



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

JAQUELINE KIN

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA COM MICROCRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA* DA
QUALIDADE DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO FORTIFICADA COM
AGROTÓXICOS POR MEIO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL
ROTACIONAL**

CERRO LARGO

2019

JAQUELINE KIN

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA COM MICROCRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA* DA
QUALIDADE DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO FORTIFICADA COM
AGROTÓXICOS POR MEIO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL
ROTACIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Bacharela em Engenharia Ambiental e Sanitária da
Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Cerro
Largo.

Orientadora: Profa. Dra. Alcione Aparecida de Almeida Alves

CERRO LARGO

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Kin, Jaqueline

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA COM MICROCRUSTÁCEO DAPHNIA MAGNA DA QUALIDADE DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO FORTIFICADA COM AGROTÓXICOS POR MEIO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL / Jaqueline Kin. -- 2019. 101 f.

Orientador: Doutora em Engenharia Ambiental Alcione Aparecida de Almeida Alves .

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Cerro Largo, RS , 2019.

1. Teste de toxicidade aguda com Daphnia magna . 2. Teste de genotoxicidade com Allium cepa . 3. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos. 4. Agrotóxicos glifosato e 2,4 D. I. , Alcione Aparecida de Almeida Alves, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

JAQUELINE KIN

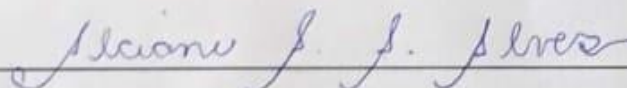
**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA COM MICROCRUSTÁCEO *DAPHNIA*
MAGNA DA QUALIDADE DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO
FORTIFICADA COM AGROTÓXICOS POR MEIO DO DELINEAMENTO
COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau
de Bacharela em Engenharia Ambiental e
Sanitária da Universidade Federal da Fronteira
Sul – *campus* Cerro Largo.

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

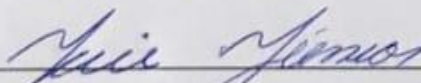
11/12/2019

BANCA EXAMINADORA

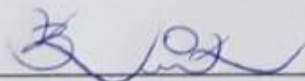


Profa. Dra. Alcione Aparecida de Almeida Alves – UFFS

Orientadora



Prof. Dr. Jair João Daniel Junior – UFFS



Roberto Birck – Licenciador Ambiental, Prefeitura Municipal de Cerro Largo

Dedico este trabalho a minha família, que não mediu esforços para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nos ensinar na batalha do dia-a-dia, que a vida é a contínua maravilha de existir.

Agradeço imensamente aos meus pais Tereza (*in memoriam*) e Magnus, que nunca mediram esforços para realizar os meus sonhos, mesmo em momentos difíceis incentivaram a estudar para termos um futuro melhor e sempre estiveram de alguma forma presente. Mãe, no penúltimo ano de graduação você partiu, nos deixando com uma dor imensa, com muitos pensamentos de desistir, porém o seu exemplo de mulher batalhadora, guerreira e dedicada nos deu forças para continuarmos a seguir o nosso caminho. Obrigada pai e mãe por serem a minha referência de tantas maneiras.

A minha irmã Elizane, agradeço o apoio e incentivo em caminhar na direção da melhoria da qualidade ambiental. Obrigada por ser este exemplo de ser humano que me ensina tantas coisas e sempre está ao meu lado, disposta a ajudar, lutando comigo, compartilhando dores e felicidades.

Agradeço também, ao pequeno Arthur, que chegou na nossa família em um momento muito difícil, mas trouxe muitas alegrias e bênçãos, pois através do seu nascimento aprendemos a reviver. Obrigada, você enche os nossos dias de luz e amor.

Agradeço aos professores que fizeram parte de todos os ciclos até a graduação, pois vocês são a base de todo o conhecimento adquirido nestes anos. Em especial, agradeço a minha professora e orientadora, que acreditou em meu potencial para desenvolver um trabalho pioneiro na universidade. Obrigada por ser esse exemplo de ser humano, que nos inspira a lutar pelas causas ambientais e ser um ser humano melhor.

Agradeço as minhas companheiras de laboratório, com quem dividi alegrias, segredos, tristezas e muitas etapas deste trabalho de conclusão. Obrigada pela companhia e parceria de sempre.

Agradeço a equipe do Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal de Santa Catarina, por todo auxílio prestado para a realização deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), seu corpo docente, direção e administração, pela oportunidade de estudo e formação superior.

Agradeço a MCTIC/CNPq pelo financiamento da pesquisa conforme CHAMADA UNIVERSAL MCTIC/CNPq nº 28/2018 referente ao Projeto - Reator de leito fixo com energia solar fotovoltaica empregado na remoção de agrotóxicos da água de abastecimento público na área rural.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram envolvidos nesta caminhada e aqueles que sempre me apoiaram e continuarão me aconselhando e desejando que eu trace o melhor caminho.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar” (Antone France).

RESUMO

O uso intensivo de agrotóxicos tem demonstrado os riscos potenciais que essas substâncias causam ao meio ambiente e aos seres humanos, pois estes compostos não atingem somente o alvo. Dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, o glifosato e o 2,4-D classificados como medianamente tóxico e extremamente tóxico, respectivamente, têm sido encontrados nos solos e na água, ocasionando a contaminação do meio ambiente e dos seres humanos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi fortificar uma amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público de um município da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul, com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D, visando identificar a toxicidade aguda e genotoxicidade que estes compostos químicos causam quando combinados em uma mesma amostra. Para isso, foi analisada uma amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público, e avaliada a qualidade em relação aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, sendo estes, absorvância (λ - 254 nm), condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), cor aparente (uC), dureza ($\text{mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$), fluoreto (mg L^{-1}), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), potencial hidrogeniônico, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), turbidez (uT), coliformes totais e *Escherichia coli*, em seguida foi realizada a detecção e quantificação dos agrotóxicos, e posteriormente a comparação entre os resultados obtidos e os valores estabelecidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde e na Portaria nº 320/2014 da Secretária de Estado da Saúde do Rio Grande Do Sul. Para o teste de toxicidade aguda, foi realizado o cultivo do microcrustáceo *Daphnia magna* e para o teste de genotoxicidade foi utilizado o bioindicador *Allium cepa*, a amostra de água foi fortificada com os agrotóxicos em concentrações definidas no delineamento composto central rotacional, totalizando 12 experimentos. Os resultados indicaram valores de fluoreto, *Escherichia coli* e coliformes totais em dissonância com o estabelecido na Portaria de Consolidação nº 5/2017. Em relação aos agrotóxicos, identificou-se a presença de atrazina, azoxistrobina, clomazona, fipronil, tebuconazol e trifloxistrobina, sendo que o fipronil apresentou concentração superior ao valor máximo permitido na Portaria nº 320/2014 da Secretária de Estado da Saúde do Rio Grande Do Sul. O teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* indicou que o herbicida 2,4-D possui toxicidade mais elevada quando comparada a toxicidade do glifosato, corroborando ao valor máximo permitido (VMP) na Portaria de Consolidação nº 5/2017, o qual é inferior ao VMP para o glifosato. Enquanto que, no teste de genotoxicidade foi possível concluir que os agrotóxicos interferem em um nível de significância de 95 % no processo de divisão celular. Por fim conclui-se que, a combinação de agrotóxicos em uma mesma amostra de água subterrânea utilizada para o

abastecimento público causa danos ao microcrustáceo *Daphnia magna*, interfere nos processos de divisão celular e conseqüentemente origina danos a saúde humana e ao meio ambiente devido aos efeitos tóxicos e genotóxicos que estes compostos químicos apresentam.

Palavras-chave: Glifosato. 2,4-D. Toxicidade aguda. Genotoxicidade. Delineamento experimental.

ABSTRACT

The intensive use of pesticides has demonstrated the potential risks that these substances cause to the environment and humans, as these compounds do not only reach the target. Among the most used pesticides in Brazil, glyphosate and 2,4-D classified as medium toxic and extremely toxic, respectively, have been found in soils and water, causing contamination of the environment and humans. In this sense, the objective of this work was to fortify a sample of groundwater used for public supply of a municipality in the Missions Region of the state of Rio Grande do Sul, with the glyphosate and 2,4-D pesticides, aiming to identify the acute and genotoxicity that these chemical compounds cause when combined in the same sample. For this, a sample of groundwater used for public supply was analyzed, and its quality was evaluated in relation to the physicochemical and microbiological parameters, namely, absorbance ($\lambda - 254$ nm), electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$), apparent color (uC), hardness ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), fluoride (mg L^{-1}), dissolved oxygen (mg L^{-1}), hydrogen potential, temperature ($^{\circ}\text{C}$), turbidity (uT), total coliforms and *Escherichia coli*. Then the detection and quantification of the pesticides was performed, and then the comparison between the results obtained and the values established in the Consolidation Ordinance n^o 5/2017 of the Ministry of Health and the Ordinance n^o 320/2014 of the Secretary of State for Health of Rio Grande Do Sul. For the acute toxicity test, the cultivation of the micro crustacean *Daphnia magna* was performed and for the genotoxicity test the bioindicator *Allium cepa* was used, the water sample was fortified with the pesticides in conception defined in the central rotational composite design, totaling 12 experiments. The results indicated fluoride, *Escherichia coli* and total coliforms values in dissonance with the established in Consolidation Ordinance n^o 5/2017. Regarding pesticides, the presence of atrazine, azoxystrobin, clomazone, fipronil, tebuconazole and trifloxystrobin were identified, and fipronil was higher than the maximum allowed in Ordinance n^o 320/2014 of the Secretary of State of Rio Grande Do Sul. The acute toxicity test with *Daphnia magna* indicated that the herbicide 2,4-D has higher toxicity when compared to glyphosate toxicity, corroborating the maximum allowed value (VMP) in Consolidation Ordinance n^o 5/2017, which is lower. VMP for glyphosate. While in the genotoxicity test it was possible to conclude that pesticides interfere with a 95 % significance level in the cell division process. Finally, it is concluded that the combination of pesticides in the same sample of groundwater used for public supply causes damage to the *Daphnia magna* microcrustacean, interferes with the processes of cell

division and consequently causes damage to human health and the environment due to the effects, toxic and genotoxic effects of these chemical compounds.

Keywords: Glyphosate, 2,4-D, Acute Toxicity, Genotoxicity, Experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplares de <i>Daphnia magna</i>	38
Figura 2 – Exemplares de efípio em diferentes fases.	39
Figura 3 – Localização dos municípios pertencentes a Região das Missões do Estado do Rio Grande do Sul.	47
Figura 4 – Poço em que foi realizada a coleta.	48
Figura 5 – Procedimento utilizado para a Extração em Fase Sólida.	52
Figura 6 – Estufa incubadora juntamente com cultivo do microcrustáceo e fotoperíodo ligado.	59
Figura 7 – Cultivo de <i>Dm</i> em diferentes fases de vida.	60
Figura 8 – Alga <i>Desmodesmus subspicatus</i> para alimentação dos microcrustáceos.	61
Figura 9 – Solução de dicromato de potássio para aplicação no teste de sensibilidade.	62
Figura 10 – Realização do teste de sensibilidade com dicromato de potássio.	62
Figura 11 – Condições experimentais para o teste de toxicidade aguda com <i>Dm</i>	64
Figura 12 – Realização do teste agudo em recipientes-teste contendo o microcrustáceo <i>Dm</i> nas condições experimentais propostas no DCCR 2 ² + 4 axiais para a amostra de água de abastecimento público fortificada com os herbicidas glifosato e 2,4-D.	64
Figura 13 – Exposição dos bulbos de <i>Allium cepa</i> em água destilada.	65
Figura 14 – Condições experimentais para o teste <i>Allium cepa</i>	66
Figura 15 – Bulbos de <i>Allium cepa</i> desenvolvimento radicular após 72 horas de exposição nas soluções-teste.	67
Figura 16 – Preparo das lâminas de <i>Allium cepa</i>	68
Figura 17 – Correlação entre os valores observados na imobilidade de <i>Daphnia magna</i> e os valores previsto pelo modelo estatístico proposto para o teste de toxicidade aguda.	79
Figura 18 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para a imobilidade de <i>Dm</i> em 48 horas de exposição com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) expressas no diagrama de Pareto.	81
Figura 19 – Superfície de resposta em relação à imobilidade de <i>Dm</i>	82
Figura 20 – Células do controle negativo em mitose.	84
Figura 21 – Núcleos mal formados no experimento 5.	85
Figura 22 – Células observadas nos experimentos 4, 6 e 8.	85
Figura 23 – Células das raízes de <i>Allium cepa</i> expostas ao experimento 9.	86

Figura 24 – Correlação entre os valores observados no índice mitótico e os valores previsto pelo modelo estatístico proposto para o teste <i>Allium cepa</i>	87
Figura 25 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para o índice mitótico obtido no teste <i>Allium cepa</i> com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) expressas no diagrama de Pareto.	88
Figura 26 – Superfície de resposta em relação ao índice mitótico obtido através da exposição de <i>Allium cepa</i>	89

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1 – Área plantada, seus respectivos consumos de agrotóxicos e predominância de lavoura agrícola dos três maiores estados consumidores do Brasil no ano de 2015.	31
Tabela 2 – Padrão de potabilidade dos agrotóxicos citados na Portaria de Consolidação nº 05/2017 do MS, na Portaria Estadual nº 320/2014 e na Resolução CONAMA nº 396/2008. .	44
Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados.	49
Tabela 4 – Características dos agrotóxicos analisados.	54
Tabela 5 – Características dos agrotóxicos utilizados.	56
Tabela 6 – Níveis das variáveis.	57
Tabela 7 – DCCR 2 ² + 4 axiais com quadruplicata no ponto central.	57
Tabela 8 – Condições experimentais do DCCR 2 ² + 4 axiais com as respectivas concentrações dos agrotóxicos.	63
Tabela 9 – Valores dos parâmetros físico-químicos.	69
Tabela 10 – Resultado dos parâmetros microbiológicos.	75
Tabela 11 – Concentrações de agrotóxicos na amostra de água subterrânea analisada e valores máximo permitidos nas legislações.	76
Tabela 12 – Resultados do DCCR 2 ² + 4 axiais com quadruplicata no ponto central, para o teste de toxicidade aguda.	78
Tabela 13 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para a imobilidade de <i>Daphnia magna</i> em 48 horas de exposição com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).	80
Tabela 14 – Teste da análise de variância do modelo previsto para a imobilidade do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> após 48 horas de exposição ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).	81
Tabela 15 – Resultados do DCCR 2 ² + 4 axiais com quadruplicata no ponto central para o teste <i>Allium cepa</i>	84
Tabela 16 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para o teste <i>Allium cepa</i> com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).	87
Tabela 17 – Teste da análise de variância do modelo previsto para o teste <i>Allium cepa</i> após 72 horas de exposição nas amostras fortificadas com glifosato e 2,4-D ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).	88

Quadro 1 – Classificação, sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA	Agência Nacional das Águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
CE ₅₀	Concentrações Efetivas média
CETESB	Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo
CL ₅₀	Concentrações Letais média
CLAE-EM	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas
CONAMA	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
CORSAN	Companhia Riograndense de Saneamento
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
<i>Dm</i>	<i>Daphnia magna</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESI	Ionização por Electrospray
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Índice Mitótico
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
K _{oc}	Coefficiente de partição solo-água
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
LQO	Limites de Quantificação Praticáveis
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
MS	Ministério da Saúde
MT	Mato Grosso
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PA	Padrão Analítico
pH	Potencial Hidrogeniônico

PR	Paraná
RS	Rio Grande do Sul
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
uH	Unidade Hazen
UV	Ultravioleta
VMP	Valores Máximos Permitidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos	22
1.2	JUSTIFICATIVA	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	A ÁGUA NO MEIO AMBIENTE	24
2.1.1	Importância da qualidade da água para o abastecimento público	26
2.1.2	Principais fontes de contaminação das águas subterrâneas	28
2.2	A CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO POR AGROTÓXICOS.....	29
2.2.1	Efeitos deletérios dos agrotóxicos ao organismo humano	33
2.3	TOXICOLOGIA AMBIENTAL	35
2.3.1	Uso de Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> para a determinação da toxicidade aguda em água	37
2.3.2	Uso de <i>Allium cepa</i> para a determinação da genotoxicidade em água	40
2.4	LEGISLAÇÃO AMBIENTAL CONDIZENTE A POTABILIDADE, TOXICIDADE E PRESENÇA DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA UTILIZADA PARA O CONSUMO HUMANO	42
3	METODOLOGIA	46
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	46
3.2	PROCEDIMENTO DE COLETA, PRESERVAÇÃO E LOCAL DE AMOSTRAGEM DA ÁGUA.....	48
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS	49
3.4	PREPARAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS.....	50
3.4.1	Limpeza de materiais e preparo da amostra	51
3.5	AGROTÓXICOS UTILIZADOS PARA A FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA... 56	
3.5.1	Delineamento experimental e análise estatística	57

3.6	ANÁLISE TOXICOLÓGICA	58
3.6.1	Cultivo do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	58
3.6.2	Teste de sensibilidade	61
3.6.3	Testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	63
3.7	TESTES DE GENOTOXICIDADE	65
3.8	RESÍDUOS.....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DE ESTUDO	69
4.1.1	Absorvância (λ - 254 nm)	69
4.1.2	Condutividade elétrica	70
4.1.3	Cor aparente	71
4.1.4	Dureza	71
4.1.5	Fluoreto	72
4.1.6	Oxigênio Dissolvido	72
4.1.7	Potencial Hidrogeniônico	73
4.1.8	Temperatura	74
4.1.9	Turbidez	74
4.1.10	Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	75
4.2	DETECTAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS	76
4.3	TOXICIDADE AGUDA COM <i>DAPHNIA MAGNA</i>	77
4.3.1	Delineamento experimental e análises estatística dos resultados obtidos para o teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	78
4.4	GENOTOXICIDADE COM <i>ALLIUM CEPA</i>	83
4.4.1	Delineamento experimental e análises estatística dos resultados obtidos para o teste <i>Allium cepa</i>	83
5	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A água é um dos recursos naturais mais utilizados, sendo fundamental para a existência e manutenção da vida, desta forma o homem a utiliza para sua sobrevivência e melhoria de suas condições econômicas, sociais e comunitárias (BRAGA et al., 2005; TUCCI et al., 2009). Este recurso é utilizado para o abastecimento humano e está relacionado à história da humanidade, pois o homem abandonou a vida nômade e passou a ter vida sedentária, procurando se instalar em locais próximos a este recurso (HELLER, 2006). Além disso, a água é um meio onde habitam organismos que necessitam condições ambientais adequadas para a sobrevivência (TUCCI et al., 2009).

Com o passar do tempo e o desenvolvimento de diversas culturas, a sociedade se tornou cada vez mais complexa, e para garantir a sua sobrevivência buscou aportes tecnológicos nos sistemas de produção agrícola desenvolvidos na Revolução Verde, a qual teve o intuito de modernizar a agricultura e aumentar a produtividade para a erradicação da fome (HELLER, 2006; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Com o objetivo de buscar o aumento da produção de alimentos, o desenvolvimento de agrotóxicos foi impulsionado na década de 1960 no Brasil, por meio do Plano Nacional do Desenvolvimento, o qual incentivou os agricultores a comprar uma cota de agrotóxicos para obter crédito rural (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; JOBIM et al., 2010). Entretanto por meio deste incentivo, houve a redução das práticas ecologicamente saudáveis na agricultura e o uso de agrotóxicos aumentou de forma exponencial (JOBIM et al., 2010).

Atualmente o agronegócio é uma das principais atividades econômicas nacionais, pois além da cana-de-açúcar, do café e da laranja, a agricultura brasileira se especializou na produção de grandes monoculturas, como a soja, o milho e o trigo, as quais têm sido associadas ao intensivo uso de agrotóxicos (MOREIRA et al., 2002a), fato este que auxiliou o Brasil no ano de 2008 a se tornar, o maior consumidor mundial de agrotóxicos (CARNEIRO et al., 2015).

Através deste crescente cenário, o uso de agrotóxicos vem se intensificado, entretanto a aplicação destes pode contaminar o ar, o solo e os sistemas hídricos, culminando na degradação ambiental e em consequência causando danos à saúde humana e alterações significativas nos ecossistemas (VEIGA et al., 2006). Pois os agrotóxicos utilizados na agricultura, podem seguir diferentes rotas no ambiente e independentemente do modo de aplicação, podem atingir espécies e habitats diferentes do alvo para o qual foi desenvolvido (LAABS et al., 2002). Conforme explicam Scorza Júnior, Névola e Ayelo (2010), os

agrotóxicos aplicados diretamente nas plantas ou no solo, e mesmo aqueles aplicados diretamente nas plantas possuem como destino final o solo, podendo causar a contaminação dos lençóis freáticos subterrâneos através da lixiviação da água e da erosão dos solos.

Desta forma, as práticas agrícolas e a vulnerabilidade natural do aquífero podem representar um alto nível de impactos negativos, tornando inclusive a água imprópria para o consumo. Pois, a contaminação de um sistema hídrico não representa só a contaminação da água consumida pela população local, mas também a contaminação de toda a população abastecida por esta água contaminada (VEIGA et al, 2006).

No entanto, o efeito dessas substâncias químicas está relacionado à concentração e a composição em que estas se encontram no meio, por isso para prever os riscos e os efeitos que as substâncias causam aos seres vivos e ao meio ambiente são realizados testes de toxicidade (COSTA et al., 2008). De todos os principais meios que os agrotóxicos podem contaminar, identificar a toxicidade nas águas, em especial as de consumo é primordial, uma vez que o contato direto com alimentos ou solo contaminado pode ser evitado diferentemente da ingestão de água (ALVES, 2017).

Visando avaliar os efeitos toxicológicos dessas substâncias químicas são realizados testes de toxicidade aquática em organismos aquáticos. Para isso, podem ser analisados efeitos de toxicidade aguda e crônica, sendo mais comum os ensaios de toxicidade aguda. Nos ensaios de toxicidade aguda os organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados, e dentre estes se destaca o uso do microcrustáceo *Daphnia magna* (*Dm*). Este microcrustáceo é utilizado em ensaios de toxicidade aguda, pois apresenta sensibilidade a diversas substâncias tóxicas (FUZINATTO, 2009).

Apesar dos efeitos toxicológicos, a mistura e a concentração dos agentes químicos introduzidos no ambiente podem causar alterações genéticas nos organismos, podendo ocasionar vários problemas de saúde. Uma das formas de verificar as alterações cromossômicas, anomalias mitóticas e presença de micronúcleos causados pelos agentes químicos é por meio de testes de genotoxicidade. Visando identificar os efeitos genotóxicos são utilizados vários sistemas de teste em plantas, dentre elas a espécie *Allium cepa* (THEODORAKIS et al., 1998; FARIA et al., 2017).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar a toxicidade aguda e a genotoxicidade da água subterrânea de um município localizado na Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul utilizada para o abastecimento público e fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D.

1.1.2 Objetivos específicos

Analisar se os parâmetros absorvância ($\lambda - 254 \text{ nm}$), condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), cor aparente (uC), dureza ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), fluoreto (mg L^{-1}), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), potencial hidrogeniônico, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), turbidez (uT), *Escherichia coli* e coliformes totais estão em conformidade com o descrito na Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde (MS).

Determinar por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas a presença dos agrotóxicos: 2,4-D, atrazina, azoxistrobina, bentazona, carbofurano, ciproconazol, clomazona, difenoconazol, epoxiconazol, fipronil, imazapique, imazetapir, malationa, metsulfurom-metílico, penoxsulam, piraclostrobina, pirazossulfurom-etílico, pirimicarbe, profenofós, propiconazol, simazina, tebuconazol, tiametoxam e trifloxistrobina na água subterrânea utilizada para o abastecimento público, coletada em um poço localizado na área rural de um município da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul.

Realizar testes de toxicidade aguda e genotoxicidade da amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR nº 12.713/2016 e *Allium cepa*, respectivamente.

1.2 JUSTIFICATIVA

Conforme o Art. 225 descrito na Constituição Federal (1988), “todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações” (BRASIL, 1998). Contudo, para a população

ter qualidade de vida, é preciso garantir o direito à saúde, que por sua vez, possui relação direta com a qualidade das águas servidas a população (HELLER, 2006).

Devido ao uso massivo de agrotóxicos nos setores das atividades humanas os ensaios laboratoriais para a verificação da potabilidade da água, tem comprovado a presença de substâncias e microrganismos acima de valores permitidos pelas legislações, afetando, de forma negativa, a saúde da população (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Em decorrência da conscientização sobre os riscos desses compostos à saúde humana e a biota aquática, ensaios biológicos foram desenvolvidos para avaliação da toxicidade em diferentes matrizes (USEPA, 1985). Isto porque, nenhuma substância química é totalmente segura ou danosa, seu efeito está diretamente relacionado com a concentração desta substância no meio e o tempo de exposição aos organismos.

Estudos preliminares detectaram a presença de multiresíduos de agrotóxicos na água subterrânea utilizada para o abastecimento público nos municípios da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul. Nas práticas agrícolas, é comum a aplicação de mais de um tipo de agrotóxico ao mesmo tempo, em consequência a exposição humana a contaminantes ambientais não se limita aos compostos individuais (PEROBELLI et al., 2010; SANTOS; MARTINEZ, 2014). Desta forma, a avaliação de toxicidade separada de produtos químicos pode não estimar adequadamente os efeitos adversos combinados de agrotóxicos (HERNANDEZ; GIL; LACASAÑA, 2017).

Portanto, este trabalho se justifica devido ao uso intensivo de agrotóxicos na Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul, bem como a identificação destes compostos nas águas de consumo humano e devido a necessidade de se compreender os efeitos tóxicos e genotóxicos dos agrotóxicos glifosato e 2,4-D amplamente aplicados no Brasil e no Rio Grande do Sul.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste item, estão apresentadas as principais definições e as características das águas de abastecimento público, com enfoque para a importância da qualidade da água e conseqüentemente a necessidade de se determinar a toxicidade e genotoxicidade deste recurso quando contaminado especialmente por multiresíduos de agrotóxicos.

