

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

**DETERMINAÇÃO DO CARBOFURAN EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E  
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL DE BIOACUMULAÇÃO EM  
POECILIA RETICULATA POR CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV)**

**MELISSA PAOLA MEZZARI**

FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA  
JULHO, 2000

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental**

**Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**

**MELISSA PAOLA MEZZARI**

**DETERMINAÇÃO DO CARBOFURAN EM AMOSTRAS AMBIENTAIS  
E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL DE BIOACUMULAÇÃO EM  
POECILIA RETICULATA POR CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: William Gerson Matias  
Co-orientador: Luiz A. S. Madureira

FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA  
JULHO, 2000

**DETERMINAÇÃO DO CARBOFURAN EM AMOSTRAS AMBIENTAIS  
E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL DE BIOACUMULAÇÃO EM  
POECILIA RETICULADA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV).**

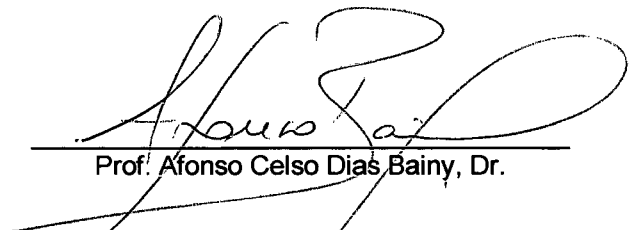
**MELISSA PAOLA MEZZARI**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

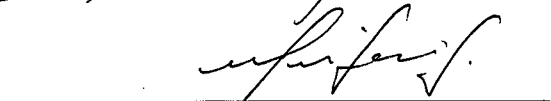
**MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

na Área de Tecnologias de Saneamento Ambiental

Aprovado por:



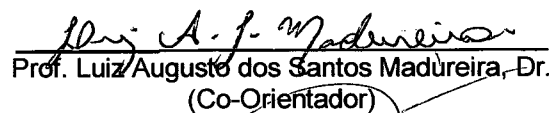
Prof. Afonso Celso Dias Bairy, Dr.



Prof. Maurício Luiz Sens, Dr.



Prof. Flávio Rubens Lapoli, Dr.  
(Coordenador)



Prof. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.  
(Co-Orientador)



Prof. William Gerson Matias, Dr.  
(Orientador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL  
JULHO/2000

*If having endured much, we at last asserted our "right to know" and if, knowing, we have concluded that we are being asked to take senseless and frightening risks, then we should no longer accept the counsel of those who tell us that we must fill our world with poisonous chemicals, we should look around and see what other course is open to us.*

Rachel Louise Carson, *Silent Spring*



## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. William Gerson Matias pela orientação;

Ao prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira pela aceitação na co-orientação deste trabalho e paciência nas discussões do tema;

À banca examinadora, Dr. Afonso Celso Dias Bainy e Dr. Maurício Luiz Sens, por todas as considerações referentes a este trabalho;

Ao prof. Dr. Carlos Soares, professor do Departamento de Bioquímica, pelo seu auxílio, acompanhamento e incentivo;

Ao MSc. Hugo Gosmann, funcionário do CIRAM, pela sua atenção e sua grande ajuda;

Ao Dr. Francisco Deschamps, Bioquímico da EPAGRI, por fornecer as amostras padrões dos metabólitos do composto Carbofuran e pelo enriquecimento de meu trabalho;

Ao prof. Dr. Renato Zanella, professor da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela atenção e ajuda;

Ao Sr. Adilson de Freitas Zamparetti, Engenheiro Civil da EPAGRI, pela elaboração do mapa de localização dos pontos de coleta;

À profa. Dra. Rozangela Curi Pedroza e prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, professores do Departamento de Bioquímica e Ecologia e Zoologia, pela utilização de seus laboratórios para preparação das amostras;

Ao prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira, professor do Centro de Ciências Agrárias, pelo empréstimo do material utilizado para as coletas no Rio Cubatão Sul;

Ao colega Alexandre Cardoso, biólogo do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, por enviar algumas referências bibliográficas essenciais referentes à identificação e caracterização das espécies de peixes analisadas;

Ao MSc. Júlio César Leão, funcionário do CIRAM, pela orientação aos pontos de coleta;

Ao Seu “Zé”, piscicultor da região de Santo Amaro da Imperatriz, pelo fornecimento de alguns peixes para análise;

À Ivana Baptista, bióloga e mestranda do curso de pós-graduação em Engenharia Ambiental, pela ajuda nas coletas, no laboratório e por seu companheirismo;

