Janeiro, 2014.

RIVAL. Ficha de informações de segurança de produtos químicos: **Tebuconazole RIVAL200 EC**, 2001.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Crustáceos. In: **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Roca. p. 660-773. 1996.

SANCHO, E. *et al.* Chemosphere Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1171–1178, 2009a.

SANCHO, E. *et al.* Physiological effects of tricyclazole on zebrafish and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v.150, n.1, p.25-32, 2009b.

SAAVEDRA BARROSO, M. de F. **Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna***. Dissertação (Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. Portugal, 2009.

SEHNEM, N. T. **Avaliação da capacidade de biodegradação de Tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes amazônicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Porto Alegre, 2009.

SILVA, A. U. **Implantação de células experimentais para a avaliação de codisposição de resíduos sólidos de serviços de saúde e resíduos sólidos domiciliares: resultados preliminares**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2011.

SILVA, M. F. **Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos ao herbicida 2,4 – D comercial**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociência. Rio Claro, 2015.

SOUZA, J. P. **Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento**. Universidade Estadual Paulista, UNESP. Dissertação (Mestrado Aquicultura). Jaboticabal, SP, 2008.

TEBUZIM. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos: **TEBUZIM 250 SC**. ROTAM, 2012.

TONI, C. **Resposta bioquímica em Carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao fungicida Tebuconazole (Folicur® 200EC)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). UFSM. Santa Maria, 2010.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. São Carlos, 2014.

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 2006.

YU, L. *et al.* Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. **Aquatic Toxicology**, v. 138, p. 35-42, 2013.

ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. IV Seminário sobre Ecotoxicologia. 2015. Disponível em:

<<http://www.eesc.usp.br/ecotox/arquivos/resumos/ResenhaLivroPedroZagatto.pdf>.> Acesso em: 23 de ago. 2016.

ANEXOS

ANEXO 1 - Preparo do meio M4 – Cultivo *Daphnia magna*

No quadro abaixo está apresentado o preparo do meio M4 para um volume de 5L de água deionizada. O M4 deve ser mantido aerado, por 24 horas antes de se realizar a manutenção do cultivo.

Solução	Volume (mL)
Solução de Cloreto de Cálcio	16
Solução de Sulfato de magnésio	4
Solução de Cloreto de Potássio	4
Solução de Bicarbonato de Sódio	4
Solução Catiônica	0,5
Solução Aniônica	2,5
Solução de Silicato	1
Solução de Ferro EDTA	25
Solução de Sulfato	0,5
Solução Vitamínica	0,5

Fonte: NBR 12.713 (ABNT, 2016)

ANEXO 2 – Preparo do meio ISO – Cultivo *Daphnia magna*

No quadro abaixo está apresentado o preparo do meio ISO, para um volume de 5L de água deionizada. O meio ISO deve ser mantido aerado, por 24 horas antes de se realizar a manutenção do cultivo.

Solução	Volume (mL)
Solução de Cloreto de Cálcio	16
Solução de Sulfato de Magnésio	4
Solução de Cloreto de Potássio	4
Solução de Bicarbonato de Sódio	4

Fonte: NBR 12.713 (ABNT, 2016)

Prof^a. Dr^a. Cristiane Funghetto Fuzinatto