2.1 A ÁGUA NO MEIO AMBIENTE

A água é um bem indispensável à vida e ao desenvolvimento das sociedades. É de vital importância para os seres humanos, pois estes são constituídos aproximadamente por 70 % dessa substância e a utilizam para eliminação das substâncias tóxicas presentes no organismo, além de servir como transporte de nutrientes, oxigênio e sais minerais, protege algumas estruturas do corpo e ajuda nos processos fisiológicos. Portanto, a água pode ser considerada como sinônimo de vida, sendo um recurso natural essencial para a sobrevivência de todas as espécies que habitam a Terra (MACHADO, 2008).

Esta é abundante, mas cerca de 97,5 % está nos oceanos e mares, contendo altos teores de salinidade, que inviabilizam sua utilização para dessedentação (SPIRO; STIGLIANI, 2009). Atualmente, para reduzir os altos teores de salinidade faz-se o uso da tecnologia de dessalinização, entretanto a água doce disponível continua sendo uma alternativa fácil, econômica e acessível para o abastecimento das populações (LIBÂNIO, 2010). Porém apenas 2,5 % das águas do planeta são doces e desse volume, a maior parte está contida nas calotas polares, geleiras e neves, tornando-se inacessíveis. Desta forma, a água doce superficial que pode ser utilizada para diferentes formas de abastecimento e produção é muito pequena em termos proporcionais (ROCHA et al., 2011; PORTO, 2012).

O Brasil possui uma das maiores redes hidrográficas do mundo, além de extensas reservas de água subterrânea. Estima-se que o país seja detentor de 12 % de toda a água doce superficial do planeta, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), o Brasil está na classe dos países mais ricos em termos de volume de água doce facilmente explorável. Dentre os sistemas de abastecimento público os mananciais superficiais são os mais utilizados como fonte de fornecimento de água, pois estas acumulam-se na superfície, escoam e dão origem aos rios, riachos, lagoas e córregos, contudo, devido à contaminação dos mesmos e as frequentes estiagens têm-se intensificado a busca pelas águas subterrâneas (MELLER, 2009).

A maior parte da água doce disponível na Terra se encontra na parte subterrânea. A água subterrânea se origina através da precipitação que cai sobre a superfície do solo, e uma pequena fração dela é filtrada até a zona saturada. Logo para Baird e Cann (2011):

Se a água subterrânea está contida no solo composto de rochas porosas, ou em rochas altamente fraturadas, e se as águas mais profundas estão em contato com uma camada de argila ou rochas impermeáveis, então se constitui um reservatório permanente – uma espécie de lago subterrâneo - chamado de aquífero.

Desta forma, as águas dos mananciais subterrâneos podem ser captadas por meio de poços e essa fonte de recurso hídrico para abastecimento se tornou a principal fonte de água potável em todo o mundo, não apenas nas megacidades, mas também em milhares de cidades de pequeno e médio porte (WWAP, 2009).

Assim, para o abastecimento público e as atividades econômicas utilizam-se as águas emersas ou as águas interiores dos continentes e ilhas, captadas dos rios, lagos e represas, que estão em constante renovação pela força das chuvas e os aquíferos subterrâneos, que abastecem dois terços da população mundial (ROCHA et al., 2011).

Apesar disso, a disponibilidade de água deve garantir não somente a presença da água, mas a quantidade e a qualidade devem ser satisfatórias para suprir as necessidades de um determinado conjunto de seres vivos (BRAGA et al., 2005). Segundo Tundisi (2006), a qualidade da água provém da multiplicidade dos usos dos recursos hídricos, que depende do grau de concentração da população humana, do estágio do desenvolvimento econômico e das atividades decorrentes nas bacias hidrográficas. Desta forma, “as demandas de água no país concentram-se na agricultura, pecuária, hidroeletricidade, abastecimento público, pesca, irrigação, turismo, indústria e navegação” (MELLER, 2009).

Segundo o mesmo autor, “em muitas regiões brasileiras os diversos usos da água têm alterado a sua qualidade e quantidade”, causando para a população e meio ambiente diversas consequências. Neste sentido Meller (2009), destaca que os diversos usos causam:

A eutrofização de águas superficiais, sedimentação de lagoas, rios e represas, lançamento de poluentes industriais, poluição orgânica, introdução de espécies exóticas, retirada de florestas nativas das margens de rios, uso inadequado do solo, e conseqüentemente o aumento dos custos de tratamento de água.

A falta de acesso à água configura uma forma de privação que ameaça a vida, limita as oportunidades e enfraquece a dignidade humana (JACOBI; GRANDISOLI, 2017). Logo, o acesso a água com qualidade adequada é essencial para o equilíbrio e o funcionamento dos ecossistemas (ANA, 2017).

2.1.1 Importância da qualidade da água para o abastecimento público

Dentre os vários usos da água, o abastecimento público é considerado o mais nobre e prioritário, pois o homem depende da oferta adequada para a sua sobrevivência, a qual é utilizada para o funcionamento adequado do organismo, no preparo dos alimentos, na higiene pessoal e de utensílios, mas para suprir essa demanda, a quantidade e qualidade são imprescindíveis (BRAGA et al., 2005).

A qualidade das águas se refere à confiabilidade do seu uso em termos de saúde humana e a potabilidade significa a ausência de contaminação microbiológica e toxicológica para a sua utilização (CASTRO et al., 2018; BRAGA et al., 2005). No entanto, por muitos anos, os sentidos da visão, sabor e olfato foram os determinantes na avaliação da qualidade da água, mas a evolução de tecnologias de medição e detecção de poluentes, levaram ao estabelecimento de padrões de qualidade da água quando considerado os seus usos (TUCCI et al., 2009).

Em conformidade com Santos (2004), atualmente os parâmetros indicadores da qualidade da água são: a temperatura, turbidez, cor, potencial hidrogeniônico (pH), absorvância, fluoreto, coliformes fecais e coliformes totais. Alguns desses parâmetros são usados para mensurar o estado de contaminação ambiental, para isso boa parte destes parâmetros estão dispostos em legislações ambientais, as quais abordam os VMP. Sendo assim, a água utilizada para o abastecimento público, conforme descrito por Von Sperling (2005), deve estar:

[...] isenta de substâncias químicas prejudiciais à saúde, isenta de organismos prejudiciais à saúde, adequada para serviços domésticos, baixa agressividade e dureza e esteticamente agradável (baixa turbidez, cor, sabor e odor e ausência de macrorganismos).

Desse modo, a água deve apresentar características sanitárias e toxicológicas adequadas, pois a qualidade das águas muda com o passar dos anos, devido aos fatores meteorológicos e do lançamento de poluentes (BRAGA et al., 2005; PHILIPPI JR.; MARTINS, 2018).

De acordo com Pádua e Ferreira (2006), Porto (2012) e Castro et al. (2018), a crescente demanda por alimentos, o crescimento da população e sua concentração em áreas urbanas e também o desenvolvimento industrial intensificam a demanda por água e ao mesmo tempo contribuem para a deterioração de sua qualidade, pois a cultura humana produz cada

vez mais novos poluentes, aumentando o número de substâncias desconhecidas na água, bem como seus efeitos nocivos à saúde humana.

A utilização da água em baixa qualidade no tocante ao seu uso para o consumo doméstico é uma das principais formas de transmissão de doenças de veiculação hídrica. Deste modo, a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que 25 milhões de pessoas no mundo morrem por ano em virtude de doenças transmitidas pela água (BRAGA et al., 2005). No Brasil cerca de 60 % das internações hospitalares estão relacionadas com as deficiências do saneamento básico, sendo que 90 % das doenças ocorrem devido à má qualidade das águas de abastecimento (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). Por isso é primordial fornecer água a toda a população, em quantidade e qualidade compatível com os usos a que se destina (BRAGA et al., 2005; PORTO, 2012).

De acordo com Meller (2009), desde a antiguidade a qualidade da água era uma preocupação para os humanos, e conseqüentemente se constituía uma fonte geradora de discórdias, pois eram escavados poços para se obter água de boa qualidade e os mesmos eram disputados entre tribos. No Brasil, desde o início da colonização as águas subterrâneas vêm sendo utilizadas para o abastecimento (REBOUÇAS, 2006).

Sendo assim, o seu uso acompanhou a evolução da humanidade e representa uma importante forma de abastecimento. Conforme Palmier (2006), o uso das águas subterrâneas apresenta vantagens quando comparadas com as águas superficiais, pois:

O abastecimento não está sujeito a situações críticas face à ocorrência de condições climáticas anormais, pois geralmente a quantidade e a qualidade das águas subterrâneas não são significativamente afetadas pela variabilidade sazonal ou interanual das fontes de recarga; Os mananciais subterrâneos podem ser considerados recursos estratégicos, na medida em que normalmente sua exploração não é afetada pela ocorrência de eventos catastróficos; A água subterrânea pode ser explorada no local onde ocorrem as demandas, sem que haja a necessidade de se construir adutoras e; As águas subterrâneas geralmente apresentam características perfeitamente compatíveis com os padrões de potabilidade.

Entretanto segundo Santos (2004), no Brasil são ínfimas as análises das águas subterrâneas, mesmo sendo reconhecida a sua importância, devido ao seu consumo por muitas décadas. De acordo com o autor, o território brasileiro apresenta dados insuficientes sobre os parâmetros de quantidade e qualidade da água devido ao elevado tempo e custo para a realização das análises. Esses fatores implicam na análise das águas subterrâneas, pois os dados apresentam erros grosseiros, por não serem considerados a hidrologia do local, o mapeamento dos aquíferos, altura do nível freático e qualidade de contaminação.

2.1.2 Principais fontes de contaminação das águas subterrâneas

A partir da Revolução Industrial houve um expressivo aumento populacional no mundo. Este aumento populacional causou a expansão da agricultura, o crescimento desordenado das cidades e, conseqüentemente a geração de resíduos. Esses fatores têm causado alterações no meio ambiente, influenciando na disponibilidade dos recursos, em decorrência disso a água tem-se tornado um recurso escasso e com qualidade comprometida em muitos países (MELLER, 2009).

O comprometimento da qualidade das águas provém da poluição, a qual pode ser definida como “a adição de substâncias ou de formas de energia que, direta ou indiretamente, alterem a natureza do corpo d’ água de uma maneira tal que prejudiquem os legítimos usos que dele são feitos” (VON SPERLING, 2005) e também da contaminação, a qual ocorre pela “introdução de substâncias nocivas à saúde humana e ao mundo vivo” (MELLER, 2009).

Segundo Bassoi (2005), a poluição natural dos mananciais superficiais e subterrâneos ocorre devido ao arraste de partículas orgânicas e inorgânicas por meio das águas pluviais. Apesar disso, a poluição natural dificilmente altera consideravelmente as propriedades da água. Diferente da poluição natural, um fator que interfere na qualidade das águas, é o crescimento das cidades, a qual provoca a impermeabilização dos solos, e conseqüentemente a redução da infiltração da água das chuvas. Além de que, em muitos lugares os despejos de águas residuárias e de resíduos sólidos são lançados de formas inadequadas nos mananciais (PÁDUA; FERREIRA, 2006).

As ações decorrentes do ser humano sobre o meio ambiente, são fatores que interferem na qualidade da água, ou seja, o uso e a ocupação dos solos alteram os processos biológicos, físicos e químicos dos sistemas naturais. Sendo assim, a poluição provinda das drenagens de áreas urbanas ou agrícolas ocorre devido ao escoamento das águas da chuva, as quais lavam a superfície do solo, carregando as impurezas, tais como partículas do solo, detritos vegetais e animais, microrganismos patogênicos e agrotóxicos ocasionando erosão, ou ainda deslocando-se para o subsolo por meio da infiltração (PÁDUA; FERREIRA, 2006; BASSOI, 2005).

Desta forma, a água pode ser um veículo de transmissão de doenças e outros agravos, como as intoxicações ao homem, além de que, pode ser requisito de boas condições a saúde, isto quando é ofertada em quantidade suficiente e qualidade adequada, mas, as instalações de abastecimento de água podem interferir na sua qualidade, pois quando não apresentam aspectos higienicamente seguros podem disseminar enfermidades, para isso as instalações

devem estar preparadas para suprir um conjunto de demandas (HELLER, 2006). Outro fenômeno relacionado à qualidade das águas é a bioacumulação, esta, segundo Meller (2009), ocorre quando “um ser vivo exposto a determinadas substâncias retém no seu protoplasma substâncias tóxicas sem conseguir eliminá-las”.

As águas subterrâneas foram por muito tempo consideradas uma forma potável de água e assim “geralmente, essa água não precisa de tratamento para consumo, em virtude do processo natural de filtragem do subsolo” (PHILIPPI JR.; MARTINS, 2018). No entanto, a “exploração deve ser realizada de forma racional, sustentável e integrada à exploração dos recursos hídricos superficiais” (PALMIER, 2006).

Além de que as águas superficiais, as subterrâneas podem ser contaminadas pela migração de substâncias químicas oriundas de aterros mal preservados, de áreas agrícolas e de resíduos industriais, derramamentos acidentais e vazamentos de tanques de armazenamento (BAIRD; CANN, 2011). Conforme Meller (2009), as águas subterrâneas estão sendo atingidas por muitos tipos de poluentes, sendo como principais fontes poluidoras os efluentes domésticos, industriais e agrícolas os quais se acumulam no subsolo, ameaçando os mananciais subterrâneos.

As principais fontes de poluição na área rural das águas de abastecimento provindas de poços subterrâneos são decorrentes do descarte inadequado de resíduos sólidos no solo, lançamento de esgotos diretamente sobre o solo e por meio dos poluentes agrícolas, onde a contaminação pode ocorrer através do manejo incorreto e da dispersão de agrotóxicos no meio ambiente. Sendo assim, os poluentes agrícolas são a segunda principal fonte de contaminação das águas subterrâneas e potencialmente a mais tóxica quando comparada aos despejos domésticos (BRASIL, 2007; LONDRES, 2011).

2.2 A CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO POR AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são utilizados para repelir ou eliminar alguma forma de vida indesejável, sendo consideradas pragas ou doenças que causam danos às plantações (OLIVEIRA FILHO, 2013). Estes compostos são definidos no Brasil por meio da Lei Federal nº 7.802/1989 (BRASIL, 1989), que em seu Art. 2º estabelece:

Agrotóxicos são os produtos químicos 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 em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

No Brasil, conforme o documento da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS/OMS, 1996), os agrotóxicos foram utilizados inicialmente em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser aplicados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960. Por meio destas inovações, surgiu a agricultura moderna, aliada também ao aumento da produtividade agrícola.

Entretanto à aplicação de agrotóxicos nos cultivares tornaram as doenças e pragas mais resistentes e para mitigar os seus impactos, novos produtos químicos foram desenvolvidos, dentre eles os inseticidas, herbicidas e fungicidas. Estes compartilham uma propriedade em comum, de interferir no metabolismo vital dos organismos aos quais eles são tóxicos (BAIRD; CANN, 2011).

Os inseticidas são amplamente utilizados na agricultura para a prevenção de insetos que atacam as culturas de alimentos e são utilizados pela sociedade, no controle de doenças transmitidas por insetos. Em contrapartida, os herbicidas são compostos químicos capazes de matar ou causar danos graves as plantas, desta forma são empregados para matar ervas daninhas sem causar prejuízo para a vegetação desejável. Para o controle de doenças de plantas causadas por fungos, bactérias e algas são utilizados os fungicidas, sendo que as formas químicas destes compostos são variadas (OLIVEIRA FILHO, 2013; COSTA, 2012; ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2008).

Os agrotóxicos vêm sendo utilizados intensivamente em todo o mundo, fazendo com que novos produtos sejam formulados. No ano de 2010, existiam 366 ingredientes ativos registrados no Brasil para o uso agrícola, sendo que estes ingredientes são capazes de formular 1.458 novos produtos para venda no mercado. Destaca-se que os herbicidas representam 48 % deste mercado, seguidos pelos inseticidas (25 %) e pelos fungicidas (22 %) (LONDRES, 2011; PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010).

Segundo dados do Departamento de Meio Ambiente do governo dos Estados Unidos da América, na década de 1970 os agricultores do país usavam 25 mil toneladas de agrotóxicos, no final da década de 1990 com a expansão do agronegócio os agricultores utilizavam 12 vezes mais (LONDRES, 2011).

O Brasil é um dos maiores produtores agropecuários do mundo, mas para manter tal produção é utilizado intensivamente sementes transgênicas e insumos químicos, como os

agrotóxicos. Conforme Pignati et al. (2017), a extensa área de plantio no Brasil proporcionou que o país fosse o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, desta forma, o estado que mais plantou no ano de 2015, foi o estado do Mato Grosso (MT) que plantou 13,9 milhões de hectares e consumiu 207 milhões de litros de agrotóxicos, seguido do Paraná (PR) com 10,2 milhões de hectares, consumindo 135 milhões de litros de agrotóxicos e o Rio Grande do Sul (RS) foi o estado que menos plantou no entanto foi o estado que consumiu mais agrotóxicos, com 8,5 milhões de hectares plantadas, utilizando 134 milhões de litros de agrotóxicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Área plantada, seus respectivos consumos de agrotóxicos e predominância de lavoura agrícola dos três maiores estados consumidores do Brasil no ano de 2015.

Unidade Federativa	Área plantada dos cultivos estudados (ha)	Consumo de agrotóxicos (L)	Predominância das lavouras agrícolas nas Unidades Federadas
MT	13.980.996	207.735.607	Soja (63 %), milho (25 %), algodão (4 %), Cana (2 %), feijão (2 %), arroz (1 %) e girassol (1 %).
PR	10.255.468	135.470.543	Soja (49 %), milho (23 %), trigo (12 %), cana (6 %), feijão (4 %) e fumo (1 %).
RS	8.543.105	133.788.693	Soja (59 %), arroz (13 %), trigo (10 %), milho (10 %), fumo (2 %), feijão (1 %) e uva (1 %).

Fonte: Adaptado de Pignati et al. (2017).

Notas: (MT) Mato Grosso; (PR) Paraná; (RS) Rio Grande do Sul.

O uso massivo de agrotóxicos tem provocado à contaminação dos alimentos, das águas e do ar, devido a dispersão de agrotóxicos no meio ambiente através do vento ou das águas, sendo que parte destes compostos apresentam a tendência de se acumular no solo e seus resíduos podem atingir as águas superficiais por escoamento, e as subterrâneas, através da lixiviação (LONDRES, 2011). Assim pode haver dezenas de produtos tóxicos em um corpo de água e cada um desses produtos devem ser considerados quando são avaliados os perigos dos toxicantes para a vida aquática ou para os seres humanos que utilizam esta água (SHEA, 2004).

Nos últimos anos, estudos têm documentado a contaminação de mananciais hídricos por vários tipos de agrotóxicos. Um desses estudos monitorou a presença de agrotóxicos nas águas superficiais e das chuvas em dois municípios do estado do Mato Grosso (Lucas do Rio Verde e Campo Verde), confirmando que os agrotóxicos afetaram o ambiente das áreas do entorno e próximas às zonas de plantio, sobretudo as águas superficiais, também foi possível

detectar a presença de agrotóxicos em amostras de águas de poços artesianos, rios, córregos e água da chuva nos centros urbanos de ambos municípios (MOREIRA et al., 2012b).

Conforme análise de 27 pontos de amostragem realizada por Veiga et al. (2006), em uma comunidade rural do Rio de Janeiro, em 19 pontos foi detectado alguma contaminação por agrotóxicos, sendo que em dois pontos a poluição por agrotóxicos estavam acima dos limites estabelecidos pela legislação, sendo assim, os resultados comprovaram a incidência da poluição por agrotóxicos em fontes de água.

Estudos demonstraram ainda a contaminação da água por carbofurano, clomazona, quincloraque, bentazona, 2,4-D, fipronil e propanil em áreas de cultivo de arroz (MARCHESAN et al., 2007, 2010; GRÜTZMACHER et al., 2008) e imidacloprido, atrazina e clomazona em áreas de cultivo de fumo (BORTOLUZZI et al., 2006) no Rio Grande do Sul.

A contaminação das águas subterrâneas é mais complexa, devido aos fatores geológicos, porém até mesmo estas águas de mais difícil acesso têm apresentado contaminação por resíduos de agrotóxicos, pois a qualidade das águas subterrâneas também pode ser dependente das atividades realizadas no solo. Soares, Faria e Rosa (2017), realizaram uma análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos, estes concluíram que 26,1 % dos ingredientes ativos presentes nos agrotóxicos empregados na região do município de Campo Novo do Parecis representam algum tipo de risco de contaminação às águas subterrâneas.

Os agrotóxicos quando aplicados na agricultura podem contaminar os sistemas hídricos superficiais e subterrâneos. Pois as características dos compostos dos agrotóxicos contribuem para lixiviar nos solos, dentre as características físico-químicas dos agrotóxicos consideram-se alguns índices entre eles o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) o qual visa estimar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos que não interagem eletricamente com a superfície do solo e o coeficiente de partição solo-água (K_{oc}), sendo este o coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo (PIASAROLO et al., 2008).

As características e o tipo do solo influenciam na maior capacidade de contaminação das águas subterrâneas, pois em solos com maior permeabilidade ocorre a lixiviação dos agrotóxicos e resulta na contaminação das águas subterrâneas e as substâncias químicas são carregadas juntamente com a água que abastece os lençóis freáticos e os aquíferos contaminando os mesmos (PEREIRA, 2004).

Desta forma, a água pode ser um meio de transmissão de contaminantes passíveis de ocasionarem danos ao meio ambiente e a saúde humana, pois o mecanismo de transmissão

que está relacionado à qualidade da água é a ingestão, o fato de ter algum componente nocivo presente na mesma contribui para o desenvolvimento de danos ao organismo humano (MELLER, 2009).

2.2.1 Efeitos deletérios dos agrotóxicos ao organismo humano

Um dos maiores perigos representados pelos agrotóxicos são referentes aos efeitos que eles podem provocar no organismo humano, pois as substâncias químicas, nem sempre são seletivas para as espécies-alvo, e os efeitos adversos podem ser observados em espécies não alvo, como por exemplo em seres humanos. A exposição prolongada aos agrotóxicos pode ocasionar implicações a curto, médio e longo prazos, pois alguns agrotóxicos propiciam processos de bioacumulação, afetando a cadeia alimentar e a saúde humana devido à toxicidade. Sendo assim os ciclos de intoxicação aguda podem ocasionar intoxicações subaguda e crônica, causando danos irreversíveis (PHILIPPI JR; MARTINS, 2018; COSTA, 2012; LONDRES, 2011; PIGNATI, 2017).

Neste sentido, Moreira et al. (2002) afirmaram que existem três principais formas de contaminação humana por agrotóxicos: (1) por via ocupacional, que se caracteriza pela manipulação, formulação e aplicação dos agrotóxicos; (2) por via ambiental, que se caracteriza pela dispersão e/ou distribuição dos agrotóxicos no ambiente, contaminando rios, fontes, lençóis freáticos, atmosfera e; (3) a contaminação via alimentar, caracterizada pela ingestão de água e de produtos contaminados por agrotóxicos.

Pesquisas demonstram, que a exposição a alguns agrotóxicos pode gerar alterações nos sistemas reprodutores masculinos e femininos, assim como mal formações fetais, bioacumular no organismo humano, e estar presente inclusive no leite materno provocando agravos na saúde dos recém-nascidos, por sua maior vulnerabilidade à exposição a agentes químicos presentes no ambiente e por se alimentarem exclusivamente com o leite materno até os seis meses de idade (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; CARNEIRO et al., 2015).

Devido a bioacumulação, a exposição a substâncias químicas em regiões de produção agrícola tem sido apontada como principais fatores causais dos cânceres. A International Agency for Research on Cancer (IARC/OMS) tem classificado agrotóxicos frequentemente utilizados nas lavouras como potencialmente cancerígenos (GUYTON et al., 2015). O estudo realizado por Jobim et al. (2010) comprovou que existe associação entre a mortalidade por câncer e o uso de agrotóxicos na região noroeste do Rio Grande do Sul, pois a concentração da economia na região é provinda da produção das monoculturas de soja, milho e trigo, sendo

assim, existe maior prevalência de mortalidade por neoplasias na microrregião de Ijuí se comparada as registradas no estado e no país.

No Quadro 1, está disposta a relação com a classificação dos agrotóxicos e os sintomas de intoxicação aguda e crônica dos principais grupos químicos de agrotóxicos.

Quadro 1 – Classificação, sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.

Classificação quanto a praga que controla	Classificação quanto ao grupo químico	Sintomas de intoxicação aguda	Sintomas de intoxicação crônica
Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossomiais e dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas, vômitos e contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
	Piretroides sintéticos	Irritações das conjuntivas, espirros, excitação e convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas e hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares e dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson e cânceres
	Fentalamidas	-	Teratogêneses
Herbicidas	Dinitroferóis e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertemia e convulsões	Cânceres (PCP - Formação de dioxinas) e cloroacnes
	Fenoxiacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos e fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres e teratogêneses
	Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desmaios e conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato e fibrose pulmonar

Fonte: Adaptado de OPAS/OMS (1996).

De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde (2012), as intoxicações agudas por agrotóxicos ocupam a segunda posição entre as intoxicações exógenas e entre os anos de 1999 e 2008 foram notificados 137.089 casos. Para detectar os efeitos deletérios que os agrotóxicos podem causar ao organismo humano, é preciso avaliar os efeitos toxicológicos das substâncias químicas.

2.3 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A ciência que estuda os efeitos nocivos das substâncias químicas sobre organismos vivos é chamada toxicologia. Desde a antiguidade, o homem conhecia os efeitos tóxicos dos venenos dos animais e de uma variedade de plantas. Após a Segunda Guerra Mundial, as autoridades governamentais decidiram tornar obrigatórios os testes de toxicidade para todos os tipos de medicamentos, para os agrotóxicos, domissanitários e aditivos alimentares, com os quais o ser humano entra em contato de forma direta e indireta (EATON; GILBERT, 2012; OGA; SIQUEIRA, 2014).