À Juliana Stabile de Oliveira, bióloga e funcionária do laboratório de Ictiologia da UFSC, pela ajuda nas literaturas referentes à identificação dos peixes;

À bióloga Samira Meurer e ao graduando Rafael, do Laboratório de Piscicultura de Água Doce, do Departamento de Aqüicultura, pela identificação dos peixes;

Aos colegas e funcionários do Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA), em especial à Américo Luz Júnior, Nilton Cezar Pereira, Marilda, Carlos Roberto Vieira, Leandro Bassani, Beatriz Kaipper e Lúcia;

Ao pessoal do Laboratório (do prof. Madureira), em especial à mestranda Luciana e o graduando Sandro, pela ajuda e atenção;

Aos amigos da Pós-Graduação Cleide Carvalho, Viviane Spinelli, Décio Luis Dandollini, Rosane Campos e Fábio Zambonin, pelo incentivo e admiração;

Ao MSc. Fábio Neto Moreno, grande amigo e colega;

À minha nova família, meus futuros sogros, cunhados, vó, concunhados e sobrinhos, por todo o apoio e momentos de distração e alegria;

Ao pescador, motorista, “office boy” e ajudante... meu pai! Obrigada por tudo!

À minha irmã Isabella Anna Mezzari que acompanhou alguns dos experimentos feitos em laboratório, além da correção gramatical da dissertação;

À minha mãe Nair J. Mezzari, meu irmão Fabrizio Cario Mezzari e minha cunhada Gisele Simas que também ajudaram na correção da dissertação;

Ao meu amor Márcio Luís Busi da Silva, pela essencial ajuda ao primeiro passo da dissertação;

À Deus, meu guia, minha crença, minha realização.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>01</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>04</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	04
<b>2.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS</b> .....	04
<b>2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE OS INSETICIDAS</b> .....	05
<b>2.3. UTILIZAÇÃO DOS INSETICIDAS NA REGIÃO DE ESTUDO</b> .....	08
2.3.1. BREVE HISTÓRICO .....	08
2.3.2. INSETICIDAS UTILIZADOS .....	08
2.3.3. LEGISLAÇÃO .....	10
2.3.4. IMPACTOS AMBIENTAIS .....	11
<b>2.4. CARBOFURAN</b> .....	14
2.4.1. PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS .....	14
2.4.2. DISPERSÃO NO MEIO AMBIENTE .....	15
2.4.3. EFEITOS ECOLÓGICOS .....	20
2.4.4. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....	22
2.4.5. ASPECTOS SOBRE A INTOXICAÇÃO .....	23
<b>2.5. METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE AGROTÓXICOS</b> .....	26
2.5.1. TESTES DE TOXICIDADE .....	26
2.5.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBAMATOS ..	29
2.5.3. SISTEMA OPERACIONAL CLAE-UV .....	30
2.5.4. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CLAE-UV .....	31

2.5.4.1.	EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS .....	31
2.5.4.2.	PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	32
2.5.4.3.	DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS .....	34
2.5.4.4.	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA .....	35
2.5.4.5.	REGISTRO DAS ANÁLISES .....	36
<b>CAPÍTULO III .....</b>		<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.</b>	<b>DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....</b>	<b>38</b>
3.1.1.	LOCALIZAÇÃO .....	38
3.1.2.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AMBIENTAL .....	39
3.1.3.	DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA .....	40
<b>3.2.</b>	<b>COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS .....</b>	<b>42</b>
3.2.1.	AMOSTRAS LÍQUIDAS .....	42
3.2.2.	AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	43
3.2.3.	DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES COLETADAS .....	43
3.2.3.1.	CARÁ .....	43
3.2.3.2.	DENTUDO .....	44
3.2.3.3.	BIRU .....	45
<b>3.3.</b>	<b>LAVAGEM DE VIDRARIA .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4.</b>	<b>METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO .....</b>	<b>46</b>
3.4.1.	AMOSTRAS LÍQUIDAS .....	46
3.4.2.	AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	48
3.4.2.1.	METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE TECIDOS I .....	49
3.4.2.2.	METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE TECIDOS II .....	50
<b>3.5.</b>	<b>DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS .....</b>	<b>51</b>
3.5.1.	SEPARAÇÃO E DETECÇÃO .....	51
3.5.2.	CURVA PADRÃO DO CARBOFURAN .....	52
3.5.3.	INJEÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS .....	52
<b>3.6.</b>	<b>TESTES CONTROLE PARA DETERMINAÇÃO DO FATOR DE RECUPERAÇÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>3.7.</b>	<b>TESTES TOXICOLÓGICOS .....</b>	<b>53</b>
3.7.1.	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE UTILIZADA PARA OS TESTES .....	53
3.7.2.	CAPTURA E ADAPTAÇÃO .....	55
3.7.3.	REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE .....	56
3.7.4.	REALIZAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA .....	57