A toxicologia compreende basicamente a: toxicologia forense, esta incide sobre os aspectos médico-legais dos efeitos nocivos de produtos químicos sobre humanos e animais; toxicologia clínica, preocupa-se com as doenças relacionadas a exposições tóxicas e a toxicologia ambiental, a qual se preocupa com os efeitos nocivos causados pela interação dos agentes químicos com os organismos humanos (COSTA et al., 2008; EATON; GILBERT, 2012; OGA; SIQUEIRA, 2014).

A toxicologia ambiental está relacionada com a influência que os agentes tóxicos presentes no meio ambiente exercem sobre a saúde e o bem-estar de humanos, animais e plantas, por meio da interação desses organismos. Pois, considera-se que as substâncias químicas de origem antropogênica podem ocasionar efeitos danosos aos organismos vivos e aos processos biológicos (COSTA et al., 2008). Dentre os ecossistemas, os aquáticos são os receptáculos de uma grande variedade de contaminantes, sejam esses lançados no ar, no solo, ou diretamente nos corpos d'água. Desse modo, a ecotoxicologia aquática tem a finalidade de avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático (SISINNO; OLIVEIRA FILHO, 2013; COSTA et al., 2008).

Conforme Costa et al. (2008), as substâncias potencialmente tóxicas podem ser degradadas por processos que ocorrem na natureza, porém, algumas podem resistir aos processos de degradação e por isso são capazes de persistirem no ambiente por longos períodos de tempo.

Para suprir os impactos causados pela toxicidade, a Resolução nº 396 de 3 de abril de 2008 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Indica ainda que “a qualidade da água subterrânea deverá ser complementada, quando tecnicamente justificado, por meio de testes de toxicidade com organismos apropriados para cada um dos usos ou por análises toxicológicas adequadas.” A referida resolução define

análises toxicológicas como as “análises químicas ou bioquímicas realizadas com a função de determinar compostos tóxicos, seus produtos de biotransformação ou seus efeitos em materiais biológicos de organismos potencialmente expostos” (BRASIL, 2008).

Isto ocorre, pois, as análises físico-químicas utilizadas para o monitoramento da qualidade das águas não são suficientes, logo são incapazes de expor o efeito da biodisponibilidade das substâncias, da sua persistência no ambiente, da interação entre substâncias e da sua toxicidade ao ecossistema aquático (CAMPOS, 2015).

Portanto a utilização de testes de caráter ecotoxicológico, tornam-se cada vez mais importante nas avaliações de micropoluentes presentes nas águas, em especial aquelas utilizadas para o consumo humano. Pois esses testes, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, possibilitam estimar a toxicidade de substâncias e amostras ambientais, nos quais organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra sendo possível observar e quantificar os efeitos tóxicos produzidos sobre os mesmos (COSTA et al., 2008).

Os efeitos tóxicos de uma substância ou conjunto de substâncias podem ser agudos ou crônicos. Os testes de toxicidade aguda são utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância-teste quando a mesma é administrada em diferentes concentrações, por um curto período de tempo, seguindo da observação dos organismos-teste, normalmente, o efeito medido em estudos de toxicidade aguda com organismos aquáticos é a letalidade (BARROS; DAVINO, 2014; LEBLANC, 2004). Enquanto, os testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas expostas por um período que seja representativo do seu ciclo de vida, com o intuito de estudar as consequências na reprodução, desenvolvimento, crescimento e comportamento (CAMPOS, 2015).

Os testes toxicológicos, permitem conhecer características ecotoxicológicas de ecossistemas aquáticos lóticos. Devido as características de alta sensibilidade à exposição de contaminantes, são utilizados nos testes os microcrustáceos, como a *Dm*, plantas, como a alface *Lactuca sativa*, cebola *Allium cepa*, peixes, como o *Danio Rerio*, as bactérias, como o *Vibrio fischeri* e várias espécies de microalgas.

Estudos através de bioensaios com organismos indicadores de toxicidade aguda e crônica, foram desenvolvidos para avaliar a qualidade da água do reservatório que abastece o município de Fortaleza no Ceará. Para isso, a investigação dos efeitos tóxicos sobre os organismos foi realizada utilizando a alga *Selenastrum capricornutum*, o microcrustáceo *Dm* e sementes de alface *Lactuca sativa* para toxicidade aguda e *Dm* para toxicidade crônica. Foram

realizadas também as análises físico-químicas. As águas do reservatório não apresentaram nenhum efeito tóxico sobre os organismos testados, mostrando não oferecer riscos ao ambiente e à saúde humana, podendo ser considerado de boa qualidade para fins de abastecimento (DELLEMATRICE et al., 2011).

A verificação da qualidade da água do rio Cubatão (Norte) que abastece a cidade de Joinville, foi testada através de bioensaios com organismos indicadores de toxicidade aguda e crônica, para isso fez-se a exposição do organismo *Dm* nas amostras de água do rio e verificou-se a presença de toxicidade ou indício de toxicidade aguda em apenas dois dos cinco pontos na coleta de janeiro, entre as dez coletas mensais realizadas. Enquanto, a avaliação crônica permitiu verificar, em algumas situações, a exposição a amostras com substâncias tóxicas (CAMPOS, 2015).

No estudo realizado por Schell et al. (2018), foi proposto um modelo matemático de adição de concentração, para estimar os efeitos conjuntos causados por misturas complexas de agrotóxicos, para isso foi utilizado dados de monitoramento de agrotóxicos a longo prazo de quatro córregos com influência agrícola da Suécia, e posteriormente foram identificadas sete misturas de pesticidas com maior potencial ecotoxicológico, em seguida foram avaliadas as respostas agudas e crônicas das concentrações propostas pelo modelo matemático, através da exposição de *Dm*. A toxicidade aguda de três das misturas testadas foi adequadamente prevista usando o modelo matemático e todas as outras misturas indicaram uma interação antagonista dos pesticidas. Da mesma forma, para a exposição crônica, a aditividade dos efeitos da mistura foi observada em três misturas, enquanto duas indicaram interação antagonista e uma interação sinérgica leve com na concentração de adição.

Através dos estudos citados, é possível notar que microcrustáceos estão sendo utilizados amplamente para a realização de testes de toxicidade, sendo que estes são essenciais para caracterizar os efeitos tóxicos dos produtos químicos e seus perigos para seres humanos. Entretanto, para alcançar resultados coerentes nos testes é necessário que o organismo-teste seja bastante sensível a uma diversidade de agentes químicos e uma espécie que atende os critérios é o microcrustáceo do gênero *Daphnia* (EATON; GILBERT, 2012).

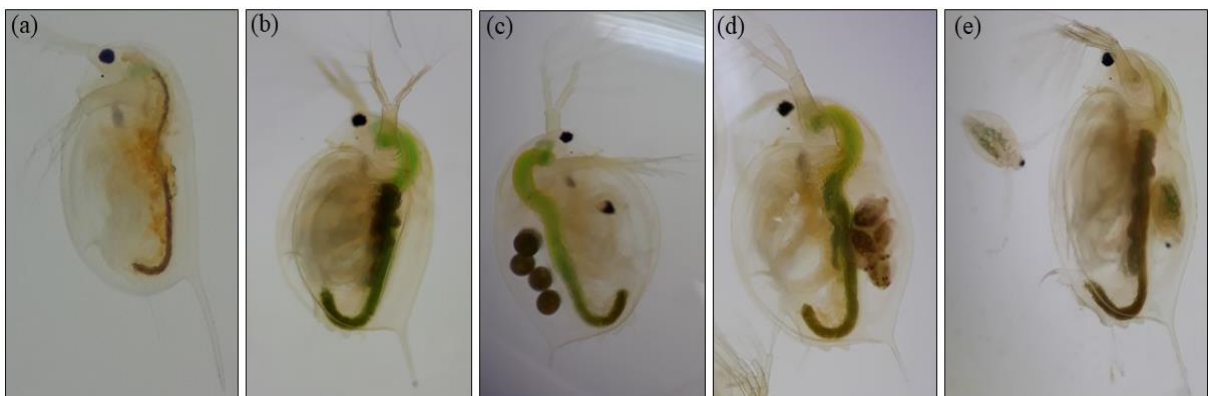
2.3.1 Uso de Microcrustáceo *Daphnia magna* para a determinação da toxicidade aguda em água

A *Daphnia magna* STRAUS, 1820, vulgarmente conhecida como pulga d' água, é um microcrustáceo planctônico de água doce de 5 à 6 mm de tamanho. A *Dm* atua como

consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão, principalmente de algas unicelulares. Os organismos deste gênero, possuem larga distribuição no hemisfério norte, sendo assim, não ocorrem naturalmente no Brasil, mas podem ser cultivadas. O cultivo depende essencialmente da qualidade da água e do alimento. A água utilizada para o cultivo pode ser reconstituída ou natural. As *Dm* são cultivadas em ambiente com luminosidade difusa, utilizando-se fotoperíodo de 12 a 16 horas de luz, com temperatura entre 18 °C e 22 °C, essas condições são obtidas através de estufas incubadoras. A alimentação pode ser constituída por algas verdes unicelulares de diversas espécies, e o fornecimento de alimento é diário, em casos excepcionais esse intervalo pode ser prolongado por até dois dias (KNIE; LOPES; 2004; ABNT, 2016).

Em condições ambientais favoráveis, reproduzem-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas. A média de vida da *Dm* é de sessenta dias, sendo que o seu desenvolvimento compreende quatro fases (Figura 1): ovo, neonato, jovem e adulta. Entre as fases de neonatos até a fase adulta as *Dm* passam por 3 a 5 processos de ecdises, onde o exoesqueleto desprende-se periodicamente, permitindo o crescimento do microcrustáceo, seguido da produção de um novo exoesqueleto (ABNT, 2016; CAMPOS, 2015).

Figura 1 – Exemplares de *Daphnia magna*.



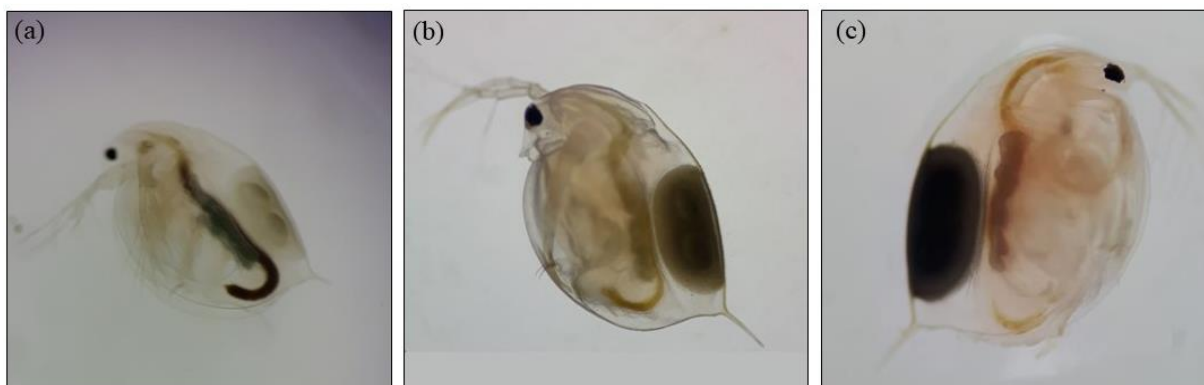
Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) Exemplar neonato; (b) Exemplar jovem; (c) Exemplar adulta fase inicial; (d) Exemplar adulta fase final; (e) Exemplar adulta com desprendimento de neonato.

Entretanto as condições ambientais desfavoráveis, que incluem superlotação e falta ou excesso de alimento, irão influenciar no cultivo de *Dm*, podendo originar organismos machos (Figura 2), neste caso são denominados de efípios, onde os ovos estão envolvidos por uma carapaça dura e escura, os quais são considerados ovos de resistência, pois são perduráveis à

desidratação e ao congelamento, estes ovos são liberados para o meio quando ocorre a ecdise ou mudança da carapaça (ABNT, 2016; CAMPOS, 2015).

Figura 2 – Exemplos de efípio em diferentes fases.



Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) Exemplo em desenvolvimento inicial da cápsula protetora de ovos; (b) Exemplo em desenvolvimento médio da cápsula protetora de ovos; (c) Exemplo em desenvolvimento mais avançado da cápsula protetora de ovos.

As *Dm* são utilizadas internacionalmente pelos órgãos e institutos ambientais como organismo-teste, pois geralmente seus descendentes são geneticamente idênticos e reagem sensivelmente a substâncias tóxicas, além de estar presente em abundância em meio aquático. Portanto, seu genótipo padrão garante respostas uniformemente seguras aos ensaios (KNIE; LOPES, 2004). Conforme a ABNT (2016), estes microcrustáceos são amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos agudos para avaliação da qualidade da água. Sendo assim, vários estudos estão sendo realizados na área para identificar a qualidade da água, conforme avaliação da qualidade da água de rios localizados na ilha de Santa Catarina, realizada por Fuzinato (2009), os testes de toxicidade aguda realizados com *Dm* para amostras de água superficial não apresentaram toxicidade para o organismo teste.

Afonso et al. (2007), realizaram um estudo ao longo de uma galeria subterrânea, captando amostras do antigo manancial de Paranhos, que foi uma das principais fontes de abastecimento de água à população da cidade de Porto (Portugal). Este estudo incluiu a coleta de amostras de água para estudo hidrogeoquímico convencional e isotópico e ecotoxicológico. Para a realização ecotoxicológica foram realizados bioensaios de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Dm*, onde para cada bioensaio foram preparadas cinco concentrações diferentes por diluição da amostra recolhida. As análises hidroquímicas apresentaram uma composição da água rica em nitrato e sulfato, provavelmente resultantes da intensa urbanização, esgotos domésticos e algumas práticas agrícolas. Entretanto, a respeito das

análises ecotoxicológicas, não foi registrada mortalidade em nenhum dos testes realizados, não sendo possível determinar a concentração letal 50 % (CL₅₀), a qual corresponde a dose que gera imobilidade em 50 % dos organismos expostos. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que as águas subterrâneas da área urbana do Porto não são próprias para consumo devido a grande quantidade de sulfato e nitrato, mas poderão ser adequadas para a irrigação.

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos é importante determinar os parâmetros físico, químicos e microbiológicos da amostra, pois assim é possível complementar os ensaios ecotoxicológicos com informações adicionais que possibilitem uma melhor compreensão do resultado de toxicidade. Ainda, os ensaios de toxicidade podem ser completados com informações obtidas nos ensaios genotóxicos, uma vez que estes permitem detectar efeitos tóxicos a nível celular e molecular, com elevada sensibilidade, praticabilidade e segurança (CAMPOS, 2015).

2.3.2 Uso de *Allium cepa* para a determinação da genotoxicidade em água

Os agentes químicos introduzidos no ambiente podem causar alterações genéticas nos organismos o que pode levar a vários problemas de saúde e também afetar as gerações futuras, uma vez que estas alterações podem ser hereditárias. Para isso foram desenvolvidos métodos capazes de avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos causados pelos agentes químicos, desta maneira é possível verificar alterações cromossômicas, anomalias mitóticas e presença de micronúcleos (THEODORAKIS et al., 1998; FARIA et al., 2017).

Desta forma, a necessidade de identificar compostos que reagem com o deoxyribonucleic acid (DNA) levou ao desenvolvimento de vários ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade em uma ampla gama de organismos para garantir a qualidade ambiental (HOUK, 1992). Dentre os ensaios de genotoxicidade, os materiais vegetais provaram ser úteis, desta forma, vários sistemas de teste de plantas estão em uso e são tão sensíveis e confiáveis quanto outros testes de curto prazo (FATMA et al., 2018).

Entre as espécies de plantas mais utilizadas para avaliar a contaminação ambiental, as mais frequentes são *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Crepis capillaris*, *Nicotiana tabacum*, *Tradescantia* e *Zea mays* (GRANT, 1994).

O *Allium cepa* foi considerado como o sistema de teste mais bem estabelecido para indicar a presença de produtos químicos mutagênicos. Sendo assim, o teste de *Allium* tem sido utilizado para análise de toxicidade em água, destacando-se pela sua eficiente cinética de

proliferação, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio, possui cromossomos em número reduzido e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994).

O teste genotóxico que utiliza o *Allium cepa* pode ser utilizado para avaliar o índice mitótico, a formação de micronúcleos, as anormalidades cromossômicas e nucleares na detecção de contaminantes, além de permitir a avaliação da ação de um agente e seus efeitos clastogênicos ou aneugênicos sobre o material genético (FERETTI et al., 2007; AUIB; FELZENSWALB, 2011; BRAGA; LOPES, 2015).

Conforme apresentado por Leme e Marin-Morales (2009), vários parâmetros do teste com *Allium cepa* podem ser utilizados para estimar a citotoxicidade e mutagenicidade de poluentes ambientais entre eles:

- Índice Mitótico (IM): caracterizado pelo número total de células em divisão do ciclo celular, tem sido utilizado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes. IM significativamente inferiores ao controle negativo podem indicar alterações provenientes da ação de substâncias químicas no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos e IM maiores que o controle negativo resultam do aumento na divisão celular, podendo ser prejudicial as células, levando a proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de tecidos tumorais. Tanto a redução, como o aumento do IM são indicadores importantes no monitoramento da poluição ambiental, especialmente para a avaliação de contaminantes tóxicos que apresentam potencial citotóxico.

- Aberrações cromossômicas: é caracterizada por alterações na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos, que podem ocorrer de forma espontânea e como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). As alterações cromossômicas estruturais podem ser induzidas por vários fatores, como quebras de DNA, inibição da síntese de DNA e replicação de DNA alterado. Para avaliar anormalidades cromossômicas através do teste de *Allium cepa*, vários tipos de aberrações são considerados nas diferentes fases da divisão celular entre elas a prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Segundo Rank (2003), uma das vantagens do teste *Allium cepa* é a possibilidade de expor o organismo de teste diretamente a misturas complexas sem tratamento prévio da amostra de teste.

Braga e Lopes (2015), realizaram um estudo de citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* como bioindicador, para isso foram coletadas amostras de água em três pontos do rio e analisados os parâmetros físico-

químicos no local de coleta, em seguida as amostras foram armazenadas e mantidas a 4 °C até o momento da realização dos testes. Para a avaliação da toxicidade foram selecionados três bulbos de cebola para cada ponto de coleta, os quais foram alocados em recipientes contendo a amostra de água coletada e mantidos a temperatura ambiente por 72 horas, sendo que o controle negativo foi realizado nas mesmas condições, porém em água destilada. Após o período de exposição as radículas foram cortadas e foram fixadas utilizando o fixador Carnoy, por um período de 12 horas, em seguida o material foi estocado em etanol 70 % e posteriormente foram confeccionadas três lâminas por amostra de água, sendo contadas 1.500 células por amostra. Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio e os valores obtidos no teste de toxicidade nos três pontos, indicaram que houve inibição do crescimento das raízes e consequente redução do IM, sendo assim, os resultados sugerem que no trecho do Rio Subaé, existem substâncias indutoras de efeito citotóxico e genotóxico que promoveram alterações no organismo-teste.

Considera-se ainda que, o teste de *Allium cepa* tem sido utilizado para determinar a genotoxicidade de uma grande variedade de poluentes ambientais, como metais pesados, agrotóxicos, hidrocarbonetos aromáticos, misturas complexas de poluentes e produtos químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

2.4 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL CONDIZENTE A POTABILIDADE, TOXICIDADE E PRESENÇA DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA UTILIZADA PARA O CONSUMO HUMANO

Inicialmente a Constituição Federal de 1988, no Art. 6º do Capítulo II, dispõe que todos devem ter acesso aos direitos sociais como a educação, saúde, alimentação, trabalho, moradia, lazer, segurança, entre outros direitos (BRASIL, 1998). O Capítulo IV, prevê que “todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”.

No Brasil, o CONAMA estabelece os padrões de qualidade da água para usos como abastecimento público e industrial, preservação da vida aquática, irrigação, recreação, agricultura, navegação e paisagismo. Esses padrões foram estabelecidos, usualmente a partir de experimentos realizados em centros de pesquisas de países desenvolvidos (TUCCI et al., 2009).

Dentre estas, a Resolução CONAMA nº 357/2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece padrões, parâmetros e diretrizes de lançamento de efluentes. Para fins de interpretação a mesma resolução define no Art. 2º, efeito agudo como o “efeito deletério aos organismos vivos causado por agentes físicos ou químicos, usualmente letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, em um curto período de exposição” (BRASIL, 2005). A Resolução CONAMA nº 357/2005 é complementada e alterada pela Resolução CONAMA nº 430/2011, a qual dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2011).

Ao se tratar das águas subterrâneas, adota-se a Resolução CONAMA nº 396/2008, que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas, complementa a Resolução CONAMA nº 357/2005, bem como aborda em seu Anexo I os parâmetros com maior probabilidade de ocorrência em águas subterrâneas, seus respectivos VMP e os limites de quantificação praticáveis (LQP) (BRASIL, 2008).

Com o intuito de controlar e vigiar a qualidade da água para consumo humano, foi instituída a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, a qual determinava que toda água destinada ao consumo humano deve obedecer ao padrão de potabilidade e está sujeita a vigilância da qualidade da água (BRASIL, 2011). Atualmente a Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS revogou a extinta Resolução nº 2.914/2011 do MS.

Segundo a Portaria de Consolidação nº 05/2017 do MS, cabe aos responsáveis pelo controle de qualidade da água, coletar amostras da água bruta para realizar análises e verificar a qualidade da água no ponto de captação. Conforme o Art. 24, presente no Anexo XX do Capítulo V “Toda água para consumo humano, oferecida coletivamente, deverá passar por processos de desinfecção ou cloração” (BRASIL, 2017). O Anexo XX da referida portaria, estabelece os VMP para cada parâmetro de qualidade da água de consumo humano. Podem ser citados a temperatura da água, pH, turbidez, compostos químicos orgânicos e inorgânicos, além de 27 compostos da classe de agrotóxicos, com seus respectivos VMP (BRASIL, 2017).

Com o intuito de restringir a presença de agrotóxicos nas águas de consumo humano, a Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul (SES) implementou a Portaria Estadual nº 320/2014, onde constam VMP para mais de 40 compostos agrotóxicos (RIO GRANDE DO SUL, 2014). Os agrotóxicos citados nesta legislação, na Resolução CONAMA nº 396/2008 e na Portaria de Consolidação nº 05/2017 do MS, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Padrão de potabilidade dos agrotóxicos citados na Portaria de Consolidação nº 05/2017 do MS, na Portaria Estadual nº 320/2014 e na Resolução CONAMA nº 396/2008.

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	P. 05/2017 ⁽²⁾ (µg L ⁻¹)	C. 320/2014 ⁽³⁾ (µg L ⁻¹)	P. 320/2014 ⁽³⁾ (µg L ⁻¹)	R. 369/2008 ⁽⁴⁾ (µg L ⁻¹)
2,4-D	94-75-7	30,0	-	-	30,0
Abamectina	71751-41-2	-	-	12,0	-
Acefato + Metamidofós	30560-19-1 (acefato) 10265-92-6 (metamidofós)	-	-	4,8	-
Atrazina	1912-24-9	2,0	-	-	2,0
Bifentrina	82657-04-3	-	-	120,0	-
Carbaril	63-25-2	-	-	18,0	-
Carbofurano	1563-66-2	7,0	-	-	7,0
Cianamida	420-04-2	-	-	12,0	-
Cipermetrina	52315-07-8	-	-	300,0	-
Ciproconazol	94361-06-5	-	-	60,0	-
Cletodim	99129-21-2	-	-	60,0	-
Clorimurom-etílico	90982-32-4	-	-	120,0	-
Clorotalonil	1897-45-6	-	-	180,0	-
Cresoxim-metil	143390-89-0	-	-	2400,0	-
Diazinona	333-41-5	-	-	12,0	-
Difenoconazol	119446-68-3	-	-	60,0	-
Diflubenzuron	35367-38-5	-	-	120,0	-
Dimetoato	60-51-5	-	-	12,0	-
Ditianona	3347-22-6	-	-	60,0	-
Epoxiconazol	133855-98-8	-	-	18,0	-
Etoxisulfuron	126801-58-9	-	-	240,0	-
Fenitrotiona	122-14-5	-	-	30,0	-
Fenoxaprop-p-etílico	71283-80-2	-	-	15,0	-
Fentiona	55-38-9	-	-	42,0	-
Fipronil	120068-37-3	-	-	1,2	-
Flutriafol	76674-21-0	-	-	60,0	-
Folpet	133-07-3	-	-	600,0	-
Fomesafem	72178-02-0	-	-	18,0	-
Gama-cialotrina	76703-62-3	-	-	6,0	-
Glifosato + AMPA	1071-83-6 (glifosato) 1066-51-9 (AMPA)	500,0	-	-	500,0
Hidrazida maleica	123-33-1	-	-	1800,0	-
Imazetapir	81335-77-5	-	-	1500,0	-
Imidacloprido	138261-41-3	-	-	300,0	-
Indoxacarbe	173584-44-6	-	-	60,0	-
Iodosulfurom-metílico	144550-06-1	-	-	180,0	-
Ioxinil octanoato	3861-47-0	-	-	30,0	-
Lambda-cialotrina	91465-08-6	-	-	30,0	-
Malationa	121-75-5	-	-	-	190,0
Mesotriona	104206-82-8	-	-	30,0	-
Metalaxil-m (Mefenoxam)	70630-17-0	-	-	480,0	-
Metamitrona	41394-05-2	-	-	150,0	-
Metidationa	950-37-8	-	-	6,0	-
Metiram + Mancozebe (expreso em CS2)	9006-42-2 (metiram) 8018-01-7 (mancozebe)	-	-	180,0	-
Metsulfurom-metílico	74223-64-6	-	-	60,0	-
Picoxistrobina	117428-22-5	-	-	258,0	-

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	P. 05/2017⁽²⁾ (µg L⁻¹)	C. 320/2014⁽³⁾ (µg L⁻¹)	P. 369/2008⁽⁴⁾ (µg L⁻¹)	R. 369/2008⁽⁴⁾ (µg L⁻¹)
Profenofós	41198-08-7	60,0	-	-	-
Propanil	709-98-8	-	-	-	20,0
Simazina	122-34-9	2,0	-	-	2,0
Tebuconazol	107534-96-3	180,0	-	-	-
Tembotriona	335104-84-2	-	2,4	-	-
Tetraconazol	112281-77-3	-	30,0	-	-
Tiametoxam	153719-23-4	-	120,0	-	-
Tiodicarbe	59669-26-0	-	180,0	-	-
Tiofanato-metilico + Carbendazim + Benomil (2914 - 120 µg/L) - (expresso em carbendazim)	23564-05-8 (tiofanato- metilico) + 10605-21-7 (carbendazim) + 17804-35-2 (benomil)	-	-	120,0	-
Triciclazol	41814-78-2	-	180,0	-	-

Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2014) e do Conselho Nacional de Meio Ambiente (BRASIL, 2008).