3.7.5. REALIZAÇÃO DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO .....	58
3.7.6. COLETA E PRESERVAÇÃO DOS REATIVOS BIOLÓGICOS .....	59
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>60</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO .....</b>	<b>60</b>
4.1.1. SENSIBILIDADE DO SISTEMA DE DETECÇÃO UV .....	60
4.1.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA .....	62
<b>4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN .....</b>	<b>63</b>
4.2.1. EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO PELAS MINICOLUNAS C-18 .....	64
4.2.2. EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS BRANCO FORTIFICADAS .....	65
4.2.3. EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS DE TECIDO FORTIFICADAS .....	67
<b>4.3. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS EM LABORATÓRIO .....</b>	<b>71</b>
4.3.1. TESTES DE SENSIBILIDADE E TOXICIDADE AGUDA .....	71
4.3.2. TESTE DE BIOACUMULAÇÃO .....	73
<b>4.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>76</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>78</b>
<b>6. RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 1 – ÁGUA DE DILUIÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 2 – SOLUÇÃO TAMPÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 3 – SOLUÇÃO DE <math>K_2Cr_2O_7</math> PARA TESTE DE SENSIBILIDADE .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 4 – SOLUÇÃO DE FURADAN PARA TESTES .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 5 – CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO 6 – OBSERVAÇÕES REALIZADAS NOS PONTOS DE COLETA DO RIO CUBATÃO SUL .</b> <b>.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 7 – TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 8 – OBSERVAÇÕES E MORTALIDADE DE PEIXES NOS TESTES TOXICOLÓGICOS ...</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 9 – DADOS BIOMÉTRICOS DOS INDIVÍDUOS DE <i>POECILIA RETICULATA</i> UTILIZADOS</b> <b>PARA OS TESTES DE RECUPERAÇÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 10 – DADOS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES COLETADOS NO RIO CUBATÃO SUL .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 11 – DADOS BIOMÉTRICOS DA ESPÉCIE <i>POECILIA RETICULATA</i> UTILIZADOS PARA</b> <b>OS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA .....</b>	<b>88</b>

<b>ANEXO 12 – ANÁLISE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 13 – PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO 14 – PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO COM <i>POECILIA RETICULATA</i> .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO 15 – PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO DO EXPERIMENTO CONTROLE .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO 16 – CONCENTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBAMATOS ENCONTRADOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO CUBATÃO SUL .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS

1	EXEMPLO DAS FORMAS ESTRUTURAIS DOS DIFERENTES SUBGRUPOS QUÍMICOS DE INSETICIDAS.....	06
2	FÓRMULA ESTRUTURAL DO CARBOFURAN .....	15
3	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO CARBOFURAN E DE SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS .....	17
4	CINÉTICA DE BIOACUMULAÇÃO DO MODELO DE TRANSPORTE DE AGROTÓXICOS .....	19
5	TRANSFERÊNCIA E TRANSFORMAÇÃO DE POLUENTES EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS ATRAVÉS DE PROCESSOS QUÍMICOS, FÍSICOS E BIOLÓGICOS .....	21
6	PROCESSOS NATURAIS QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DO RIO E O COMPORTAMENTO DOS POLUENTES NO MEIO AMBIENTE AQUÁTICO .....	22
7	SEMELHANÇA ESTRUTURAL ENTRE OS GRUPOS METILCARBAMIL, DO CARBOFURAN, E ACETIL, DA ACETILCOLINA .....	23
8	ESQUEMA GERAL DA CLAE COM DETECTOR UV .....	31
9	REPRESENTAÇÃO DE UM CROMATOGRAMA .....	37
10	MAPA DE LOCALIZAÇÃO DO RIO CUBATÃO SUL .....	38
11	A AGRICULTURAS ENTRE A MATA ATLÂNTICA DOS MORROS. LOCAL: DIVISA DOS MUNICÍPIOS DE SANTO AMARO DA IMPERATRIZ E ÁGUAS MORNAS .....	40
12	MAPA DE LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRAIS AO LONGO DO RIO CUBATÃO SUL E MUNICÍPIOS .....	41
13	PONTOS DE COLETA REALIZADOS AO LONGO DO RIO CUBATÃO SUL .....	42
14	DESENHO ESQUEMÁTICO DO CARÁ .....	44
15	DESENHO ESQUEMÁTICO DO DENTUDO .....	45
16	DESENHO ESQUEMÁTICO DO BIRU .....	45
17	ESQUEMA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO, ELUIÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS CONTAMINADAS COM CARBOFURAN UTILIZANDO MINICOLUNAS .....	47
18	SISTEMA (MANIFOLD) PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	47
19	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO CUBATÃO SUL .....	48