Notas: (1) CAS é o número de referência de compostos e substâncias químicas adotadas pelo Chemical Abstract Service; (2) Valor máximo permitido de acordo com a Portaria de Consolidação Nº 05/2017 do MS; (3) Valor máximo permitido de acordo com a Portaria Nº 320/2014 da SES; (4) Valor máximo permitido para consumo humano da água subterrânea de acordo com a Resolução Nº 396/2008 do CONAMA.

Segundo Zambolim e Jesus Jr (2008), os agrotóxicos devem ser inócuos ao homem, as plantas, animais e ao meio ambiente, pois estes causam efeitos deletérios. O conhecimento acerca da toxidez dos agrotóxicos para a saúde humana é relevante a ponto de existirem leis que controlam os resíduos destes compostos que poderão entrar em contato com os seres humanos.

3 METODOLOGIA

O presente estudo buscou avaliar a toxicidade da amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público poluída e fortificada com agrotóxicos em um município localizado na Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, o desenvolvimento deste trabalho envolveu atividades de coleta de amostra, cultivo do microcrustáceo *Dm*, bem como o cultivo da alga *Desmodesmus subspicatus* e análises laboratoriais envolvendo os parâmetros físico-químicos, microbiológicos, detecção e quantificação de agrotóxicos. Para a realização das análises e testes de toxicidade, foram utilizadas as infraestruturas do Laboratório de Águas e Ecotoxicologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) *campus* Cerro Largo.

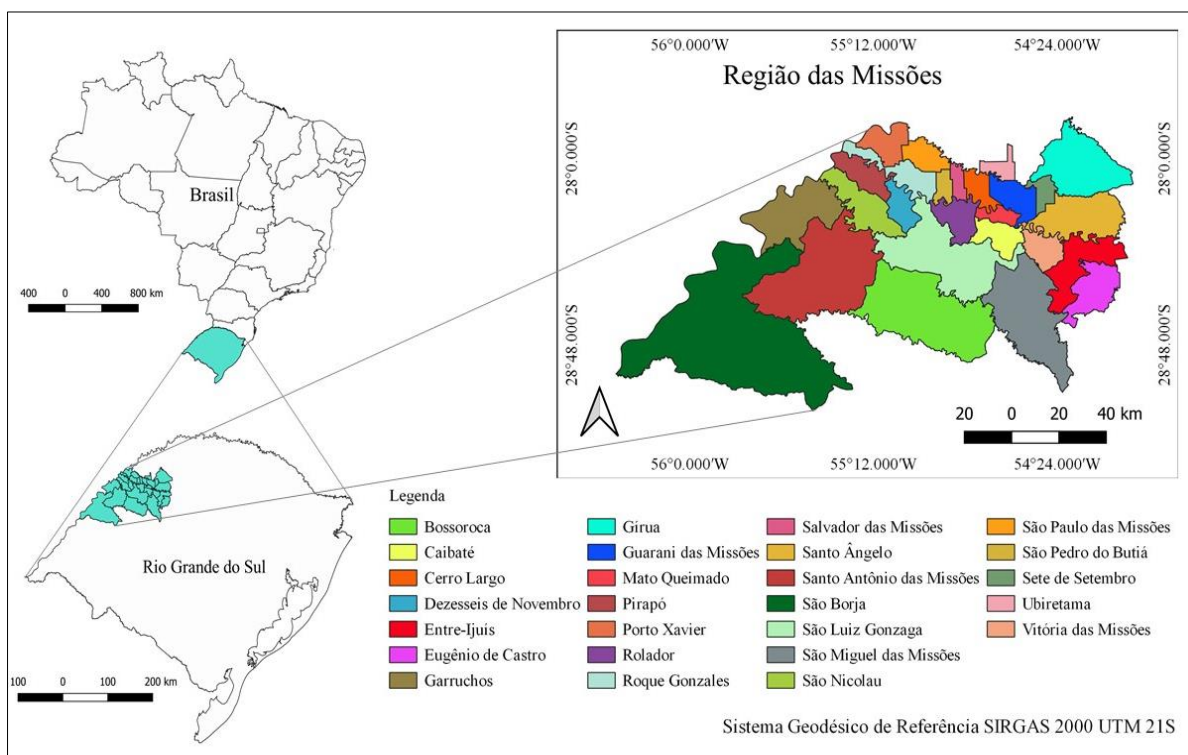
3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo compreende um dos municípios da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul, a qual é composta por vinte e seis municípios, sendo estes: Bossoroca, Caibaté, Cerro Largo, Dezesseis de Novembro, Entre-Ijuís, Eugênio de Castro, Garruchos, Giruá, Guarani das Missões, Mato Queimado, Pirapó, Porto Xavier, Rolador, Roque Gonzales, Salvador das Missões, Santo Ângelo, Santo Antônio das Missões, São Borja, São Luiz Gonzaga, São Miguel das Missões, São Nicolau, São Paulo das Missões, São Pedro do Butiá, Sete de Setembro, Ubiretama e Vitória das Missões, conforme pode ser visualizado na Figura 3.

Na Região das Missões são utilizados diferentes tipos de mananciais no abastecimento urbano de água, sendo que os municípios de São Luiz Gonzaga e Porto Xavier utilizam mananciais subterrâneos e superficiais para abastecimento urbano, Santo Ângelo utiliza manancial superficial, e os demais municípios urbanos utilizam mananciais subterrâneos. Grande parte das áreas rurais destes municípios são abastecidas por mananciais subterrâneos (ANA, 2019).

Conforme o Colegiado de Desenvolvimento Territorial (CODETER, 2006), existem dois tipos de solos na Região das Missões, na porção norte e nas regiões coloniais que apresentam maior declividade está localizado o latossolo, este apresenta características argilosas e na porção sul, está localizado os solos basálticos menos desenvolvidos e o relevo é levemente ondulado.

Figura 3 – Localização dos municípios pertencentes à Região das Missões do Estado do Rio Grande do Sul.



Fonte: Autora, 2019.

A economia dos municípios pertencentes à Região das Missões é baseada na agricultura e praticada por agricultores que fazem uso do solo para cultivo de soja, trigo, milho, mandioca e na criação de suínos e bovinos. Devido a utilização de insumos químicos, agrotóxicos e de mecanização, nas culturas de soja e trigo, a área apresenta problemas ambientais relacionados a contaminação do solo e da água (PEREIRA, 2014).

No ano de 2014, a Região das Missões apresentava uma média de uso de agrotóxicos de 147,73 litros km^{-2} ano^{-1} , sendo que para o uso de agrotóxicos em geral a média era de 490,30 litros km^{-2} ano^{-1} . Dentre os agrotóxicos críticos mais utilizados na região, estão o glifosato, acefato, diflubenzuron, carbofurano, cipermetrina e metamidofós. (PEREIRA, 2014).

Os municípios da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul pertencem ao bioma pampa e mata atlântica. O clima é subtropical com temperaturas médias no verão superiores a 20 °C e, no inverno atingindo graus negativos, com formação de geadas. O regime de chuvas é distribuído (CODETER, 2006).

O aquífero predominante na Região das Missões é o aquífero Guarani este ocupa aproximadamente 55 % da área do estado do Rio Grande do Sul, apresentando grande

diversidade de potencialidade e qualidade. Na Região das Missões o aquífero Guarani apresenta potencialidade muito variável devido ao condicionamento geológico e estrutural das camadas aquíferas. Localmente pode apresentar aumento na salinidade das águas e presença de íons fluoreto, indesejáveis para abastecimento público (MACHADO; FREITAS, 2005).

3.2 PROCEDIMENTO DE COLETA, PRESERVAÇÃO E LOCAL DE AMOSTRAGEM DA ÁGUA

As águas de abastecimento público utilizadas neste estudo são provenientes de manancial subterrâneo (Figura 4), que abastece uma comunidade rural localizada em um dos municípios pertencentes a Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul. A coleta de amostra foi realizada na estação do inverno, considerando a aplicação de agrotóxicos devido ao uso do solo para os cultivos da época.

Figura 4 – Poço em que foi realizada a coleta.



Fonte: Autora, 2019.

Os procedimentos de coleta e preservação de amostras de água foram padronizados e realizados conforme estabelecido na ABNT NBR n° 9.898/1987 que aborda sobre a “Preservação e Técnicas de Amostragem e Efluentes Líquidos e Corpos Receptores”, Guia

Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de água, sedimentos comunidade aquáticas e efluentes líquidos elaborado pela Agência Nacional de Águas (ANA) e Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB) (CETESB, 2011).

A amostra usada para as análises foi coletada por meio de uma torneira que permitia a retirada da água, instalada na saída do poço e armazenada em frascos de vidro âmbar devidamente higienizados, as mesmas foram transportadas para o Laboratório de Águas e Ecotoxicologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Cerro Largo/RS, onde foram refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua análise.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

Os parâmetros condutividade elétrica, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura foram medidos *in situ*, com auxílio da sonda multiparâmetro (YSI Professional Plus). Para estes parâmetros, foi coletada uma amostra de água em um béquer higienizado e posteriormente realizou-se a leitura com a sonda multiparâmetro.

Após a chegada da amostra ao Laboratório de Águas e Ecotoxicologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Cerro Largo/RS, foram efetuados os ensaios *ex situ*, onde verificou-se absorvância ($\lambda - 254\text{ nm}$), coliformes totais, cor aparente, dureza, fluoreto, *Escherichia coli*, pH e turbidez.

Para as análises *in situ* e *ex situ* os parâmetros foram analisados em triplicata e posteriormente foi realizada as médias dos valores obtidos para os parâmetros, ainda foram utilizadas como referência as normas apresentadas pela American Public Health Association (APHA, 2005). Os parâmetros, as referências metodológicas e os equipamentos utilizados nas análises estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados.

Parâmetro	Referência metodológica	Equipamento
Absorvância ($\lambda - 254\text{nm}$)	5910b APHA ⁽¹⁾ (2005)	Evolution 201 UV-Visível Spectrophotometer
Coliformes totais (P/N ⁽²⁾)	SM 9221 C APHA ⁽¹⁾ (2005)	Kit COLItest [®]
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	2510B APHA ⁽¹⁾ (2005)	Sonda YSI Professional Plus
Cor aparente (uH)	2120 APHA ⁽¹⁾ (2005)	Colorímetro Del Lab [®] DLA-COR
Dureza (mg $\text{CaCO}_3\text{ L}^{-1}$)	FUNASA ⁽⁴⁾ (2013)	Titulação com EDTA
Fluoreto (mg L^{-1})	-	-
<i>Escherichia Coli</i> (P/N ⁽²⁾)	SM 9221 F APHA ⁽¹⁾ (2005)	Kit COLItest [®]
Oxigênio dissolvido (mg $\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	4500 G APHA ⁽¹⁾ (2005)	Sonda YSI Professional Plus
pH ⁽³⁾	4500 APHA ⁽¹⁾ (2005)	MS TecnoPON MPA 210
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2550b APHA ⁽¹⁾ (2005)	Sonda YSI Professional Plus

Parâmetro	Referência metodológica	Equipamento
Turbidez (uT)	2130 APHA ⁽¹⁾ (2005)	Turbidímetro PoliControl AP 2000

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Notas: (1) American Public Health Association; (2) Positivo/negativo em 100 mL⁻¹; (3) potencial Hidrogeniônico (4) Fundação Nacional de Saúde.

Os parâmetros físico-químicos analisados foram escolhidos devido ao fato destes serem utilizados em análises de qualidade de água para abastecimento humano. Ainda os parâmetros pH e dureza, de acordo com a ABNT NBR nº 12.713/2016, interferem nas análises realizadas com *Dm*, sendo imprescindível realizar a análise desses parâmetros, pois amostras com baixos e elevados valores de carbonato de cálcio (CaCO₃) e amostras com pH ácido ou básico afetam negativamente o cultivo e podem interferir nos resultados das análises causando imobilidade e letalidade dos microcrustáceos. Os parâmetros microbiológicos (*Escherichia coli* e coliformes totais) foram analisados devido ao fato de que estes devem estar ausentes em água para consumo humano.

3.4 PREPARAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

A quantificação dos agrotóxicos foi realizada com o intuito de quantificar e detectar a variedade de agrotóxicos presentes na amostra de água de abastecimento do estudo para posteriormente realizar a fortificação da amostra de água coletada com os agrotóxicos.

Para a detecção e quantificação dos agrotóxicos foi validado o método considerando os procedimentos descritos no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2019), no Laboratório de Química Instrumental da UFFS, *campus* Cerro Largo/RS, para isso foi utilizado como equipamento o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas (CLAE-EM), sendo este da marca Shimadzu LC-MS 2020, com fonte de ionização por Ionização por Electrospray (ESI), analisador de massa tipo Quadrupolo e sistema de aquisição de dados LabSolutions®.

As análises referentes à detecção de agrotóxicos não foram realizadas neste estudo, porém os resultados foram obtidos dos estudos realizados no mesmo período por equipe de estudos complementares, os quais perfazem o atendimento Chamada Universal MCTIC/CNPq nº 28/2018 referente ao Projeto denominado “Reator de leito fixo com energia solar fotovoltaica empregado na remoção de agrotóxicos da água de abastecimento público na área rural” sob coordenação da orientadora deste trabalho.

3.4.1 Limpeza de materiais e preparo da amostra

A limpeza dos materiais utilizados nas coletas e no laboratório é imprescindível para qualquer tipo de análise, pois através da mesma é possível eliminar compostos provenientes da matriz, evitando assim possíveis contaminações que poderão interferir nas análises (ZINI, 2016; CALDAS, 2009).

Sendo assim, os frascos de vidro âmbar utilizados para a coleta da amostra de água para análises de agrotóxicos, bem como toda a vidraria e materiais utilizados em laboratório para a análise de agrotóxicos foram lavados e mantidos com detergente Extran[®] 5 % (Merck[®]) por 24 horas, em seguida foram enxaguados com água da torneira e enxaguados novamente com água destilada e ultrapura.

De acordo com a metodologia utilizada e com o objetivo de evitar a presença de compostos que interferissem na análise e saturassem os cartuchos no momento da extração em fase sólida, foram filtradas 250 mL de água da amostra através de um sistema de filtração de membranas (Figura 5 a), composto por um copo de vidro, funil onde foi acrescentada a membrana filtrante de acetato de celulose, garra para unir e sustentar a vedação dos itens anteriores, rolha de silicone para vedação, kitassato e uma bomba a vácuo. Após a etapa de filtração, a amostra foi armazenada em balão volumétrico de 250 mL e acidificada a pH de $3,0 \pm 0,3$ para isso foi utilizado ácido fosfórico 50 % padrão analítico (PA).

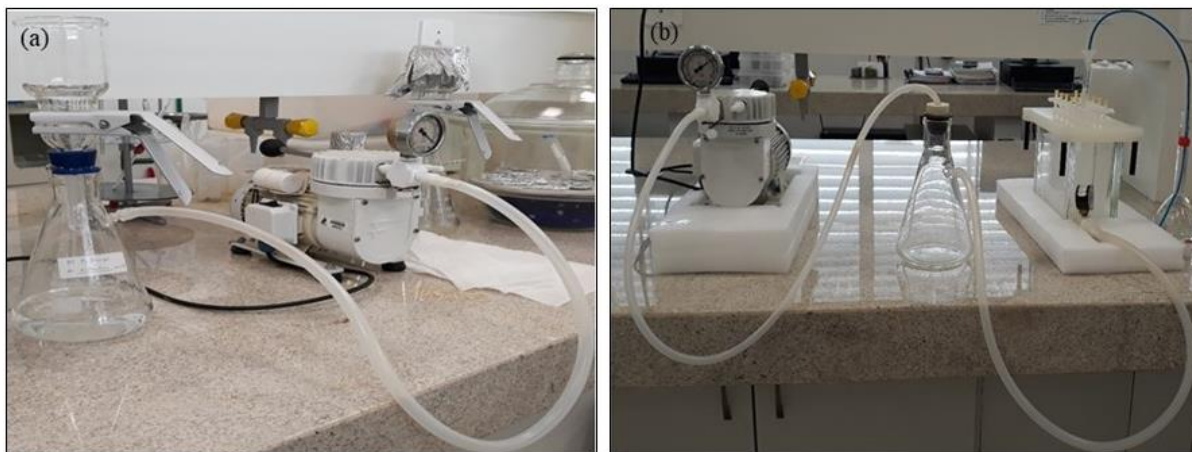
A Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é uma técnica de separação líquido-sólido aplicada com a finalidade de isolar os analitos de interesse contidos em uma matriz. Podendo, posteriormente, ser analisado em um método instrumental, como a cromatografia (SCHNEIDER, 2013).

Desta forma, após a filtração, a amostra foi submetida à técnica de SPE, com o intuito de realizar a extração dos agrotóxicos da amostra de água. Para isso, foi seguida as etapas de extração que consistem na ativação do sorvente, percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente, eliminação dos interferentes da matriz, eluição dos analitos e por fim concentração do composto de interesse .

Para suprir a primeira etapa foi montado um sistema de sucção, utilizando-se uma *manifold* para acoplar o cartucho C18, ligada a uma bomba a vácuo, sendo que, entre a bomba e a *manifold* foi colocado um kitassato, com a finalidade de armazenar a água proveniente da amostra após a sucção, conforme a Figura 5 b. Para iniciar a extração em cartucho C18, a alíquota foi preparada em balão volumétrico de 250 mL. A ativação do sorvente foi realizada a partir da adição de 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura acidificada a pH 3 com ácido

fosfórico. A alíquota de 250 mL foi percolada de modo a ser adsorvida pelo cartucho. Após a percolação, devido a impossibilidade de realizar imediatamente a análise, o cartucho foi envelopado com papel alumínio e acondicionado no congelador.

Figura 5 – Procedimento utilizado para a Extração em Fase Sólida.



Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) Sistema de filtração de membrana utilizado para a amostra; (b) Sistema de extração em fase sólida.

Posteriormente, os membros do projeto da Chamada Universal MCTIC/CNPq nº 28/2018 no Laboratório de Química Instrumental da UFFS, *campus* Cerro Largo/RS, realizaram a eluição dos analitos adsorvidos. Para tanto, foi preparado o sistema de *manifold*, onde foram encaixadas em sua parte interna agulhas especiais e tubos de ensaio volumétricos para coleta das amostras. Preparando o sistema, foi adicionado 1 mL de metanol no cartucho e em seguida foi realizado a sua percolação com auxílio da bomba à vácuo. O mesmo procedimento foi realizado para completar o volume de 2 mL de amostra, onde posteriormente este volume de 2 mL foi armazenado em *vial* para análise cromatográfica, juntamente com os brancos constituídos de metanol.

Por fim, a amostra foi posta no CLAF-EM para ser realizada a análise dos compostos de interesse. Para isso, as condições de operação do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência consistiram no emprego de uma coluna analítica com C18. Sendo que a temperatura do forno da coluna foi estabilizada em 30 °C e a fase móvel foi composta por uma mistura de água ultrapura (A) e metanol (B), ambos com ácido fórmico 0,1 % e formiato de amônia 5 mmol L⁻¹. O modo de eluição seguiu um comportamento por gradiente, iniciando com 90 % de A e 10 % de B, cuja condição retorna e é mantida no último minuto de corrida, perfazendo um total de corrida de 13 minutos e vazão de 0,1 mL min⁻¹.

Dentre os agrotóxicos empregados na região, foram desenvolvidos métodos para determinar resíduos de vinte e quatro compostos, sendo que suas características estão descritas na Tabela 4, as quais foram obtidas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019).

Tabela 4 – Características dos agrotóxicos analisados.

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	Fórmula molecular	Classe	Classificação Toxicológica ⁽²⁾	Aplicação ⁽³⁾
2,4-D	94-75-7	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	Herbicida	Classe I	Arroz, aveia, cana-de-açúcar, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo.
Atrazina	1912-24-9	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	Herbicida	Classe III	Cana-de-açúcar, milho e sorgo.
Azoxistrobina	131860-33-8	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	Fungicida	Classe III	Alface, amendoim, arroz, aveia, cana-de-açúcar, feijão, melancia, melão, milho, pimentão, soja, sorgo e trigo.
Bentazona	25057-89-0	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	Herbicida	Classe III	Amendoim, arroz, feijão, milho, soja e trigo.
Carbofurano	1563-66-2	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematocida	Classe I	Banana, Café e cana-de-açúcar.
Ciproconazol	94361-06-5	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	Fungicida	Classe III	Algodão, alho, arroz, aveia, eucalipto, melancia, melão, milho, pêssego, soja e trigo.
Clomazona	81777-89-1	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	Herbicida	Classe III	Algodão, arroz, cana-de-açúcar, eucalipto, mandioca, melão, milho, pimentão e soja.
Clorpirifós	2921-88-2	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Inseticida, formicida e acaricida	Classe II	Algodão, feijão, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo.
Difenoconazol	119446-68-3	C ₁₉ H ₁₇ C ₁₂ N ₃ O ₃	Fungicida	Classe I	Abóbora, abobrinha, amendoim, arroz, aveia, eucalipto, feijão, melancia, melão, milho, pepino, pimentão, soja e trigo.
Epoxiconazol	135319-73-2	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	Fungicida	Classe III	Algodão, amendoim, arroz, aveia, banana, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, soja, sorgo e trigo.
Fipronil	120068-37-3	C ₁₂ H ₄ C ₁₂ F ₆ N ₄ OS	Inseticida, cupinicida e formicida	Classe II	Algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, eucalipto, feijão, milho, pastagem, soja e trigo.
Imazapique	104098-48-8	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	Herbicida	Classe II	Amendoim, arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagem e soja.
Imazetapir	81335-77-5	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃	Herbicida	Classe III	Arroz, feijão e soja.
Malationa	121-75-5	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Inseticida e acaricida	Classe III	Algodão, feijão, pastagem e soja.
Metomil	16752-77-5	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	Inseticida e acaricida	Classe I	Algodão, arroz, batata, feijão, milho, soja, sorgo e trigo.

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	Fórmula molecular	Classe	Classificação Toxicológica ⁽²⁾	Aplicação ⁽³⁾
Metsulfurom-etílico	74223-64-6	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	Herbicida	Classe III	Arroz, aveia, pastagem e trigo.
Penoxsulam	219714-96-2	C ₁₆ H ₁₄ F ₅ N ₅ O ₅ S	Herbicida	Classe III	Arroz.
Pirazossulfurom-etílico	93697-74-6	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₇ S	Herbicida	Classe III	Arroz.
Pirimicarbe	23103-98-2	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	Inseticida	Classe II	Batata, feijão e trigo.
Piraclostrobina	175013-18-0	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	Fungicida	Classe II	Abóbora, abobrinha, algodão, amendoim, arroz, aveia, batata, cana-de-açúcar, eucalipto, feijão, mandioca, melancia, melão, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo.
Profenofós	41198-08-7	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	Inseticida e acaricida	Classe II	Algodão, amendoim, batata, feijão, mandioca, melancia, milho, soja e tomate.
Propiconazol	60207-90-1	C ₁₅ H ₁₇ C ₁₂ N ₃ O ₂	Fungicida	Classe II	Algodão, alho, aveia, banana, feijão, milho, soja e trigo.
Simazina	122-34-9	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	Herbicida	Classe III	Banana, cana-de-açúcar, milho e sorgo.
Tebuconazol	107534-96-3	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Fungicida	Classe IV	Abóbora, abobrinha, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, cana-de-açúcar, eucalipto, feijão, mandioca, melancia, melão, milho, soja, sorgo e trigo.
Tiabendazol	148-79-8	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	Fungicida	Classe IV	Arroz, banana, batata, cana-de-açúcar, feijão, melancia, melão, milho, soja e sorgo.
Tiametoxam	153719-23-4	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	Inseticida	Classe III	Abobrinha, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, batata, banana, cana-de-açúcar, eucalipto, feijão, mandioca, melancia, melão, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo.
Trifloxistrobina	141517-21-7	C ₂₀ HF ₃ N ₂ O ₄	Fungicida	Classe II	Abóbora, abobrinha, amendoim, arroz, aveia, cana-de-açúcar, eucalipto, feijão, mandioca, melancia, melão, milho, pêssego, soja e trigo.

Fonte: ANVISA, 2019.

Notas: (1) Número de referência de compostos e substâncias químicas adotadas pelo Chemical Abstract Service; (2) Classe I – extremamente tóxico; Classe II – Altamente tóxico; Classe III – Medianamente tóxico; Classe IV – Pouco tóxico; (3) Algumas aplicações na agricultura.

3.5 AGROTÓXICOS UTILIZADOS PARA A FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Devido a detecção de multiresíduos de agrotóxicos na água de abastecimento público e ao elevado índice de aplicação dos herbicidas nos municípios da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul, foi optado neste estudo por fortificar uma amostra de água de abastecimento público com os herbicidas comerciais glifosato e 2,4-D. Pois de acordo com Oliveira Filho (2013), os herbicidas se encontram entre as substâncias mais preocupantes, devido as suas características de mobilidade no solo, sendo detectados com mais facilidade nas águas subterrâneas.

Com o intuito de averiguar os efeitos que estes agrotóxicos causam quando combinados em uma mesma amostra, foi utilizado o herbicida sistêmico, do grupo químico ácido ariloxialcanoico Aminol® 806 e o herbicida pós-emergente, sistêmico, de ação total, não seletivo Trop® ambos da marca Adama®, sendo que suas características estão descritas na Tabela 5. Para determinar as concentrações com base nos valores máximos permitidos por legislação destes compostos foi proposto o delineamento experimental.

Tabela 5 – Características dos agrotóxicos utilizados.

Agrotóxico	Composição	Classificação Toxicológica ⁽¹⁾	Aplicação ⁽²⁾
Aminol® 806	Dimethylammonium (2,4 dichlorophenoxy) acetate (2,4 D dimetilamina) 806,00 g L ⁻¹ Equivalente Ácido de 2,4D 670,00 g L ⁻¹ Outros ingredientes 429,00 g L ⁻¹	Classe I	Pós-emergência das plantas infestantes e das culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagem e trigo, bem como, no manejo em dessecação em pré-plantio de milho, soja e trigo.
Trop®	N-(phosphonomethyl) glycine (GLIFOSATO)480,00 g L ⁻¹ Equivalente ácido.... 355,67 L ⁻¹ Outros Ingredientes.... 683,90 g L ⁻¹	Classe III	Controle das plantas infestantes em aplicação em área total antes da semeadura nas culturas da soja, milho, trigo e arroz no sistema de plantio direto ou mínimo.

Fonte: Adama (2019 a, b).

Notas: (1) Classe I – extremamente tóxico; Classe II – Altamente tóxico; Classe III – Medianamente tóxico; Classe IV – Pouco tóxico; (2) Algumas aplicações na agricultura.

3.5.1 Delineamento experimental e análise estatística

No estudo foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Sendo este o DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central totalizando 12 experimentos. Os níveis apresentados neste estudo são referentes à concentração entre os herbicidas envolvidos em cada experimento. Na Tabela 6 estão dispostos os níveis das variáveis, considerando o ponto central para o glifosato e 2,4-D o VMP estabelecido na Portaria de Consolidação nº 05/2017 do MS, sendo $500,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato e $30,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-D.

Tabela 6 – Níveis das variáveis.

Variáveis	Codificação das variáveis	Níveis ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
		-1,414	-1	0	1	1,414
Glifosato	G	136,00	280,00	500,00	720,00	864,00
2,4-D	D	6,77	16,00	30,00	44,00	53,23

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores do DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central, com as respectivas condições experimentais.

Tabela 7 – DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central.

Experimento	Condições experimentais	
	Glifosato	2,4-D
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,414	0
6	1,414	0
7	0	-1,414
8	0	1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Os indicadores de eficiência dos experimentos realizados por meio do delineamento experimental foram os efeitos destes dois herbicidas em diferentes concentrações. Para averiguar estes efeitos foram utilizadas como variáveis resposta os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda com *Dm* e teste de genotoxicidade com *Allium cepa*.

Os resultados obtidos foram analisados através do Software Statistica® (Copyright 1984-2007 by statsoft, Inc) no modo experimental design, sendo realizadas análises dos principais efeitos de interação, diagrama de pareto, análise de variância (ANOVA) e gráficos de superfícies de resposta bidimensionais e tridimensionais.

3.6 ANÁLISE TOXICOLÓGICA

O teste de toxicidade foi realizado com o intuito de averiguar os efeitos causados devido à fortificação da amostra de água subterrânea com agrotóxicos, o teste de toxicidade aguda foi desenvolvido no Laboratório de Águas e Ecotoxicologia da UFFS, *campus* Cerro Largo/RS.

Foram realizados testes de toxicidade aguda tendo como organismo teste o microcrustáceo planctônico de água doce *Dm*. A escolha da *Dm* como organismo-teste foi baseado no fato de ser um organismo usado internacionalmente para testes toxicológicos e por estar sendo cultivado no Laboratório de Águas e Ecotoxicologia da UFFS, *campus* Cerro Largo/RS, além da ampla e frequente reprodução e aos seus descendentes ser geneticamente idênticos o que possibilita a realização de testes de toxicidade e uniformidade nos ensaios.

3.6.1 Cultivo do microcrustáceo *Daphnia magna*

O cultivo do microcrustáceo *Dm* foi realizado segundo as indicações da ABNT NBR nº 12.713/2016. Sendo que a cultura depende essencialmente da qualidade da água e do alimento, para isso a água deve garantir boas condições de vida para as *Dm*. Visando a boa reprodução, foi utilizado no cultivo o meio de cultura denominado meio M4 constituído de elementos traços e vitaminas descritos na ABNT NBR nº 12.713/2016.

Após a preparação esta água reconstituída foi aerada por um período de 12 a 24 horas, para a estabilização do pH, estabilização total dos sais e saturação de OD. Em seguida foram verificados os valores de pH e dureza, sendo que para a água de cultivo os valores de dureza deveriam estar entre 175 e 225 mg CaCO₃ L⁻¹ e de pH entre 7,6 e 8,0, para posterior utilização no cultivo.

A cultura foi iniciada com apenas alguns exemplares de *Dm*, originários do Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo cultivadas em condições laboratoriais e reproduzindo-se por partenogênese. Em seguida as *Dm* foram cultivadas em béqueres de vidro com capacidade para 1.000 e 2.000 mL, nos quais foram

adicionados o volume máximo do meio de cultura M4, sendo cultivados até 25 organismos para cada 1.000 mL de água de cultivo, visto que uma população maior afeta negativamente a reprodução das *Dm* (KNIE; LOPES, 2004). Os microcrustáceos cultivados foram mantidos em estufa incubadora (Lucadema®), com luminosidade difusa, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura controlada de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, conforme pode ser visualizado na Figura 6.

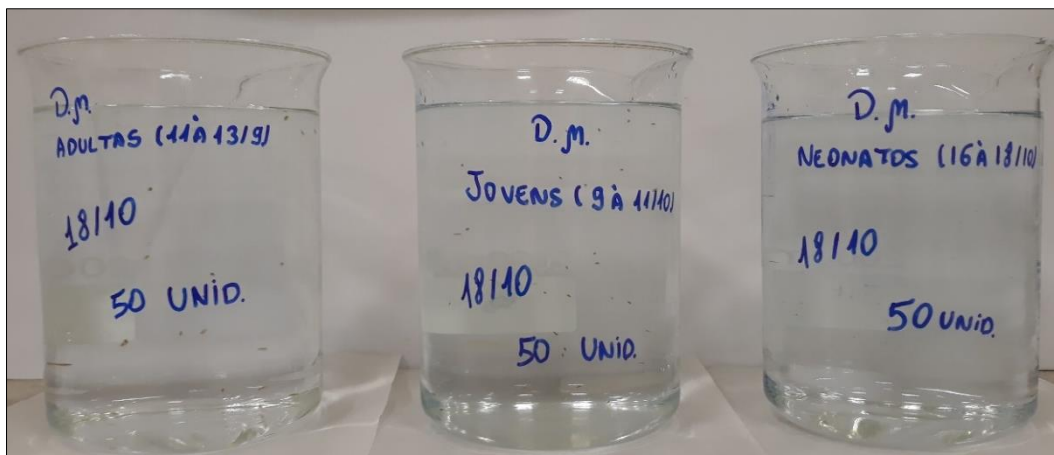
Figura 6 – Estufa incubadora juntamente com cultivo do microcrustáceo e fotoperíodo ligado.



Fonte: Autora, 2019.

A manutenção do cultivo foi realizada três vezes por semana, onde a cada troca de meio de cultivo foram observadas a possível ocorrência de efípias, retirada dos neonatos, renovação do meio M4, alimentação dos indivíduos além da limpeza dos recipientes de cultivo com auxílio de álcool 70 %, água da torneira e água destilada. Cada copo de béquer foi identificado com a fase de vida das *Dm*, período de nascimento, quantidade de exemplares por recipiente e data da troca de água, conforme Figura 7.

Figura 7 – Cultivo de *Dm* em diferentes fases de vida.



Fonte: Autora, 2019.

Segundo Knie e Lopes (2004), as *Dm* se reproduzem satisfatoriamente até aproximadamente 60 dias de vida, após este período a taxa reprodutiva diminui e aumenta o índice de mortalidade, em virtude disto, os microcrustáceos foram descartados conforme seu tempo de vida, e a maioria dos neonatos foram descartados nas trocas de água, quando não eram realizados bioensaios devido ao elevado índice de reprodução.

Por ser um microcrustáceo exótico no país e devido a sua elevada taxa de reprodução, é necessário garantir a letalidade das *Dm* antes do descarte. Para isso, todo o meio de cultivo descartado nas trocas de água era acondicionado em recipientes com hipoclorito de sódio 3 %, em seguida estes recipientes eram armazenados por um período de 48 horas, tempo suficiente para garantir a letalidade das *Dm*. Após este período o resíduo era descartado no Laboratório de Águas e Ecotoxicologia para desaguar junto ao esgoto comum.

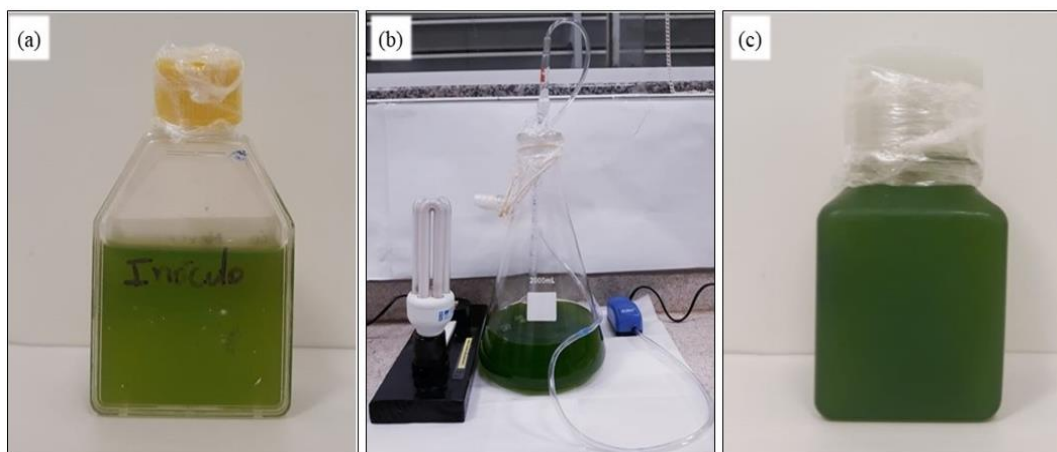
3.6.1.1 Alimentação das *Dm*

A alimentação das *Dm* foi realizada com a suspensão de células de alga da espécie *Desmodesmus subspicatus*, cultivada no Laboratório de Água e Ecotoxicologia da Universidade Federal da Fronteira Sul de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT presentes na ANBT NBR n° 12.713/2016.

Para o cultivo desta alga foi utilizada uma cultura-estoque que serviu como inóculo (Figura 8 a). Este inóculo, foi doado pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal de Santa Catarina e foi mantido em temperatura entre 4 °C a 10 °C, em meio líquido para obtenção de células viáveis para semeadura. Como meio de cultura para as algas foi preparado o meio de cultura Chu, descrito na ABNT NBR n° 12.713/2016, o qual consiste no preparo de

soluções com reagentes, sendo este meio rico em sais, nutrientes e microelementos, cujas soluções foram preparadas de acordo com a ABNT NBR nº 12.713/2016 e após o preparo foram estocadas em temperatura entre 4 °C a 10 °C.

Figura 8 – Alga *Desmodesmus subspicatus* para alimentação dos microcrustáceos.



Fonte: Autora, 2019.

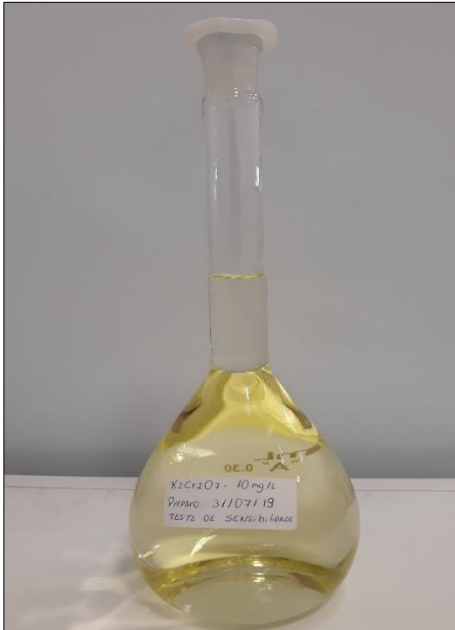
Notas: (a) Inóculo da alga *Desmodesmus subspicatus*; (b) Cultivo da cultura de algas para alimentação do microcrustáceo; (c) Alimento da *Daphnia magna*.

Posteriormente o meio Chu foi distribuído no recipiente de cultura, em seguida este recipiente foi tampado e autoclavado a 121 °C por 15 min. Após o meio ser resfriado foram adicionadas as algas provenientes da cultura-estoque e o recipiente de cultivo foi exposto a agitação constante, iluminação contínua e temperatura controlada a 20 °C, por um período de 12 a 15 dias (Figura 8 b). Após este período, a cultura de algas estava pronta para servir como alimentação para o microcrustáceo *Dm* (Figura 8 c). Ainda, visando manter o alimento em boas condições a cultura de algas foi transferida para outro recipiente sob condições estéreis e mantida em temperatura de 4 °C a 10 °C. A alga *Desmodesmus subspicatus* era fornecida três vezes por semana para cada lote de *Dm*.

3.6.2 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com as normas estabelecidas na ABNT NBR nº 12.713/2016. Para realização do teste de sensibilidade foi escolhido como solução padrão o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), conforme Figura 9, devido ao fato desta substância ser a mais utilizada e recomendada por muitas normas.

Figura 9 – Solução de dicromato de potássio para aplicação no teste de sensibilidade.



Fonte: Autora, 2019.

A sensibilidade da *Dm* foi testada por meio da exposição de indivíduos com idade entre 2 a 24 horas, em diluições de dicromato de potássio por um período de 24 horas (Figura 10). Após 24 horas de exposição, foi observado a quantidade de organismos imóveis. Em seguida, foi calculada a concentração efetiva (CE₅₀) na qual 50 % da população exposta sobreviveu as diluições de K₂Cr₂O₇ no período de tempo determinado, sendo que a faixa adequada da sensibilidade para *Dm* em relação ao K₂Cr₂O₇ deve estar entre 0,6 e 1,7 mg L⁻¹.

Figura 10 – Realização do teste de sensibilidade com dicromato de potássio.



Fonte: Autora, 2019.

3.6.3 Testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

O procedimento metodológico do teste de toxicidade aguda utilizando *Dm* como organismo-teste foi realizado de acordo com o descrito na ABNT NBR n° 12.713/2016. E, a amostra de água subterrânea foi fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D com base nas condições experimentais propostas no delineamento experimental.

Devido a concentração dos agrotóxicos comerciais e ao volume necessário para a realização das diluições, foram preparadas duas soluções estoque, sendo uma de 1,00 g L⁻¹ do herbicida glifosato e outra de 0,05 g L⁻¹ do herbicida 2,4-D. Em seguida, foram realizadas as fortificações da amostra com base nas concentrações dispostas na Tabela 8.

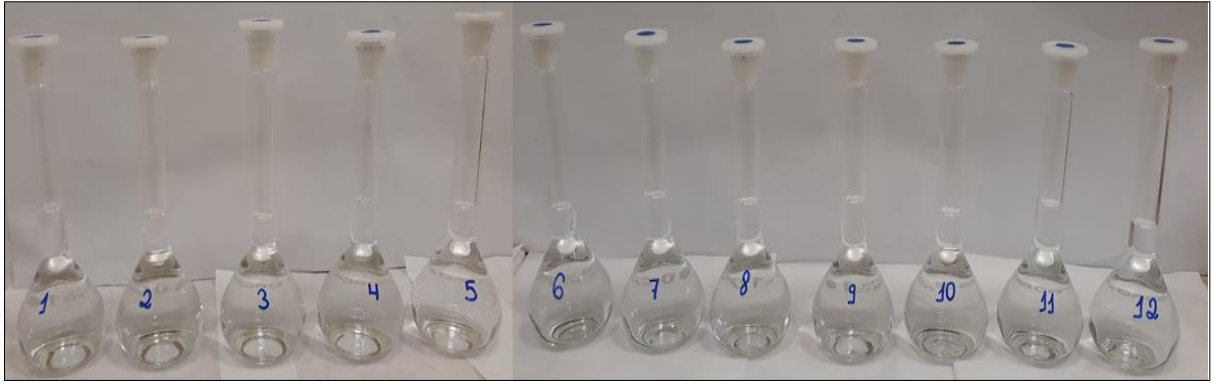
Tabela 8 – Condições experimentais do DCCR 2² + 4 axiais com as respectivas concentrações dos agrotóxicos.

Experimento	Condições experimentais	
	Glifosato (µg L ⁻¹)	2,4D (µg L ⁻¹)
1	280,0	16,0
2	720,0	16,0
3	280,0	44,0
4	720,0	44,0
5	136,0	30,0
6	864,0	30,0
7	500,0	6,8
8	500,0	53,2
9	500,0	30,0
10	500,0	30,0
11	500,0	30,0
12	500,0	30,0

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O preparo de cada condição experimental foi realizado em balões volumétricos com capacidade de 100 mL, onde foram adicionados os dois herbicidas e o volume foi completado com a amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público (Figura 11). Em seguida mediu-se o pH, das condições experimentais em triplicata, visando avaliar se faixa estava adequada com os valores requisitados pela ABNT NBR n° 12.713/2019, com o equipamento com o pHmetro de bancada para soluções aquosas (MS Tecnopon MPA 210).

Figura 11 – Condições experimentais para o teste de toxicidade aguda com *Dm*.



Fonte: Autora, 2019.

Após, a amostra de água subterrânea foi submetida ao teste de toxicidade aguda por meio da exposição de neonatos de *Dm* com idade variando de 2 a 26 horas nas condições experimentais por um período de 48 horas, com a primeira observação de imobilidade 24 horas após o início do teste. Em cada condição experimental foram adicionados 40 neonatos, sendo divididos 20 filhotes em cada recipiente-teste. O teste foi realizado em réplica e possuía um teste controle, sendo este composto por água reconstituída capaz de validar o teste. Durante a execução do ensaio estático os organismos-teste foram mantidos em estufa em ambiente com temperatura controlada de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sem iluminação, sem alimentação e sem troca do meio de cultivo. Na Figura 12, pode ser visualizado os recipientes de plástico contendo neonatos de *Dm* durante a realização do teste de toxicidade aguda considerando as condição experimental proposta no DCCR $2^2 + 4$ axiais (números de 1 a 12) e o controle negativo (letra B).

Figura 12 – Realização do teste agudo em recipientes-teste contendo o microcrustáceo *Dm* nas condições experimentais propostas no DCCR $2^2 + 4$ axiais para a amostra de água de abastecimento público fortificada com os herbicidas glifosato e 2,4-D.



Fonte: Autora, 2019.

Após o término do teste observou-se o número de indivíduos imóveis por experimento. Em seguida foi realizado a análise estatística.

Posterior a realização dos testes, as amostras de água subterrânea fortificadas com agrotóxicos e contendo *Dm* foram acondicionadas em recipientes com hipoclorito de sódio 3 % para garantir a letalidade dos organismos-teste e após 48 horas foram destinadas para resíduos químicos.

3.7 TESTES DE GENOTOXICIDADE

Para a realização dos testes de genotoxicidade foi utilizado um indicador biológico, sendo este a espécie *Allium cepa* da variedade Baia Periforme, adquirida no comércio local. Para cada condição experimental testada (Tabela 12) e para o controle negativo foram utilizados quatro bulbos de *Allium cepa*. Os bulbos foram inicialmente preparados e colocados em recipientes contendo água destilada durante 72 horas a temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular, como pode ser visualizado na Figura 13.

Figura 13 – Exposição dos bulbos de *Allium cepa* em água destilada.



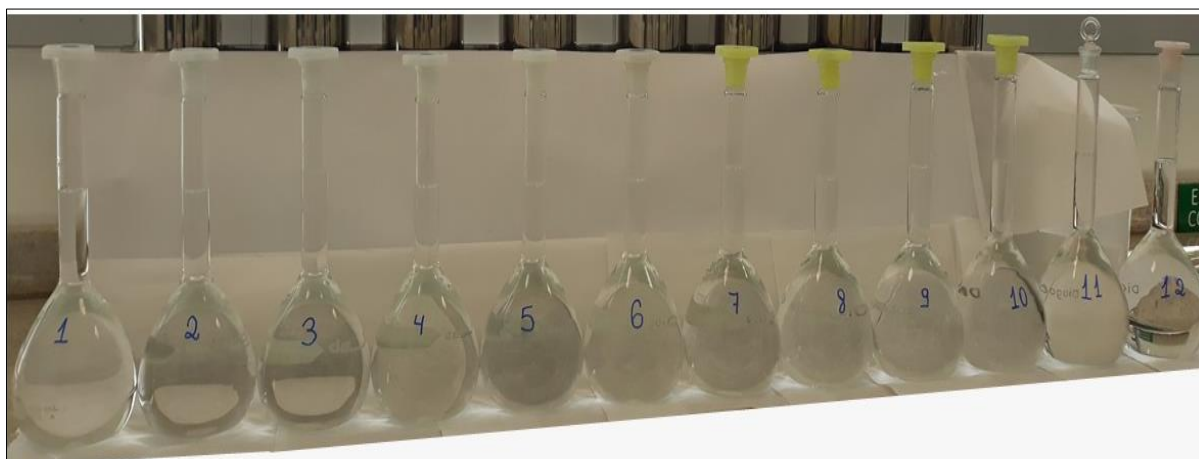
Fonte: Autora, 2019.

Para realização do teste as amostras de água subterrânea foram fortificadas com os agrotóxicos glifosato (480 g L^{-1}) e 2,4-D (806 g L^{-1}) com base nas condições experimentais propostas no DCCR. Entretanto, devido a composição dos agrotóxicos comerciais e ao volume necessário para a realização das diluições, foram preparadas duas soluções estoque, sendo uma de $1,00 \text{ g L}^{-1}$ do herbicida glifosato e outra de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ do herbicida 2,4-D. Em

seguida, foram realizadas as fortificações da amostra com base nas concentrações dispostas na Tabela 8 apresentada no item anterior.

O preparo de cada condição experimental foi realizado em balões volumétricos com capacidade de 500 mL, onde foram adicionados os dois herbicidas e o volume foi completado com a amostra, conforme Figura 14.

Figura 14 – Condições experimentais para o teste *Allium cepa*.



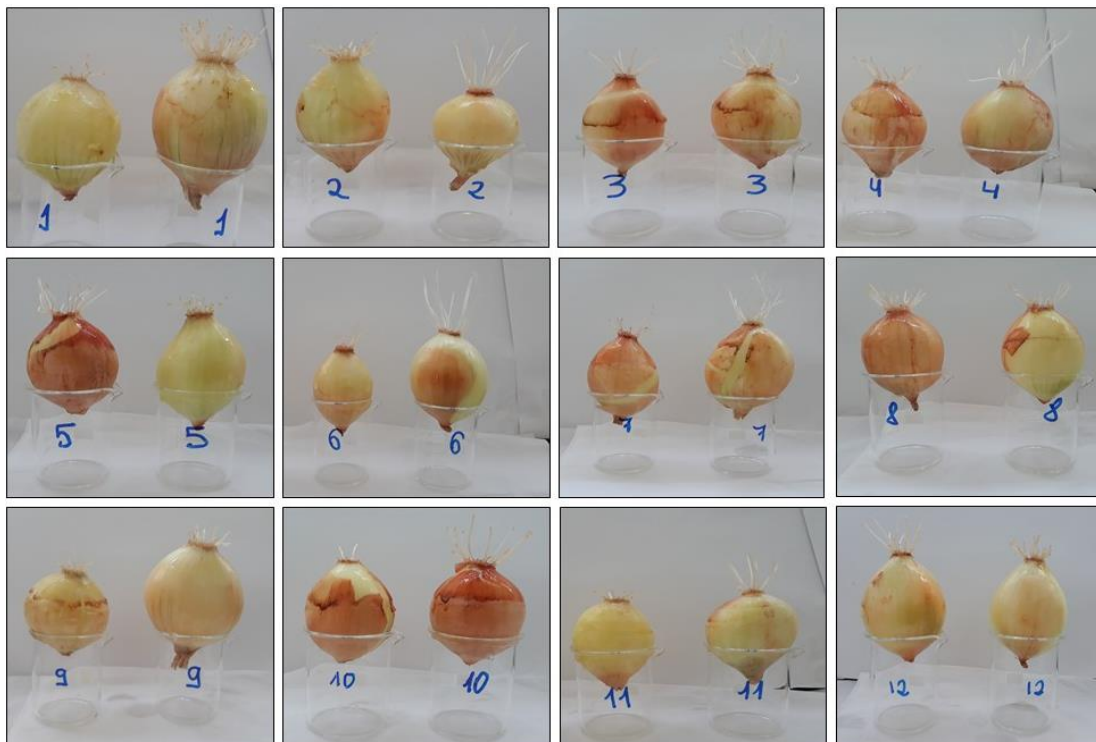
Fonte: Autora, 2019.

Após o desenvolvimento do meristema radicular, os bulbos foram acondicionados em recipientes de 50 mL contendo as soluções-teste, sendo estas compostas pela amostra de água de abastecimento público fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D nas concentrações propostas no DCCR 2² + 4 axiais, por um período de 72 horas. Para o controle negativo os bulbos foram expostos ao mesmo período, entretanto em água destilada. Devido a evaporação das soluções-teste dos recipiente, as quantidades evaporadas foram completadas a cada 24 horas.

Após o período de exposição, os bulbos de *Allium cepa* foram retirados das soluções-teste, em seguida o bulbo com menor desenvolvimento radicular em cada tratamento e no controle negativo foi descartado. Posteriormente foram coletadas as raízes com maior desenvolvimento de cada bulbo de cebola com tamanho aproximado de 2 cm de comprimento.