20	PROCEDIMENTO GERAL DA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO DE PEIXES REALIZADO PELAS METODOLOGIAS MET I E MET II .....	50
21	DIMORFISMO SEXUAL EXTERNO DE <i>POECILIA RETICULATA</i> .....	54
22	DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESPÉCIE <i>POECILIA RETICULATA</i> .....	54
23	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE TRANSPORTE E ADAPTAÇÃO DOS ORGANISMOS .....	56
24	ESQUEMA DO TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS COM DICROMATO DE POTÁSSIO .....	57
25	CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA INTEGRAÇÃO MANUAL PARA A CORREÇÃO DO CÁLCULO DA ÁREA REAL DO PICO DO CARBOFURAN .....	61
26	CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA DO CARBOFURAN .....	63
27	CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA LÍQUIDA (ÁGUA ULTRA PURA) FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN PELA MINICOLUNA .....	64
28	CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA BRANCO DA MET I (LFB I) FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET I .....	66
29	CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA BRANCO DA MET II (LFB II) FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET II .....	66
30	CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA DE TECIDO DA MET I FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET I .....	68
31	CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA DE TECIDO DA MET II FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET II .....	68
32	CROMATOGRAMAS DOS METABÓLITOS 3-HIDROXICARBOFURAN (A) E 3-CETOCARBOFURAN (B) EM CONCENTRAÇÕES DE 2 MG/L .....	70
33	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO NOS DIFERENTES PROCEDIMENTOS AVALIADOS .....	71
34	EFEITO DA $CL_{50}$ SOBRE OS REATIVOS BIOLÓGICOS DOS TESTES DE SENSIBILIDADE E TOXICIDADE AGUDA. COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS POR FRELLO (1998) .....	72



## LISTA DE TABELAS

1	AGROTÓXICOS UTILIZADOS NAS CULTURAS DE TOMATE, BATATA E PIMENTÃO .....	09
2	RELAÇÃO DE FUNGICIDAS, HERBICIDAS E INSETICIDAS MAIS TÓXICOS UTILIZADOS NA REGIÃO DA BACIA DO RIO CUBATÃO SUL .....	09
3	REAÇÕES IMPORTANTES DE ALGUMAS CLASSES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS QUÍMICOS .....	18
4	SINAIS E SINTOMAS NAS INTOXICAÇÕES POR INSETICIDAS CARBAMATOS .....	24
5	CONCENTRAÇÕES DO CARBOFURAN UTILIZADAS POR FRELLO (1998) NOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>POECILIA RETICULATA</i> E <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	28
6	CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS AGROTÓXICOS .....	28
7	DIFERENTES MODOS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA .....	36
8	PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTROLE DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN EM ÁGUA. ELUIÇÃO COM 5 ML DE METANOL EM MINICOLUNAS C-18 .....	64
9	PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTROLE DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN EM MET I E MET II. ELUIÇÃO COM 5 ML DE METANOL EM MINICOLUNAS C-18 .....	65
10	PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DO CARBOFURAN UTILIZANDO AMOSTRAS BIOLÓGICAS FORTIFICADAS (LFM). ELUIÇÃO COM 5 ML DE METANOL EM MINICOLUNAS C-18 .....	68
11	CL <sub>50</sub> EM µG/L CALCULADA NO PROGRAMA "TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD FOR ESTIMATING MEDIAN LETHAL CONCENTRATIONS IN TOXICITY BIOASSAYS" PARA <i>POECILIA RETICULATA</i> NOS TESTES DE SENSIBILIDADE E TOXICIDADE AGUDA .....	73
12	QUANTIDADES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO .....	80
13	REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DO TAMPÃO TRIS .....	81
14	VOLUMES DA SOLUÇÃO-MÃE DE K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ESTABELECIDAS PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE .....	82