Na Figura 15, pode ser visualizado dois bulbos de *Allium cepa* com desenvolvimento radicular para cada experimento, após o período de exposição de 72 horas nas soluções-teste, sendo estas compostas pela amostra de água de abastecimento público fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D nas concentrações propostas no DCCR 2² + 4 axiais.

Figura 15 – Bulbos de *Allium cepa* desenvolvimento radicular após 72 horas de exposição nas soluções-teste.

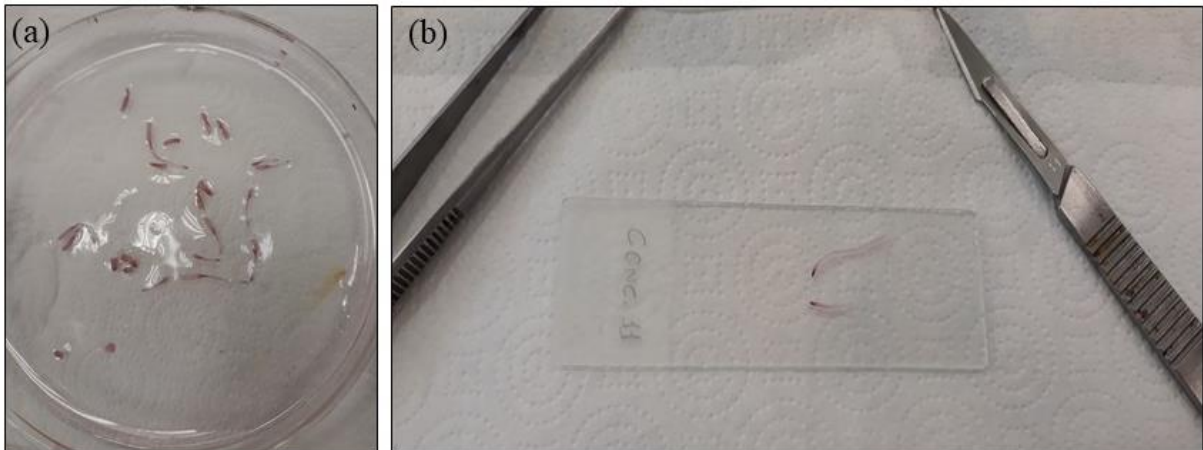


Fonte: Autora, 2019.

Após coletadas, as raízes foram acondicionadas em microtubos contendo fixador Carnoy por aproximadamente 24 horas. Após o período determinado, o fixador Carnoy foi retirado dos microtubos, em seguida as raízes foram lavadas em água destilada e armazenadas em álcool 70 % sob refrigeração até a confecção das lâminas.

Para a confecção das lâminas, as raízes foram retiradas do álcool 70 %, lavadas em água destilada, submetidas à hidrólise com ácido clorídrico 1,0 molar (HCl 1 N) durante 15 minutos à 60 °C, lavadas novamente em água destilada para interromper a hidrólise, coradas durante 1 hora no reativo de Schiff (Figura 16 a), lavadas em água sulfurosa e então, preparadas em lâminas de vidro por meio do esmagamento manual (Figura 16 b) e da adição deorceína acética 2 % cobertas com lamínula e seladas com verniz incolor.

Figura 16 – Preparo das lâminas de *Allium cepa*.



Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) Raízes coradas no reativo de Schiff; (b) Raízes sendo preparadas em lâminas de vidro por meio do esmagamento manual.

Para cada condição experimental foram confeccionadas cinco lâminas sendo analisadas e contadas 3.000 células por condição experimental. Para a contagem das células em divisão mitótica e avaliação de danos cromossômicos as lâminas foram observadas em Microscopia Óptica (Microscópio Óptico Olympus® CX22LED).

O Índice Mitótico (IM) (%) foi calculado conforme descrito na Equação 3.1.

$$IM = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número total de células contadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

3.8 RESÍDUOS

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento deste estudo foram descartados seguindo as orientações dos servidores técnicos responsáveis pelos laboratórios da UFFS, baseados no plano de gerenciamento de resíduos da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Cerro Largo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos experimentos envolvendo a toxicidade da amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público poluída e fortificada com agrotóxicos.

Inicialmente estão apresentados os dados referentes aos parâmetros analisados acerca das características físico-químicas e microbiológicas da água, seguindo da detecção dos agrotóxicos e suas comparações com as legislações bases de potabilidade de água no Brasil. Posteriormente estão apresentados os resultados obtidos nas análises de toxicidade aguda e genotoxicidade da amostra de água fortificada com os herbicidas glifosato e 2,4-D.

4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DE ESTUDO

Os valores dos parâmetros físico-químicos obtidos através da amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público coletada estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores dos parâmetros físico-químicos.

Parâmetros	Valor	Parâmetros	Valor
Absorvância (λ - 254 nm)	0,0010	Oxigênio dissolvido ($\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$)	8,70
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	23,60	pH	6,78
Cor aparente (uH)	2,00	Temperatura ($^{\circ} \text{C}$)	21,10
Dureza ($\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$)	416,00	Turbidez (uT)	1,00
Fluoreto (mg L^{-1})	0,53		

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Nota: (CaCO_3) Carbonato de cálcio; (pH) Potencial Hidrogeniônico.

4.1.1 Absorvância (λ - 254 nm)

Conforme a Tabela 9 o valor da absorvância ultravioleta (UV) para o comprimento de onda de 254 nm da amostra de água subterrânea foi de 0,0010. A absorvância UV no comprimento de onda de 254 nm é analisada frequentemente na indústria de abastecimento de água como uma medida indireta da matéria orgânica dissolvida (MOD) (BEIROZA; BAKER; BRIDGEMAN, 2009).

O parâmetro absorvância (λ - 254 nm) não está descrito na Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS, mas Korshin et al. (2009), relatam que a absorvância (λ - 254 nm) é um

parâmetro indireto utilizado para determinação de compostos aromáticos nas amostras de água.

A MOD ocorre naturalmente nas águas naturais e apesar dessas substâncias não serem naturalmente tóxicas aos seres humanos, estão relacionadas à formação de subprodutos indesejados no processo de desinfecção da água como os trihalometanos, ácidos halocéticos e haloacetônitos. Estes compostos químicos empregados à desinfecção podem resultar na formação de compostos cancerígenos, mutagênicos e tóxicos, que representam riscos aos consumidores de água potável (WANG et al., 2013; BEIROZA; BAKER; BRIDGEMAN, 2009).

Além dos fatores resultantes dos compostos químicos utilizados no tratamento da água, a presença de matéria orgânica dissolvida pode causar problemas de cor, sabor, odor e contribuir para o crescimento bacteriano (WANG et al., 2013).

4.1.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica indica a capacidade da água de transmitir a corrente elétrica em função da presença de íons dissolvidos, carregados eletricamente. Sendo assim, a condutividade elétrica é utilizada para determinar o teor de sal na água, além de ser um método padrão utilizado para investigar a qualidade da água (FUNASA, 2014; ASENBAUM et al., 2011).

A Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS não apresenta VMP para avaliar a condutividade elétrica. Entretanto, conforme a CETESB (2016), a condutividade pode indicar uma medida indireta da concentração de poluentes, em geral, valores superiores a $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ são indicativos de ambientes impactados, enquanto que as águas naturais apresentam valores inferiores a $100 \mu\text{S cm}^{-1}$, além disso, locais poluídos por esgotos domésticos e industriais os valores podem chegar a $1.000 \mu\text{S cm}^{-1}$ (FUNASA, 2014).

O valor da condutividade elétrica para a amostra de água de abastecimento público provinda de manancial subterrâneo foi de $23,60 \mu\text{S cm}^{-1}$. Conforme a FUNASA (2014), quanto maior a quantidade de íons, maior a condutividade, ou seja, na amostra analisada a quantidade de íons tende a ser reduzida devido ao valor de condutividade obtida, o qual está em conformidade com os valores estipulados para as águas naturais.

As análises de condutividade elétrica realizadas por Carmo (2014), durante um ano hidrológico em três poços de água subterrânea, obtiveram médias anuais variando de $35,9$ a $58,8 \mu\text{S cm}^{-1}$ em dois poços, enquanto no terceiro poço analisado as médias anuais

obtidas foram mais elevadas, de até $106,5 \mu\text{S cm}^{-1}$, o autor sugere que a variabilidade da condutividade da água subterrânea, está relacionada à posição dos poços e às características dos materiais constituintes da matriz dos arenitos.

4.1.3 Cor aparente

A cor de uma amostra de água geralmente está associada à presença de sólidos dissolvidos, principalmente material em estado coloidal orgânico e inorgânico (CETESB, 2016). De acordo com Zumach (2003), a cor na água pode provir da presença de ferro, íons metálicos e manganês, de plâncton, de algas, de húmus, de ligninas e produtos de sua decomposição e efluentes industriais. Sendo que, o maior problema relacionado com a cor das águas é, em geral, o estético, pois pode causar efeito repulsivo nos consumidores (CETESB, 2016).

Em relação à cor aparente, a Portaria de Consolidação nº 5/2017 determina o valor máximo de 15 uH para a potabilidade da água, sendo que, quanto maior o valor da cor aparente, maior é a quantidade de partículas sólidas em suspensão. Assim, pode ser observado na Tabela 9, que a amostra de água analisada atende a recomendação da Portaria do MS para o quesito cor aparente, visto que o valor obtido na análise foi de 2,00 uH.

A cor aparente no estudo realizado por Márquez et al. (2012), variou de 0 à 60 uH, sendo que esta variação estava relacionada a presença de ferro e manganês dissolvido, e associados ainda, ao contato da água subterrânea com o resíduos de matéria orgânica.

4.1.4 Dureza

A dureza em amostras de água está relacionada com os surfactantes presentes nas águas os quais se transformam em complexos insolúveis, não originando espuma até o fim do processamento. Este fator é causado principalmente pela presença de cálcio e magnésio, sendo que sua origem pode ser natural ou antropogênica (CETESB, 2016).

Conforme a CETESB (2016), as amostras de água podem ser classificadas como mole ou branda quando os valores de CaCO_3 são inferiores a 50 mg L^{-1} , para valores entre 50 e 150 mg L^{-1} de CaCO_3 são classificadas como dureza moderada, quando os valores de CaCO_3 estão entre 150 e 300 mg L^{-1} são classificadas como dura e por fim são classificadas como muito dura para valores superiores a 300 mg L^{-1} de CaCO_3 .

A Portaria de Consolidação nº 5/2017 expressa como padrão de potabilidade o valor máximo 500 mg L^{-1} de CaCO_3 . A amostra de água analisada foi classificada como muito dura, devido ao valor de carbonato de cálcio ser superior a 300 mg L^{-1} , conforme apresentado na Tabela 9, sendo que, o valor obtido foi de 416 mg L^{-1} de CaCO_3 .

A principal fonte de dureza nas águas é a sua passagem pelo solo, pois pode ocorrer a dissolução da rocha calcárea pelo gás carbônico da água, por isso geralmente a dureza das águas subterrâneas é mais elevada do que as superficiais. A dureza, em determinadas concentrações, reduz a formação de espuma, causa sabor desagradável à água e pode ter efeitos laxativos, causa incrustação nas tubulações de água quente, caldeiras e aquecedores (CETESB, 2016).

4.1.5 Fluoreto

Os fluoretos são compostos químicos que estão presentes no solo, no ar, na água, nas plantas e na vida animal, no ar a concentração de fluoretos ocorre pela presença de pós de solos), resíduos industriais gasosos, combustão de carvão e gases emitidos. Os fluoretos são comuns em águas subterrâneas devido à decomposição de rochas e solos (FUNASA, 2014).

Conforme a Portaria de Consolidação nº 5/2017, devido à quantidade de água ingerida, o limite ótimo de fluoreto depende das condições climáticas, que por sua vez, está associada à temperatura do ar. Com base na Tabela 9, a concentração do íon fluoreto na amostra de água analisada foi de $0,53 \text{ mg L}^{-1}$, sendo assim, o valor obtido para o íon fluoreto é inferior aos valores recomendados pela legislação do Ministério da Saúde, sendo que o limite mínimo recomendado para a temperatura da amostra entre $17,8$ e $21,4$ °C é de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$.

Os estudos realizados por Kuhn, Zart e Oliveira (2015), avaliaram a qualidade das águas de dez poços artesianos, e destes, dois poços apresentaram resultados superiores aos valores previstos na legislação para a média das temperaturas máximas diárias do ar, sendo que a dissolução do solo é o mais provável para obtenção desses valores.

4.1.6 Oxigênio Dissolvido

O OD é um dos parâmetros mais importantes da qualidade da água, pois indica indiretamente o estado do ecossistema aquático e sua capacidade de sustentar a vida aquática (TOMIĆ et al., 2017). Os valores de OD indicam o grau de poluição das águas, sendo assim

valores diminutos de OD são indícios de contaminação por matéria orgânica (PATIL; PATIL, 2009).

Conforme a Tabela 9, o valor de OD para a amostra de água subterrânea foi de 8,70 mg L⁻¹. Apesar do OD não ser um parâmetro listado na Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS como indicador de potabilidade da água, para a manutenção da vida aquática aeróbica são necessários teores mínimos de oxigênio dissolvido de 2 mg L⁻¹ a 5 mg L⁻¹, exigência relacionada a sobrevivência de organismos de diferentes cadeias tróficas no recurso hídrico.

Nas análises realizadas por Kuhn, Zart e Oliveira (2015), referente aos dez poços de água subterrânea, pertencentes ao aquífero Guarani os resultados de OD variaram entre 8,2 e 8,7 mg L⁻¹ o que indica proximidade com o resultado obtido neste estudo, devido a semelhança da formação geológica e as características do aquífero.

4.1.7 Potencial Hidrogeniônico

O pH representa a concentração de íons de hidrogênio em uma solução e pode ser considerado uma das variáveis ambientais mais importantes. Determinadas condições de pH podem contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos como a exemplo, os metais pesados, enquanto que, outras condições podem exercer efeitos sobre as solubilidades de nutrientes (ESTEVES, 1998; CETESB, 2016).

Como pode ser visualizado na Tabela 9, o valor do pH para a amostra de água analisada foi de 6,78. Segundo a Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS o pH deve estar entre 6,0 a 9,5. De maneira geral, o valor obtido para o parâmetro pH está de acordo com o permitido pela legislação. Para CETESB (2016), o pH é um parâmetro muito importante no monitoramento do saneamento ambiental, pois representa a intensidade das condições ácidas ou alcalinas do meio líquido.

O conhecimento dos valores do pH da água subterrânea é importante, pois o valor do pH influencia diretamente no tempo de contato da água com o cloro no processo de desinfecção (BRASIL, 2017), sendo o processo de cloração comumente o único, quando existente na potabilização da água de abastecimento público captada e distribuída no meio rural.

4.1.8 Temperatura

Conforme Who (2011), a temperatura da água impacta na aceitabilidade dos consumidores, visto que a elevada temperatura aumenta o crescimento de microrganismos e pode aumentar os problemas relacionados ao sabor, odor, cor e corrosão. Sendo assim, águas com temperaturas elevadas, como as subterrâneas captadas de grandes profundidades necessitam de resfriamento, a fim de adequá-las ao consumo humano (FUNASA, 2014).

A temperatura da água analisada foi de 21,10 °C (Tabela 9). A Portaria de Consolidação nº 5/2017, não estabelece nenhum limite de temperatura da água para consumo humano. Entretanto, é um parâmetro importante a se considerar da água potável, visto que alterações de temperatura podem desencadear mudanças nos processos físicos, químicos e microbianos no ambiente subterrâneo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No estudo realizado por Corcóvia e Celligoi (2012), em vinte e sete poços artesianos no município de Ibiporã/PR, as águas apresentaram resultados semelhantes com temperaturas na faixa de 15,0 °C a 33,0 °C, tendo média de 19,5 °C.

4.1.9 Turbidez

A turbidez expressa a interferência a passagem de luz através do líquido, esta é causada por partículas em suspensão ou matéria coloidal que obstrui a transmissão de luz através da água, sendo, portanto, reduzida quando ocorre a sedimentação (WHO, 2011; FUNASA, 2014).

Considerando que a Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS especifica no § 1º: “[...] entre os 5 % dos valores permitidos de turbidez superiores aos VMP estabelecidos, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser de 5,0 uT, assegurado, o atendimento ao VMP de 5,0 uT em qualquer ponto da rede no sistema de distribuição” (BRASIL, 2017). Conforme a referida Portaria de Consolidação, percebe-se na Tabela 9 que o valor para o parâmetro turbidez para a amostra de água analisada está de acordo com os limites estabelecidos pela legislação, sendo este de 1,0 uT.

O excesso de turbidez reduz a penetração da luz na água e conseqüentemente reduz a fotossíntese dos organismos do fitoplâncton, algas e vegetação, além disso a elevada turbidez afeta os usos doméstico, industrial e recreacional de uma água (CETESB, 2016).

Entretanto, a turbidez das águas não é necessariamente uma ameaça para a saúde, porém, pode provocar impacto negativo na aceitabilidade pelo consumidor, por causa da

nebulosidade. A turbidez das águas subterrâneas é derivada de partículas inertes de argila ou precipitação de ferro reduzido não solúvel e outros óxidos provenientes da dissolução das rochas (WHO, 2011).

4.1.10 Coliformes totais e *Escherichia coli*

Os resultados das análises microbiológicas obtidos para a amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultado dos parâmetros microbiológicos.

Parâmetros	Unidade	Valor
Coliformes Totais	P/N ⁽¹⁾ em 100 mL	Positivo
<i>Escherichia coli</i>	P/N ⁽¹⁾ em 100 mL	Positivo

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Nota: (1) Positivo/Negativo em 100 mL.

Avaliando os resultados obtidos nas análises microbiológicas (Tabela 10), foi possível verificar a presença de coliformes totais e de *Escherichia coli* na amostra de água de abastecimento público. No entanto, segundo o que estabelece a Portaria de Consolidação nº 5/2017, se houver presença de um desses microrganismos, a água não é passível de ser consumida sem tratamento prévio, a ser realizado com algum agente antibactericida, como por exemplo, o cloro e segundo dados arrecadados na prefeitura do município localizado na Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul, o poço em questão está recebendo o tratamento de desinfecção, sendo realizado o monitoramento a cada 15 dias por empresa terceirizada.

Entretanto, segundo a FUNASA (2014), as bactérias do grupo de coliformes, sobrevivem a curtos períodos de tempo na água e, quando presentes, admite-se que a contaminação é recente. De acordo com a Portaria de Consolidação nº 5/2017, a avaliação da contaminação por *Escherichia coli* no manancial subterrâneo deve ser feita mediante coleta mensal de amostra, recomendado no mínimo quatro amostras, em ponto anterior ao local de desinfecção.

As bactérias do grupo coliforme estão presentes no intestino humano e de animais e são eliminadas nas fezes. Os organismos patogênicos, presentes nas fezes, podem contaminar as pessoas que se abastecem desta água quando atingem o ambiente aquático. Entretanto, o grupo dos coliformes inclui bactérias não exclusivamente de origem fecal, podendo ocorrer naturalmente no solo, na água e em plantas. O subgrupo das bactérias que fermentam a lactose

a 44,5 °C em 24 horas é conhecido como coliformes termotolerantes, tendo como principal representante a *Escherichia coli*, que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal. Sendo que a principal fonte de contaminação por *Escherichia coli* na área rural, é decorrente da falta de saneamento (FUNASA, 2014).

4.2 DETECTAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Os resultados das análises de detecção e quantificação de agrotóxicos podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentrações de agrotóxicos na amostra de água subterrânea analisada e valores máximo permitidos nas legislações.

Parâmetro	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VMP ⁽²⁾		
		P. C. nº 5/2017 ⁽³⁾ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	P. 320/2014 ⁽⁴⁾ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R. 369/2008 ⁽⁵⁾ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,4-D	ND ⁽¹⁾	30,00	-	-
Atrazina	1,42	2,00	-	2,00
Azoxistrobina	0,06	-	-	-
Bentazona	ND ⁽¹⁾	-	-	300,00
Carbofurano	ND ⁽¹⁾	7,00	-	7,00
Ciproconazol	ND ⁽¹⁾	-	60,00	-
Clomazona	0,05	-	-	-
Difenoconazol	ND ⁽¹⁾	-	60,00	-
Epoxiconazol	ND ⁽¹⁾	-	18,00	-
Fipronil	3,00	-	1,20	-
Imazapique	ND ⁽¹⁾	-	-	-
Imazetapir	ND ⁽¹⁾	-	1.500,00	-
Malationa	ND ⁽¹⁾	-	-	190,00
Metsulfurom-metílico	ND ⁽¹⁾	-	60,00	-
Penoxsulam	ND ⁽¹⁾	-	-	-
Piraclostrobina	ND ⁽¹⁾	-	-	-
Pirazosulfurom-etílico	ND ⁽¹⁾	-	-	-
Pirimicarbe	ND ⁽¹⁾	-	-	-
Profenofós	ND ⁽¹⁾	60,00	-	-
Propiconazol	ND ⁽¹⁾	-	-	-
Simazina	ND ⁽¹⁾	2,00	-	2,00
Tebuconazol	0,09	180,00	-	-
Tiametoxam	ND ⁽¹⁾	-	120,00	-
Trifloxistrobina	1,89	-	-	-

Fonte: Projeto MCTIC/CNPq nº 28/2018, 2019.

Notas: (1) Não detectado; (2) Valor máximo permitido de acordo com as portarias e resoluções; (3) Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS; (4) Portaria nº 320/2014 da Secretária de Estado da Saúde do Rio Grande Do Sul; (5) Resolução nº 396/2008 do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

Dos vinte e quatro compostos determinados, seis foram quantificados. As concentrações de agrotóxicos encontradas na amostra de água subterrânea variaram de 0,05 a 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que um destes compostos pertencente à classificação toxicologia pouco tóxico (tebuconazol), três mediamente tóxico (atrazina, azoxistrobina e clomazona) e dois altamente tóxico (trifloxistrobina e fipronil).

Estes seis compostos detectados e quantificados são indicados para as principais culturas produzidas na região das missões do estado do Rio Grande do Sul, sendo estas a soja, milho e trigo (CODETER, 2006).

Através da Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS que estabelece parâmetros de potabilidade para águas de consumo humano, as concentrações de atrazina (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e tebuconazol (180 $\mu\text{g L}^{-1}$), encontradas na amostra apresentaram valores inferiores ao VMP permitido por esta legislação. De acordo com a Portaria nº 320/2014 da Secretária de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul, que dispõe os limites máximos permitidos de agrotóxicos em água utilizada para o abastecimento público, é possível perceber que o valor obtido para o fipronil está acima do limite recomendado, sendo este de 1,20 $\mu\text{g L}^{-1}$. E os demais agrotóxicos detectados e quantificados na amostra de água não possuem VMP estabelecidos na legislação brasileira.

Ao analisar o Anexo 7 do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 do MS (BRASIL, 2017), observa-se que os agrotóxicos correspondem a 42 % das substâncias químicas que representam risco à saúde, destes apenas atrazina, 2,4-D, endossulfan, glifosato, mancozebe e trifluralina estão entre os dez agrotóxicos mais consumidos no Brasil (MARQUES, 2005). Portanto, destaca-se a importância de se estabelecer VMP referente aos agrotóxicos de acordo com a sazonalidade de produção agrícola no país, pois é desconhecido os efeitos deletérios à saúde humana em detrimento dos subprodutos formados pela presença de mais de um agrotóxico (ALVES, 2017).

4.3 TOXICIDADE AGUDA COM *DAPHNIA MAGNA*

Para validação do teste agudo, seguindo orientações da NBR 12.713 (ABNT, 2016), foi realizado o teste de sensibilidade antes da realização das análises o qual resultou em uma faixa de sensibilidade dos microcrustáceos de 0,6 a 1,0 mg L^{-1} , sendo assim, as *Dm* utilizadas no teste de toxicidade aguda estavam aptas para uso, visto que segundo Knie e Lopes (2004), a faixa adequada da sensibilidade para *Dm* condiz a valores entre 0,6 e 1,0 mg L^{-1} . Os valores

de pH não influenciaram nos resultados das análises, pois as condições experimentais apresentaram valores na faixa de 7,6 a 8,0 estando na faixa adequada para *Dm*.

4.3.1 Delineamento experimental e análises estatística dos resultados obtidos para o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os resultados obtidos 24 horas após o início do teste com *Dm*, apontaram que o índice de imobilidade foi inferior ao índice de imobilidade obtido em 48 horas de exposição, corroborando os resultados identificados no teste de toxicidade aguda.

O DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central e os resultados de imobilidade obtidos no teste de toxicidade aguda após 48 horas de exposição do microcrustáceo *Dm* estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados do DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central, para o teste de toxicidade aguda.

Experimento	Condições experimentais		Imobilidade de <i>Dm</i> ⁽¹⁾ após 48 horas de teste (%)
	Coeficientes		
	Glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
1	-1 (280,00)	-1 (16,00)	100,0
2	1 (720,00)	-1 (16,00)	40,0
3	-1 (280,00)	1 (44,00)	100,0
4	1 (720,00)	1 (44,00)	100,0
5	-1,414 (136,00)	0 (30,00)	100,0
6	1,414 (864,00)	0 (30,00)	100,0
7	0 (500,00)	-1,414 (6,77)	42,5
8	0 (500,00)	1,414 (53,23)	100,0
9	0 (500,00)	0 (30,00)	95,0
10	0 (500,00)	0 (30,00)	100,0
11	0 (500,00)	0 (30,00)	80,0
12	0 (500,00)	0 (30,00)	100,0
Controle negativo	-	-	0,0

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Nota: (1) *Daphnia magna*.

Nos resultados apresentados na Tabela 12, pode ser observado que no controle negativo realizado com água reconstituída não ocorreu imobilidade dos microcrustáceos expostos, desta forma, segundo a ABNT NBR n° 12.713/2016, os resultados das análises são válidos, pois a porcentagem dos organismos imóveis no controle foi 0 ou seja, inferior a 10 % conforme recomendado pela norma.

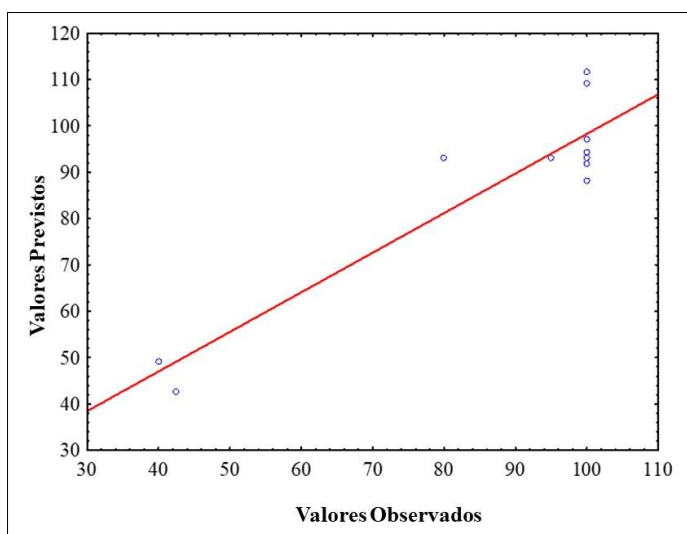
As concentrações aplicadas nos experimentos 9, 10, 11 e 12 são os valores máximos permitidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017 para os agrotóxicos glifosato e 2,4-D. Na Tabela 12 observa-se, que a letalidade após 48 horas de exposição nos experimentos foi análoga, com imobilidade média de 93,7 % dos microcrustáceos expostos. Isto significa que, os VMP na Portaria de Consolidação nº 5/2017 apresentam toxicidade aguda para *Dm*.

Ainda pode ser observado que 66,7 % dos experimentos realizados apresentaram 100 % de imobilidade no teste agudo com *Dm*. Estes resultados significam que baixas e elevadas concentrações dos herbicidas glifosato e 2,4-D causam toxicidade aguda no microcrustáceo.

Nos experimentos 2 e 7, constata-se que as menores concentrações de 2, 4-D correspondentes a $6,77 \mu\text{g L}^{-1}$ e $16,00 \mu\text{g L}^{-1}$ imobilizam menos que as elevadas concentrações, sendo possível constatar que o 2, 4-D apresenta toxicidade aguda mais elevada quando comparado ao glifosato, sendo assim os valores obtidos para os agrotóxicos estão em concordância com os VMP estabelecidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017, pois devido a elevada toxicidade o VMP do 2,4-D ($30,0 \mu\text{g L}^{-1}$) é inferior ao VMP do glifosato ($500,0 \mu\text{g L}^{-1}$).

No entanto, conforme pode ser visualizado na Figura 17, os resultados obtidos não apresentaram excelente ajuste do modelo entre os valores previstos e observados para o teste de toxicidade aguda, porém se encontram próximos a linha de tendência indicando a validade dos resultados obtidos.

Figura 17 – Correlação entre os valores observados na imobilidade de *Daphnia magna* e os valores previsto pelo modelo estatístico proposto para o teste de toxicidade aguda.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O efeito das interações, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) referente à imobilidade do microcrustáceo *Dm* no teste de toxicidade aguda está apresentado na Tabela 13.

De acordo com o efeito das interações, é possível identificar que somente o 2,4-D linear e a relação entre glifosato linear e 2,4-D linear são expressivos ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) e possuem t -estatístico superior a 2 absoluto.

Tabela 13 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para a imobilidade de *Daphnia magna* em 48 horas de exposição com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Ações dos parâmetros	Coefficientes	Valor	Erro Padrão	t_{est}	p -valor
q_0	a_0	93,2659	5,7155	16,3181	< 0,001
q_1	a_1	-12,6649	7,6039	-1,6656	0,1468
$(q_1)^2$	b_{11}	3,9681	7,2406	0,5480	0,6034
q_2	a_2	32,6954	7,5913	4,3070	0,0050
$(q_2)^2$	b_{22}	-16,9337	7,2023	-2,3512	0,0570
$q_1 \times q_2$	b_{12}	30,0000	11,7029	2,5635	0,0427

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

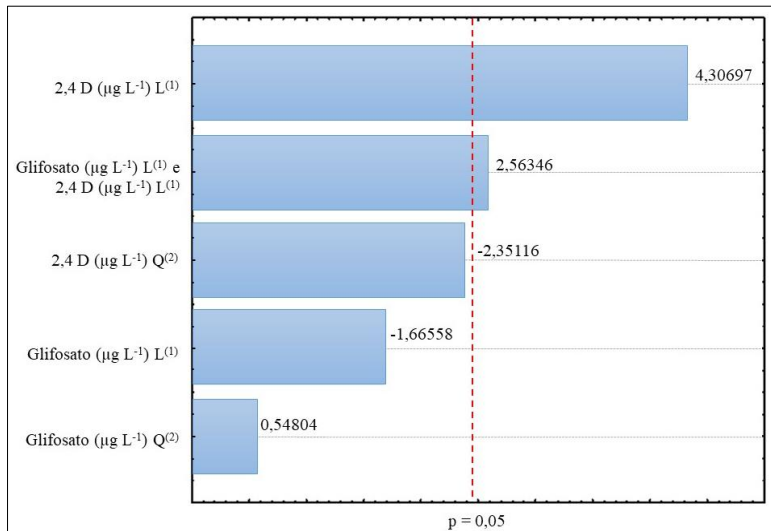
Notas: (a_0) média das interações; (a_1) glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear; (b_{11}) glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$) quadrático; (a_2) 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear; (b_{22}) 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) quadrático; (b_{12}) relação glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear e 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear; (t_{est}) t -estatístico; $r^2 = 0,854$.

O efeito positivo ($a_2 > 0$ e $b_{12} > 0$) em termos lineares sugere que quanto maior a concentração de 2,4-D e quanto mais elevada a concentração conjunta de glifosato e 2,4-D, maior será o efeito de toxicidade aguda em *Dm*.

A Figura 18, expressa o efeito das interações com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) referente a imobilidade do microcrustáceo *Dm* no teste de toxicidade aguda.

De acordo com a Tabela 13 e a Figura 18, o 2,4-D quadrático e o glifosato linear e quadrático, não são significativos a 95 % ($p < 0,05$), pois o que está regendo a 95 % de significância é o 2,4-D linear e a relação entre o glifosato linear e o 2,4-D linear.

Figura 18 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para a imobilidade de *Dm* em 48 horas de exposição com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) expressas no diagrama de Pareto.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Notas: (1) Linear; (2) Quadrático.

Para validar o ajuste do modelo proposto pelos resultados obtidos, à significância dos efeitos de toxicidade aguda entre os dois agrotóxicos e suas interações foram verificadas pela ANOVA. Os resultados foram obtidos através do Software Statistica® (Copyright 1984 2007 by statsoft, Inc) sendo que foi utilizada a opção trial disponível por um período de três meses e podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14 – Teste da análise de variância do modelo previsto para a imobilidade do microcrustáceo *Daphnia magna* após 48 horas de exposição ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Parâmetro	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F Cal.	Est.	Nível de significância (%)
Imobilidade <i>Daphnia magna</i> 48h	Regressão	5.639,06	5	1127,81	8,23	4,39	< 0,1
	Resíduos	821,75	6	136,96			
	Total	6.460,81	11				

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

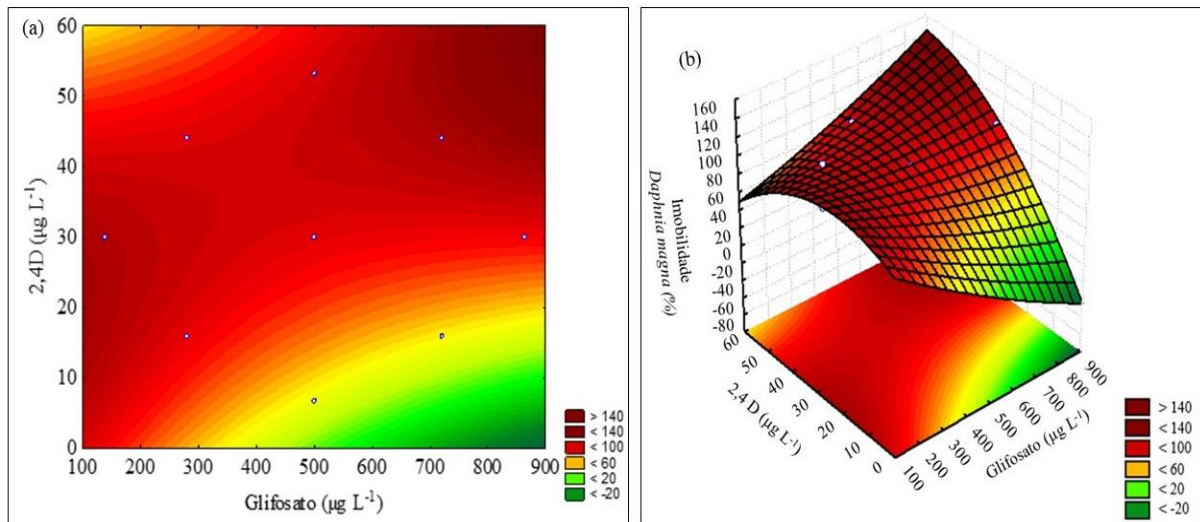
Notas: (cal.) calculado; (est.) estatístico ou tabelado; r^2 : 0,85.

A ANOVA dos resultados obtidos referentes imobilidade das *Dm* demonstrou que o DCCR é válido no intervalo de confiança de 95 % resultando em excelente reprodução das respostas experimentais. Conforme pode ser averiguado na Tabela 14, o $F_{calculado}$ (8,23) é

maior que o F_{tabelado} (4,39), sendo possível identificar os valores dos agrotóxicos que possuem influência significativa com a imobilidade do microcrustáceo *Dm*.

Os resultados da toxicidade aguda da amostra de água fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D podem ser visualizados no gráfico de superfície de resposta e tridimensional (Figura 19).

Figura 19 – Superfície de resposta em relação à imobilidade de *Dm*.



Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) gráfico de superfície de resposta; (b) gráfico tridimensional.

De acordo com a análise observa-se na Figura 19 que o 2,4-D é altamente efetivo na imobilidade do microcrustáceo *Dm* nas baixas, médias e elevadas concentrações. O herbicida glifosato causa toxicidade aguda nas baixas e médias concentrações. A combinação dos dois agrotóxicos em baixas concentrações é altamente efetiva na imobilidade do microcrustáceo, concentrações medianas dos herbicidas causam imobilidade nas *Dm*, em baixas concentrações de 2,4-D e elevadas concentrações de glifosato observa-se uma redução na imobilidade quando comparada com as outras concentrações. Logo, os agrotóxicos causam toxicidade aguda no microcrustáceo *Dm*, entretanto o 2,4-D apresenta toxicidade aguda nas diferentes concentrações.

Diferentes autores têm apontado os efeitos tóxicos decorrentes do 2,4-D. No estudo realizado por Mazhar et al. (2012), os autores investigaram os danos causados na gestação de ratas expostas ao 2,4-D do 1º ao 19º dia de gestação e foi observada a diminuição do peso do útero, peso da ninhada, peso corpóreo e tamanho fetal. O estudo realizado por Garaj-Vrhovac e Zeljezic (2002), abordou a exposição de trabalhadores a vários tipos de agrotóxicos, dentre

eles o 2,4-D e demonstraram que nessas situações de exposição pode ocorrer danos no material genético.

De acordo com Friedrich (2014), quando um mesmo tipo de dano sobre a saúde é encontrado em mais de uma espécie animal, as evidências de afirmar que tais efeitos podem de fato ocorrer nas situações de exposição humana é muito mais substantivo.

Embora a toxicidade aguda do glifosato seja considerada baixa, alguns autores têm sugerido que o herbicida pode causar danos de nascimento em espécies de animais. Ingaramo et al. (2019), realizaram um estudo para avaliar os efeitos uterinos agudos e alterações reprodutivas a longo prazo em ratos fêmeas expostas a uma mistura de endossulfan e glifosato, e concluíram que os ratos expostos ao glifosato e a mistura de ambos agrotóxicos apresentaram incremento de incidência de hiperplasia epitelial luminal e durante a vida adulta os ratos expostos a mistura e ao glifosato apresentaram maiores perdas pós-implantação, enquanto que somente o endossulfan produziu aumento nas perdas pós-implantação, sendo assim, ambos os agrotóxicos produziram efeitos agudos e reprodutivos deletérios em longo prazo (90 dias).

4.4 GENOTOXICIDADE COM *ALLIUM CEPA*

Visando complementar as análises de toxicidade aguda foram realizados ensaios de genotoxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa*, nos quais foram analisadas três mil células para cada condição experimental contabilizando as células em interfase e as que estavam nas fases de mitose para o cálculo de índice mitótico.

4.4.1 Delineamento experimental e análises estatística dos resultados obtidos para o teste *Allium cepa*

Através da análise de microscopia óptica realizada com as condições experimentais foi possível identificar alterações nos estágios celulares, induzindo a uma ampla gama de anormalidades mitóticas em relação ao controle das raízes de *Allium Cepa*.

O DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central e os resultados do índice mitótico obtido no teste *Allium cepa* realizado com amostra de água subterrânea fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D estão apresentados na Tabela 15.

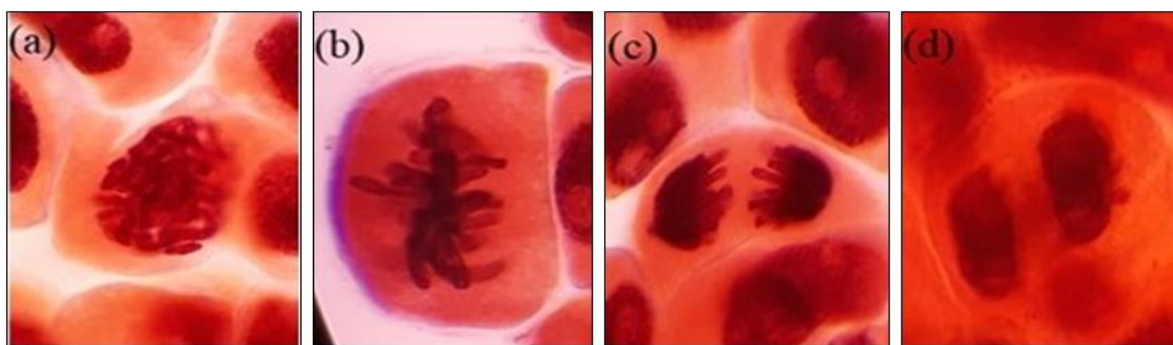
Tabela 15 – Resultados do DCCR $2^2 + 4$ axiais com quadruplicata no ponto central para o teste *Allium cepa*.

Experimento	Condições experimentais		Índice Mitótico <i>Allium cepa</i> (%)
	Coeficientes		
	Glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,4D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
1	-1 (280,00)	-1 (16,00)	1,90
2	1 (720,00)	-1 (16,00)	2,36
3	-1 (280,00)	1 (44,00)	1,90
4	1 (720,00)	1 (44,00)	3,01
5	-1,414 (136,00)	0 (30,00)	1,42
6	1,414 (864,00)	0 (30,00)	2,73
7	0 (500,00)	-1,414 (6,77)	2,18
8	0 (500,00)	1,414 (53,23)	2,40
9	0 (500,00)	0 (30,00)	3,72
10	0 (500,00)	0 (30,00)	3,93
11	0 (500,00)	0 (30,00)	3,87
12	0 (500,00)	0 (30,00)	3,10
Controle negativo	-	-	6,80

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15, é possível observar que o valor do IM para o controle negativo foi de 6,8 %. Nesta condição experimental foi possível contabilizar as células que estavam em interfase e as fases mitóticas: prófase, metáfase, anáfase e telófase, como pode ser visualizado na Figura 20, com aumento microscópico de 100 vezes.

Figura 20 – Células do controle negativo em mitose.



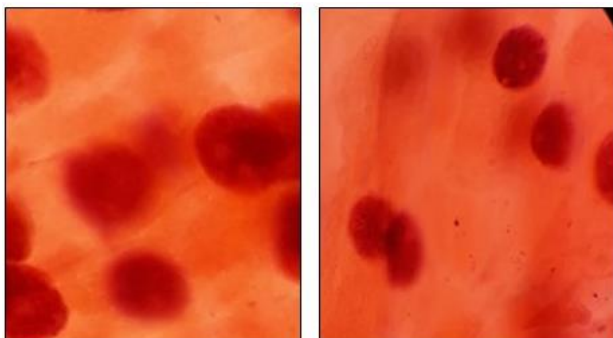
Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) prófase; (b) metáfase; (c) anáfase; (d) telófase.

No resultado para o experimento 1, foi observado que as baixas concentrações de glifosato e 2,4-D causaram alterações cromossômicas, sendo que o IM obtido foi de 1,90 %. Para a concentração de glifosato correspondente a $280,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e com a concentração de 2,4-D correspondente a $44,0 \mu\text{g L}^{-1}$, o índice mitótico foi de 1,90 %. O experimento que obteve o menor valor de índice mitótico (1,42 %), foi o experimento 5, sendo este equivalente

a mínima concentração de glifosato ($136,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e a concentração de 2,4-D foi o valor máximo permitido pela Portaria de Consolidação nº 5/2017, de $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Nestes três experimentos, foi possível observar em grande quantidade a presença de núcleos mal formados, conforme pode ser observado na Figura 21.

Figura 21 – Núcleos mal formados no experimento 5.

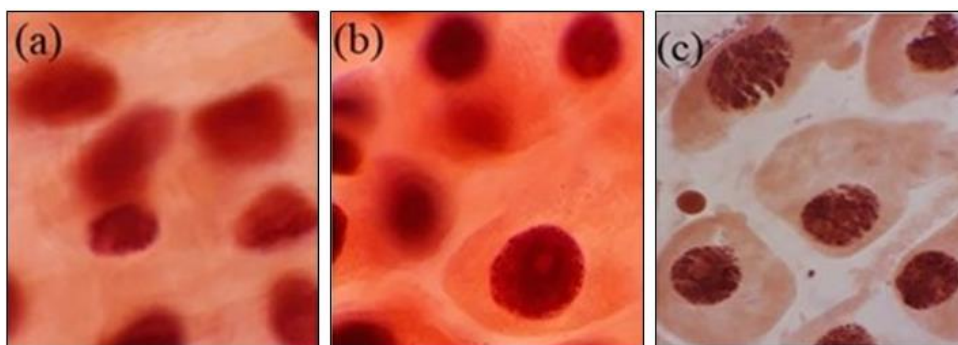


Fonte: Autora, 2019.

As menores concentrações de 2,4-D ($6,77 \mu\text{g L}^{-1}$ e $16,00 \mu\text{g L}^{-1}$) e as mais elevadas de glifosato ($500,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e $864,00 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram o valor de índice mitótico semelhantes, tendo como média do IM 2,27 %.

Nos experimentos 4, 6 e 8, são observadas elevadas concentrações de ambos herbicidas, sendo que a média do IM foi de 2,71 %. A concentração referente ao experimento 8, é referente ao VMP do glifosato ($500,00 \mu\text{g L}^{-1}$) e a concentração mais elevada do 2,4-D ($53,23 \mu\text{g L}^{-1}$), como pode ser visualizado na Figura 22, entre os três experimentos, a condição experimental 8 apresentou o maior índice de mal formações, devido ao fato do 2,4-D apresentar maior toxicidade quando comparado ao glifosato.

Figura 22 – Células observadas nos experimentos 4, 6 e 8.



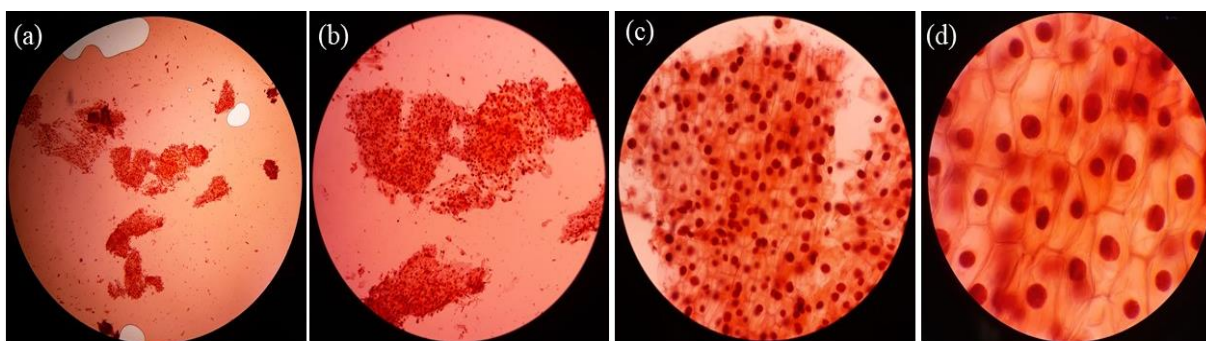
Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) experimento 4 com aumento microscópico de 100 vezes; (b) experimento 6 com aumento microscópico de 100 vezes; (c) experimento 8 com aumento microscópico de 100 vezes.

As concentrações de agrotóxicos aplicadas nos experimentos 9, 10, 11 e 12 são os VMP estabelecidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017 do MS para os agrotóxicos glifosato e 2,4-D. Observa-se na Tabela 15, que o índice mitótico após 72 horas de exposição nos experimentos foi análogo, com valor médio de 3,65 %. Em comparação com os outros experimentos, estas foram as concentrações que apresentaram o valor de IM mais elevado. Entretanto todos experimentos realizados com a amostra de água fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D apresentaram o IM inferior ao controle negativo, conforme Leme e Marin-Morales (2009), quanto menor o IM, maiores são as possibilidades de ocorrência de aberrações cromossômicas.

Na Figura 23, pode ser visualizada as células com aumento microscópico de 4 vezes, 10 vezes, 40 vezes e 100 vezes respectivamente para o experimento 9.

Figura 23 – Células das raízes de *Allium cepa* expostas ao experimento 9.

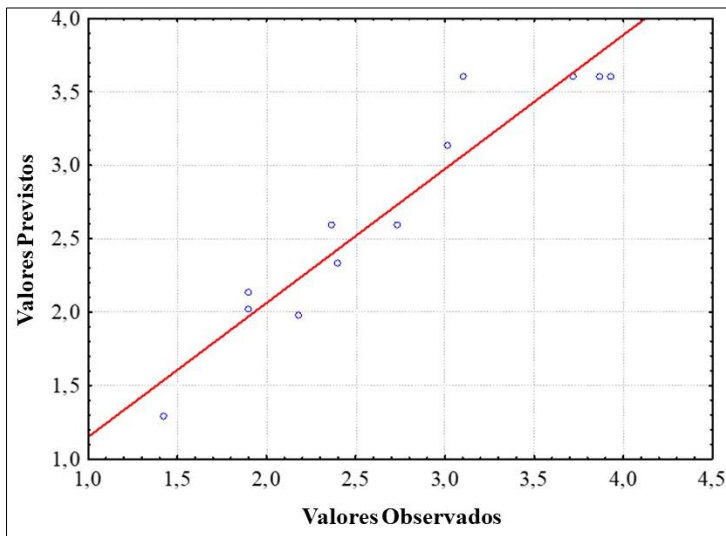


Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) 4 vezes; (b) 10 vezes; (c) 40 vezes; (d) 100 vezes.

Conforme pode ser visualizado na Figura 24, os resultados obtidos apresentaram um bom ajuste do modelo entre os valores previstos e observados para o teste *Allium cepa*.

Figura 24 – Correlação entre os valores observados no índice mitótico e os valores previsto pelo modelo estatístico proposto para o teste *Allium cepa*.



Fonte: Autora, 2019.

O efeito das interações, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) referente ao IM no teste *Allium cepa* está apresentado na Tabela 16.

De acordo com o efeito das interações, é possível identificar que o glifosato linear e quadrático e o 2,4-D quadrático são expressivos ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) e possuem t -estatístico superior a 2 absoluto.

O efeito positivo ($a_1 > 0$) em termos lineares sugere que quanto maior a concentração de glifosato maiores são as possibilidades de ocorrência de aberrações cromossômicas. Assim como o efeito negativo ($(b_{11} < 0)$; $(b_{22} < 0)$) em termos quadráticos indicam que a redução nas concentrações dos agrotóxicos também possibilitará maiores probabilidades de ocorrência de aberrações cromossômicas.

Tabela 16 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para o teste *Allium cepa* com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

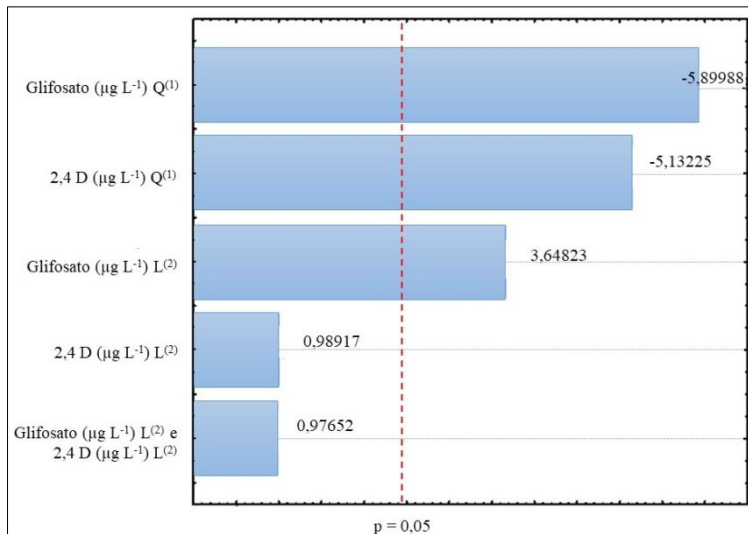
Ações dos parâmetros	Coefficientes	Valor	Erro Padrão	t_{est}	p -valor
q_0	a_0	3,6060	0,1625	22,1853	< 0,001
q_1	a_1	0,7889	0,2162	3,6482	0,0107
$(q_1)^2$	b_{11}	-1,2147	0,2059	-5,8999	0,0010
q_2	a_2	0,2135	0,2159	0,9892	0,3608
$(q_2)^2$	b_{22}	-1,0512	0,2048	-5,1322	0,0021
$q_1 \times q_2$	b_{12}	0,3250	0,3328	0,9765	0,3665

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Notas: (a_0) média das interações; (a_1) glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear; (b_{11}) glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$) quadrático; (a_2) 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear; (b_{22}) 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) quadrático; (b_{12}) relação glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear e 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) linear; (t_{est}) t -estatístico; $r^2 = 0,912$.