15	VOLUMES DA SOLUÇÃO-MÃE DE CARBOFURAN, UTILIZADOS NOS AQUÁRIOS CONTENDO 1 L DE ÁGUA DE DILUIÇÃO, PARA OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PREESTABELECIDAS .....	82
16	PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA EM 5 ML .....	83
17	DADOS SOBRE AS OBSERVAÇÕES REALIZADAS EM CAMPO .....	84
18	RECOMENDAÇÕES PARA ESTOCAGEM, PRESERVAÇÃO E TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE TECIDOS DE PEIXES, MOLUSCOS, CRUSTÁCEOS E TARTARUGAS PARA PROCEDIMENTO DE ANÁLISE EM LABORATÓRIO .....	85
19	NÚMERO DE PEIXES MORTOS NOS TESTES DE SENSIBILIDADE COM DICROMATO DE POTÁSSIO APÓS UM PERÍODO DE 24 HORAS (N = 5) .....	86
20	NÚMERO DE PEIXES MORTOS NOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM CARBOFURAN APÓS UM PERÍODO DE 48 HORAS (N = 10) .....	86
21	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 0 HORAS (INÍCIO DO TESTE) .....	89
22	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 24 HORAS .....	89
23	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 48 HORAS .....	90
24	ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS DO TESTE BIOACUMULAÇÃO NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 0 HORAS (INÍCIO DO TESTE) .....	90
25	ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS DO TESTE BIOACUMULAÇÃO NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 24 HORAS .....	90
26	ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS DO TESTE BIOACUMULAÇÃO NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 48 HORAS .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BCF	Bioconcentration Factor
FBC	Fator de Bioconcentração
C-18	Minicoluna de octadecil
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Mediana
CEO	Concentração de Efeito Observado
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Mediana
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLI <sub>50</sub>	Concentração Letal Inicial Mediana
CLL	Cromatografia de Partição Líquido-Líquido
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Mediana
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
LFB	Laboratory Fortified Blank
LFB I	Amostra Branco Fortificada pelo procedimento da MET I
LFB II	Amostra Branco Fortificada pelo procedimento da MET II
LFM	Laboratory Fortified Matrix
LFM I	Amostra de Tecido Fortificada pelo procedimento da MET I
LFM II	Amostra de Tecido Fortificada pelo procedimento da MET II
LT <sub>50</sub>	Limite de Tolerância Mediano
MeOH	Metanol
MET I	Metodologia de Extração de Tecido I
MET II	Metodologia de Extração de Tecido II
p. e.	Ponto de ebulição
SPE	Solid Phase Extraction
UV	Ultravioleta

## RESUMO

Os carbamatos são agrotóxicos amplamente utilizados para a proteção de lavouras. Muitos inseticidas carbamatos, como o Carbofuran, apresentam atividades tóxicas elevadas, sendo extremamente perigosos à saúde humana. O tempo de permanência do Carbofuran nas lavouras pode variar em dias, semanas ou meses, de acordo com a sua taxa de meia-vida nas diversas condições ambientais. O Carbofuran, é um inseticida-nematicida amplamente utilizado na região da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul, que destaca-se por ser uma importante região agrícola da Grande Florianópolis. As lavouras, localizadas nas margens dos rios, constituem um quadro problemático para a Grande Florianópolis, visto que a população é abastecida pelas águas do Rio Cubatão Sul, expostas aos agrotóxicos. O objetivo deste trabalho foi de verificar a presença deste composto nas águas e nos peixes do Rio Cubatão Sul, a partir de técnicas cromatográficas (CLAE-UV), bem como avaliar o seu potencial de bioacumulação a partir de testes com peixes da espécie *Poecilia reticulata*. A CLAE-UV de fase reversa foi adaptada para a determinação do Carbofuran em amostras ambientais de água e peixes. O sistema foi programado com gradiente isocrático de metanol e água, vazão de 1,2 mL/min e detecção no UV à 190 nm. Duas metodologias de extração de tecidos, com acetonitrila e éter, foram avaliadas na eficiência de recuperação dos resíduos de Carbofuran em tecidos de peixes. Ambas utilizaram o sistema SPE com minicolunas de octadecil C-18 e eluição com metanol. Testes de sensibilidade com dicromato de potássio, foram efetuados para avaliar a aptidão dos peixes da espécie *Poecilia reticulata* para os testes de toxicidade aguda e bioconcentração. Os testes de toxicidade aguda com Carbofuran foram efetuados para a reavaliação e comparação dos resultados obtidos em trabalhos anteriores. As concentrações para os testes de bioconcentração foram estabelecidas em valores acima e abaixo da  $CL_{50}$  obtida nos testes de toxicidade aguda, calculado com o programa "Trimed Sperman-Karber Method". A avaliação das diferentes metodologias de extração do Carbofuran em tecidos de peixes fortificados, apresentaram baixa eficiência de extração, em torno de 20 e 40% de recuperação. Ao contrário das amostras de água fortificadas, houve uma recuperação elevada, com 91,51%. A recuperação do Carbofuran nas amostras de água e peixes do teste de bioconcentração foi nula, bem como das amostras do Rio Cubatão Sul. Estes resultados comprovam que o Carbofuran não é bioacumulado, pois a degradação biológica ocorre rapidamente, não permitindo a sua detecção devido ao longo processo de preparação e extração de tecidos. A ausência do Carbofuran na água dos aquários, deve-se aos processos de hidrólise, aeração, degradação fotoquímica e biológica, que ocorreram nos experimentos controle. É possível que não tenha ocorrido a total degradação do Carbofuran, devido ao tempo de meia-vida elevado nestas condições e, principalmente, devido à sensibilidade da metodologia de análise aplicada, que pode ter ocultado a presença de concentrações menores não detectadas.