Na Figura 25, está expresso o efeito das interações com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) referente ao índice mitótico obtido no teste *Allium cepa*.

Figura 25 – Efeito das interações entre as variáveis do processo (glifosato (a_1); 2,4-D (a_2)) para o índice mitótico obtido no teste *Allium cepa* com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) expressas no diagrama de Pareto.



Fonte: Autora, 2019.

Notas: (1) Linear; (2) Quadrático.

De acordo com a Tabela 16 e a Figura 25, o 2,4-D linear e a relação entre glifosato linear e 2,4-D linear, não são significativos a 95 % ($p < 0,05$), pois o que está regendo a 95 % de significância corresponde ao glifosato linear e quadrático e o 2,4-D quadrático.

Para validar o ajuste do modelo proposto pelos resultados obtidos, à significância dos efeitos do teste *Allium cepa* entre os dois agrotóxicos e suas interações foram verificadas pela ANOVA (Tabela 17).

Tabela 17 – Teste da análise de variância do modelo previsto para o teste *Allium cepa* após 72 horas de exposição nas amostras fortificadas com glifosato e 2,4-D ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Parâmetro	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F		Nível de significância (%)
					Cal.	Est.	
Índice Mitótico	Regressão	7,57	5	1,51	13,67	4,39	< 0,1
	Resíduos	0,66	6	0,11			
<i>Allium cepa</i>	Total	8,24	11				

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

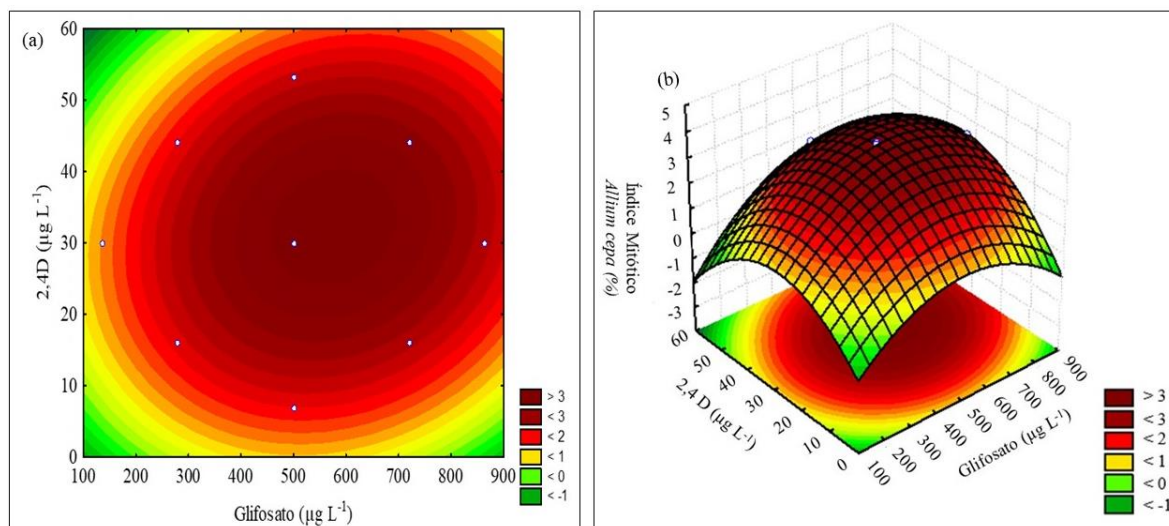
Notas: (cal.) calculado; (est.) estatístico ou tabelado; r^2 : 0,91.

A ANOVA dos resultados obtidos referentes ao IM demonstrou que o DCCR é válido no intervalo de confiança de 95 % resultando em excelente reprodução das respostas experimentais.

Conforme pode ser averiguado na Tabela 17, o $F_{calculado}$ (13,67) é maior que o $F_{tabelado}$ (4,39), sendo possível identificar os valores dos agrotóxicos que possuem influência significativa com o IM.

Os resultados do teste *Allium cepa* da amostra de água fortificada com os agrotóxicos glifosato e 2,4-D podem ser visualizados no gráfico de superfície de resposta e bidimensional e tridimensional (Figura 26).

Figura 26 – Superfície de resposta em relação ao índice mitótico obtido através da exposição de *Allium cepa*.



Fonte: Autora, 2019.

Notas: (a) gráfico de superfície de resposta; (b) gráfico tridimensional.

De acordo com a análise estatística e a interpretação dos resultados obtidos, observa-se na Figura 26, que o 2,4-D e o glifosato originam menores valores do índice mitóticos em baixas concentrações. Elevada concentração de glifosato e baixa concentração de 2,4-D o valor do IM é mediano, o mesmo ocorre em elevadas concentrações de ambos agrotóxicos. Para os VMP estabelecidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017 o IM é mais elevado reduzindo as aberrações cromossômicas.

De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), valores do IM menores que os valores do controle negativo indicam alterações provenientes de substâncias químicas podendo causar danos aos organismos expostos. Com base nos valores obtidos nas análises, conclui-se que os agrotóxicos glifosato e 2,4-D causaram danos nas células de *Allium cepa*.

5 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos nas análises realizadas para a amostra de água do poço subterrâneo utilizada para abastecimento humano em uma comunidade rural de um município da Região das Missões do estado do Rio Grande do Sul, foi possível comparar com os VMP estabelecidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde.

Em comparação dos parâmetros físico-químicos, com os valores máximos permitidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017, constatou-se que somente o parâmetro fluoreto apresentou valor inferior ao estabelecido pela legislação e os parâmetros cor aparente, dureza, pH e turbidez estão em conformidade com a referida legislação.

Para os demais parâmetros analisados, absorvância ($\lambda - 254 \text{ nm}$), condutividade elétrica, OD e temperatura a Portaria de Consolidação nº 5/2017 não estabelece parâmetros a serem considerados, entretanto, de acordo com os valores encontrados na literatura, os parâmetros estão em conformidade com a matriz estudada, ou seja águas provenientes de mananciais subterrâneos.

No que tange aos resultados obtidos nas análises microbiológicas foi possível verificar a presença de coliformes totais e de *Escherichia coli* na amostra de água de abastecimento público, estando em desconformidade com o estabelecido na Portaria de Consolidação nº 5/2017, pois de acordo com esta portaria, estes parâmetros devem estar ausentes em amostras de água e quando houver presença de um desses microrganismos, a água não é passível de ser consumida sem tratamento prévio.

Foi constatado em pesquisa complementar correspondente a análise dos agrotóxicos, a presença de atrazina, azoxistrobina, clomazona, fipronil, tebuconazol e trifloxistrobina. Destes somente dois possuem VMP estabelecidos na Portaria de Consolidação nº 5/2017, sendo a atrazina e o tebuconazol, nos quais as concentrações encontradas foram inferiores aos limites estabelecidos. Enquanto que o fipronil apresentou concentração duas vezes e meia maior que o estabelecido na Portaria nº 320/2014 da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul e os demais agrotóxicos não possuem VMP nas legislações consideradas neste estudo. Através das características do local de coleta e dos tipos de agrotóxicos detectados na amostra de água subterrânea, acredita-se que a presença de multiresíduos de agrotóxicos está relacionada com a frequência de aplicação dos agrotóxicos e devido as características do solo.

O teste de toxicidade aguda com a amostra de água fortificada com os agrotóxicos 2,4-D e glifosato se mostraram muito úteis, pois foi possível detectar interferências que a mistura de agrotóxicos pode causar em diferentes concentrações. Assim, o DCCR e a análise

estatística foram fundamentais para a compreensão dos efeitos tóxicos causados as *Dm*, bem como permitiram conferir uma confiabilidade estatística de 95 % que o herbicida 2,4-D é mais tóxico que o herbicida glifosato, corroborando ao VMP estabelecido na Portaria de Consolidação nº 5/2017. Ainda através do teste de toxicidade aguda, foi possível confirmar que o VMP estabelecido na Portaria de Consolidação nº 5/2017 para ambos agrotóxicos é coerente.

Por meio do teste de genotoxicidade realizado com o bioindicador *Allium cepa* foi possível concluir que a amostra de água fortificada com a mistura dos agrotóxicos glifosato e 2,4-D causam aberrações cromossômicas nas diversas concentrações, inclusive em concentração apresentadas pela Portaria de Consolidação nº 05/2017 como sendo aceitável nas águas utilizadas para o abastecimento público no país. Além disto, por meio do DCCR e da análise estatística, foi possível confirmar que mesmo as menores concentrações dos agrotóxicos estudados proporcionam a ocorrência de aberrações cromossômicas. Conclui-se que a mistura de agrotóxicos na amostra de água de abastecimento público apresenta potencial genotóxico para células eucarióticas, sendo fortes indícios que o glifosato, 2,4-D e os multiresíduos de agrotóxicos detectados na amostra interferem nos processos de divisão celular.

De maneira geral, a realização das análises dos parâmetros físico-químicos e biológicos demonstraram ser ferramentas essenciais na avaliação do estado de saúde das águas subterrâneas, juntamente com o teste de toxicidade e genotoxicidade da amostra poluída e fortificada com agrotóxicos, sendo uma forma de alerta à população e aos órgãos responsáveis pela qualidade ambiental e pela saúde da população, pois estamos consumindo multiresíduos de agrotóxicos por meio da água de abastecimento e o consumo indireto está sendo relacionados a diversas doenças.

No caso do fluoreto, o manancial subterrâneo não recebe tratamento de fluoretação, sugere-se que seja instalado um sistema de fluoretação no local, pois a fluoretação da água para consumo humano é uma medida preventiva que reduz a prevalência de cárie dental em populações expostas.

Referente ao *Escherichia coli* e coliformes totais, o poço de abastecimento público recebe tratamento de desinfecção através de clorador, entretanto sugere-se que seja reavaliado o sistema de desinfecção visando eliminar as bactérias que podem estar presentes nas águas subterrâneas.

De acordo com os resultados das análises, sugere-se que sejam realizados além dos testes de toxicidade aguda os testes de toxicidade crônica com *Dm* para as concentrações dos

agrotóxicos glifosato e 2,4-D, pois em algumas condições experimentais não houve a letalidade dos microcrustáceos no período de exposição de 48 horas, entretanto a concentração destes agrotóxicos pode ser bioacumulativa e conseqüentemente causar toxicidade em um período de tempo mais elevado.

Devido aos agrotóxicos azoxistrobina, clomazona e trifloxistrobina que foram detectados na amostra de água subterrânea utilizada para o abastecimento público não possuem VMP nas portarias normativas sugere-se realizar testes de toxicidade aguda, crônica e de genotoxicidade visando identificar a toxicidade e as interferências nos processos de divisão celular.

REFERÊNCIAS

ADAMA. **Aminol® 806**. Disponível em:

<<https://www.adama.com/documents/407112/415700/Aminol%C2%AE+806+-+Bula>>.

Acesso em: julho de 2019a.

ADAMA. **Trop® NA**. Disponível em:

<https://www.adama.com/documents/407112/422554/TropNA_tcm14-80619.pdf>. Acesso

em: julho de 2019b.

AFONSO, M. J. et al. Uma abordagem geoambiental no estudo dos subterrâneos da cidade do Porto: o caso do manancial de Paranhos. In: **Seminário sobre Águas Subterrâneas**, LNEC, 12 de março de 2007. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos (APRH), Lisboa, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2017**. Brasília: ANA, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Atlas Brasil: Abastecimento Urbano de Água**. 2010. Disponível em: <<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/Home.aspx>>. Acesso em: outubro de 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Regularização de Produtos - Agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>. Acesso em: novembro de 2019.

AIUB, C. A. F.; FELZENSWALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Revista Genética na Escola**, v. 6, n. 1, p. 12-15, 2011.

ALVES, A. A. A. **Emprego da tecnologia de adsorção em leito fixo de carvão ativado granular para a remoção de agrotóxicos carbamatos da água de abastecimento público**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, SC, 2017.

American Public Health Association (APHA). **Standard methods for the examination of water e wastewater**. New York, NY, 20 ed., 2005.

ASENBAUM, A. et al. Influence of various commercial water treatment processes on the electric conductivity of several drinking Waters. **Journal of Molecular Liquids**, v. 160, p. 144-149, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12.713: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *daphnia spp* (Crustácea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2016. p. 27.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 9.898: Prevenção e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BARROS, S. B. de M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. cap. 1.4, p. 28-36.

BASSOI, L.J. Poluição das águas. In: PHILIPPI JR., A.; PELICIONI, M.C.F. (Org). **Educação ambiental e sustentabilidade**. Baurerri, SP: Manole, 2005, cap. 7, p. 175-193

BIEROZA, M.; BAKER, A.; BRIDGEMAN, J. Relating freshwater organic matter fluorescence to organic carbon removal efficiency in drinking water treatment. **Science of The Total Environmental**, v. 407, p. 1765-1774, 2009.

BORTOLUZZI, EC et al. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 10, p. 881-7, 2006.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo: Pearson, 2005.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Ambiente & Água**, v. 10, p. 130-140, 2015.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nNº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 396, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, nº 66, Brasília, DF 2008.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília, DF, 1988.

BRASIL. Coordenação de Estudos Legislativos. 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 [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde — MS. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde — MS. 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Águas subterrâneas: um recurso a ser conhecido e protegido**. Brasília, DF, 2007.

CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea**. 2009. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande, 2009.

CAMPOS, J. F. F. A. F. **Avaliação da toxicidade das águas do rio Cubatão (Norte) - Joinville, SC, com base em ensaios ecotoxicológicos com Daphnia magna**. 2015, 87 f. Dissertação (mestrado em Ecologia) – Universidade do Minho, Braga- Portugal, 2015.

CARNEIRO, F. F. et al. (Org). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CASTRO, M. L. et al. Controle da qualidade das águas. In: PHILIPPI JR., A. (Org). **Saneamento, saúde e ambiente: Fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Baueri, SP: Manole, cap. 14, p. 524-548, 2018.

COLEGIADO DE DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL (CODETER/MISSÕES). **Plano Territorial de Desenvolvimento Sustentável PTDRS: Território das Missões**. Santo Ângelo, 2006.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Apêndice E - Significado Ambiental e Sanitário das Variáveis de Qualidade das Águas e dos Sedimentos e Metodologias Analíticas e de Amostragem**. 2016. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2017/11/Ap%C3%AAndice-E-Significado-Ambiental-e-Sanit%C3%A1rio-das-Vari%C3%A1veis-de-Qualidade-2016.pdf>>. Acesso em: novembro de 2019.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Org. BRANDÃO, C. J. et al. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

CORCÓVIA, J. A.; CELLIGOI, A. Avaliação preliminar da qualidade da água subterrânea no município de Iporã-PR. **Revista de estudos ambientais**. v. 14, n. 2, p. 29-48, 2012.

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.

COSTA, L. G. Efeitos tóxicos dos praguicidas. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**. Porto Alegre: AMGH, 2012, cap. 22, p. 311-323.

DELLAMATRICE, P. M. et al. Avaliação da qualidade da água do reservatório de abastecimento do Município de Fortaleza, CE, através de bioensaios de toxicidade aguda e crônica. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.351-355, 2011.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2 ed. São Carlos: RiMa, vol. 1, 2005.

DO CARMO, J. A. R. **Recarga subterrânea direta e sua influência sobre a temperatura e a condutividade elétrica em microbacias do rio Vacacaí-Mirim, RS**. 2014. 132 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

DOS SANTOS, K.C.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.100, p. 7-14, 2014.

EATON, D. L.; GILBERT, S.G. Princípios de toxicologia. In: KLAASSEN, C.; WATKINS, J. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**. Porto Alegre: AMGH, cap. 2, p. 5-19, 2012.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FARIA, M. L. C. de. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jaru, estado de Rondônia, em células de *Allium cepa*. **Gaia Scientia**, v. 11, p. 104-114, 2017.

FATMA, F. et al. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. **Chemosphere**, v. 195; p. 864-870, 2018.

FERETTI, D. et al. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 6, p. 561-572, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D**. Fundação Oswaldo Cruz: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2014.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (— FUNASA). **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2014. 112 p.

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**. 2009, 243 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, 2009.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **J Appl Toxicol**, v. V. 22, ed. 4, p. 249-255, 2002.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GRÜTZMACHER, D. D. et al. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 632-637, 2008.

GUYTON K. Z. et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol**, v.16, p. 490-491, 2015.

HELLER, L. Abastecimento de água, sociedade e ambiente. In: HELLER, L.; PÁDUA, V. L. de. (Org). **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: UFMG, cap. 1, p. 29-63, 2006.

HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASAÑA, M. **Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update**, v. 91, p. 3211-3223, 2017.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutation Research**, v. 277 p. 91-138, 1992.

INGARAMO, P. I. Eet al. Acute uterine effects and long-term reproductive alterations in postnatally exposed female rats to a mixture of commercial formulations of endosulfan and glyphosate. **Food And Chemical Toxicology**, v. 134, 2019.

INMETRO. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=Inspetores-BPL>. Acesso em: julho de 2019.

JACOBI, P. R.; GRANDISOLI, E. **Água e sustentabilidade: desafios, perspectivas e soluções**. 1. ed. São Paulo: IEE-USP e Reconnecta, 2017.

JOBIM, P. F. C. et al. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, n. 15, p. 177-288, 2010.

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

KORSHIN, G. et al. Absorbance spectroscopy-based examination of effects of coagulation on the reactivity of fractions of natural organic matter with varying apparent molecular weights. **Water Research**, v. 43, p. 1541-1548, 2009.

KUHN, M. R.; ZART, N.; OLIVEIRA, E. Avaliação físico-química e microbiológica da qualidade das águas dos poços artesianos que abastecem o distrito de Boa Vista, no município de Triunfo–RS. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 7, n. 4, 2015.

- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ZECH, W. et al. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. **Journal of Environmental Quality**, n° 31, p. 256-268, 2002.
- LEBLANC, GERALD A.. Acute Toxicity. In: HODGSON, Ernest. **A textbook of modern toxicology**. New Jersey: John Wiley & Sons, cap. 11, p. 215-224, 2004.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. v. 682, p. 71-81, 2009.
- LIBÂNIO, M. Características das águas naturais. In: LIBÂNIO, M. (Org). **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. 3. ed. Campinas, SP: Editora Átomos, 2010.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.
- MACHADO, J. L. F. **Águas subterrâneas e poços: uma jornada através dos tempos**. Porto Alegre: EST Edições/Suliani – Letra & Vida, 2008.
- MACHADO, J. L. F.; FREITAS, M. A. **Projeto Mapa Hidrogeológico do Rio Grande do Sul: relatório final**. Porto Alegre: CPRM, 2005.
- MARCHESAN, E. et al. Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, v. 64, p.131-7, 2007.
- MARCHESAN, E. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1053-1059, 2010.
- MARQUES, M. N. **Avaliação do impacto de agrotóxicos em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo: Uma contribuição à análise crítica da legislação sobre o padrão de potabilidade**. 2005. 198 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2005.
- MÁRQUEZ, L. V. et al. Caracterización microbiológica y fisicoquímica de aguas subterráneas de los municipios de La Paz y San Diego, Cesar, Colombia. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**. Bogotá, v. 3, n. 2, p. 27-35, 2012.
- MAZHAR F.M. et al. Fetotoxicity of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in rats and the protective role of vitamin E. **Toxicol Ind Health**. v. 30, ed. 5, p. 480-488, 2012.
- MELLER, C. B. **Água que vem, água que vai....** Ijuí: Editora Unijuí, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília -DF, 2006.
- MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, p.299-311, 2002a.

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.17, p. 1557-1568, 2012b.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. de. Introdução à toxicologia. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. cap. 1.1, p. 1-6.

OLIVEIRA FILHO, E. C. Agrotóxicos. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. cap. 5, p. 76-93.

OLIVEIRA FILHO, E. C.; SISINNO, C. L. S. Histórico, evolução e conceitos básicos da toxicologia. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. cap. 1, p. 1-16.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE/ ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (— OPAS/OMS). Representação do Brasil. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE/ ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (— OPAS/OMS). **Saúde nas Américas**: edição de 2012. Washington, DC: OPAS, 2012. Disponível em: < <http://www1.paho.org/saludenlasamericas/docs/sa-2012-resumo.pdf>>. Acesso em: maio de 2019.

PÁDUA, V. L. de; FERREIRA, A. C. da S. Qualidade da água para consumo humano. In: HELLER, L.; PÁDUA, V. L. de. (Org). **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: UFMG, cap. 4, p. 153-221, 2006.

PALMIER, L. R. Mananciais subterrâneos: aspectos quantitativos. In: HELLER, L.; PÁDUA, V. L. de. (Org). **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: UFMG, 2006, cap. 6, p. 275-302.

PATIL, V. T.; PATIL, P. R. Physicochemical Analysis of Selected Groundwater Samples of Amalner Town in Jalgaon District, Maharashtra, India. **E-Journal of Chemistry**. v. 7, n. 1, p. 111-116, 20109.

PELAEZ, V.; TERRA F. H. B.; SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27-48, 2010.

PEREIRA, J. P. **Espacialização do uso de agrotóxico por região de saúde no RS**. 2014. 121 f. Monografia (Bacharel em Geografia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Geociências, Departamento de Geografia, Porto Alegre, 2014.

PEROBELLI, J. E. et al. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 73, p. 991-1002, 2010.

PHILIPPI JR., A., MARTINS, G. Águas de abastecimento. In: PHILIPPI JR., A. (Org). **Saneamento, saúde e ambiente**: Fundamentos para um desenvolvimento sustentável. Baueri, SP: Manole, 2018, cap. 6, p. 145-207, 2018.

- PIASAROLO, L. et al. Influência da polaridade de pesticidas não-iônicos sobre sua sorção em um latossolo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1802-1809, 2008.
- PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, p. 3281-3293, 2017.
- PORTO, R. L. et al. (Org.). **Fundamentos para gestão da água**. São Paulo, 2012.
- RANK, J. The method of Allium anaphase-telophase chromosome aberration assay, **Ekologija**, p. 38-42, 2003.
- REBOUÇAS, A. C. Água doce no mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. São Paulo: Escrituras, 2006.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul (SES). Portaria Nº 320, de 24 de abril de 2014. Estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS. **Diário Oficial [do] Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2014.
- ROCHA, G. de A. et al. **Recursos hídricos**. São Paulo: SMA / CEA, 2011.
- RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation, In: **B. Cummings** (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595-621, 2002.
- SANTOS, R. F. dos. **Planejamento ambiental: teoria e prática**. São Paulo: Oficina de textos, 2004.
- SCHELL, T. et al. Assessing the effects of field-relevant pesticide mixtures for their compliance with the concentration addition model – an experimental approach with *Daphnia magna*. **Science of The Total Environment**, v. 644, p. 342-349, 2018.
- SCHNEIDER, S. E. **Determinação de agrotóxicos e fármacos em água empregando extração em fase sólida, GC-MS e UHPLC-MS/MS**. 2013. 135 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Santo Antônio da Patrulha, 2013.
- SCORZA JÚNIOR, R. P.; NÉVOLA, F. A. ; AYELO, V. S.; **Avaliação da contaminação hídrica por agrotóxico. Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2010.
- SHEA, D. Transport and Fate of Toxicants in the Environment. In: HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 27, p. 479-499.
- SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA FILHO, E.C. Fundamentos da toxicologia ambiental. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. cap. 2, p. 17-26, 2013.
- SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 22, p. 277-284, 2017.

SPIRO, T.G., STIGLIANI, W.M. **Química ambiental**. 2. ed. São Paulo: Perarson Prentice Hall, 2009.

THEODORAKIS, C. W. et al. Genetics of radionuclide-contaminated mosquitofish populations and homology between *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 1992-1998, 1998.

TOMIĆ, A. S.; ANTANASIJEVIĆ, D. RISTIĆ, M.; PERIĆ-GRUJIĆ, M.; POCAJT, V.. et al. A linear and non-linear polynomial neural network modeling of dissolved oxygen content in surface water: Inter- and extrapolation performance with inputs' significance analysis. **Science of the Total Environment**, v. 610-611, p. 1038-1046, 2017.

TUCCI, C. et al. (Org.). **Hidrologia: ciência e aplicação**. 4. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

TUNDISI, J. G. Novas perspectivas para a gestão de recursos hídricos. **Revista USF**, . n. 70, p. 24-35, 2006.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). USEPA/600/4 – 85/014. **Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. Cincinnati, Ohio, 162p., 1985.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, p. 2391-2399, 2006.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

WANG, D.S. et al. Removal of DBP precursors in micro-polluted source waters: A comparative study on the enhanced coagulation behavior. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 271-278, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION — WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. Ed. Malta, 2011.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME (WWAP). The United Nations World Water Development Report 3: **Water in a Changing World**. Paris: UNESCO, and London: Earthscan, 2009.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C. de. O essencial dos fungicidas empregados no controle de doenças – parte básica. In: ZAMBOLIM, L. et al. **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)**. Viçosa, MG:UFV/DFP, 2008, cap. 3, p. 77-148.

ZINI, L. B. **Contaminação de agrotóxicos na água para consumo humano no RS: Avaliação de riscos, desenvolvimento e validação de método empregando SPE e LC-MS/MS**. 2016. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre, 2016.

ZUMACH, R. **Enquadramento de curso de água: Rio Itajaí-Açu e seus principais afluentes em Blumenau**. 2003. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) — Curso de

Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.