## ABSTRACT

Carbamates are pesticides widely used for protection of crops. Many of the carbamates pesticides such as Carbofuran, are highly toxic and extremely dangerous for humans. The persisting time of Carbofuran in crops may vary from days to months, depending on the half-life of this compound in the adverse environment condition. Carbofuran is an insecticide-nematicide largely used in the Hydrographic Basin of Cubatão Sul River, which is an important agricultural region of Florianópolis-SC/Brazil and adjacent cities. The crops, located along the riverside, represent a problematic issue to Florianópolis, since the population is supplied by the surface water of Cubatão Sul River which has been exposed to pesticides. The purpose of this work was to analyze the presence of Carbamate in the Cubatão Sul River water and fish, by using High Pressure Liquid chromatography techniques (HPLC-UV). The bioaccumulation potential was also performed in the HPLC-UV using *Poecilia reticulata* fish species. The reversed phase HPLC-UV was adapted for determination of trace concentrations of Carbofuran in water and fish environmental samples. The system was set to operate with methanol-water in an isocratic gradient, flow-rate of 1.2 mL/min and UV detection at 190 nm. Acetonitrile and ether were tested in tissue extraction methods to evaluate Carbofuran recovery efficiency. SPE system with C-18 columns was used in both techniques. Sensibility tests with  $K_2Cr_2O_7$  were required to determine if *P. reticulata* fish were able to support acute toxicity and bioconcentration tests. The Carbofuran acute toxicity tests were performed to reevaluate and compare with results from recent studies. The concentrations used for bioconcentration tests were established according to the values of the acute toxicity test calculated in the Trimmed Spearman-Kärber Method program. The results obtained from the tissue extraction methods with ether and acetonitrile, showed low recovery efficiency, around 32,7% e 30,8%, respectively. However, the fortified water samples showed a high recovery efficiency of 91,51%. Recovery tests were found in either *P. reticulata* fortified tissues and fortified water, but neither in the fish and water from bioconcentration assays and nor in the water and fish samples from the Cubatão Sul River. These results might be related with the fact that Carbofuran is fast degraded thus avoiding its detection after a long period of sample preparation and extraction tissue processes. Since hydrolysis, aeration, photochemical and biological degradation are currently described for Carbofuran in water samples, these might explain the very low concentration of this compound or even its absence in the control experiments set. The high life-time in the experimental conditions and the poor sensibility of the method applied using HPLC-UV may have hidden detection of Carbofuran and readings of low concentrations as well.

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos, apesar de sua importância no combate às pragas, que assolam as plantações e, às pestes, transmissoras de doenças mortais para os humanos, são compostos químicos que trazem graves consequências à saúde humana, animal e ambiental. A questão dos agrotóxicos, principalmente sobre os aspectos da contaminação ambiental e intoxicação humana, tem sido amplamente abordada em inúmeras pesquisas nos últimos anos. Com base nestes estudos, e com o objetivo de minimizar a problemática dos agrotóxicos, foram desenvolvidas novas técnicas não poluidoras para a proteção dos cultivos, como por exemplo, o controle biológico e os transgênicos. Porém, a oportunidade de melhorar a qualidade de vida com a utilização destas técnicas não poluidoras, é uma realidade ainda distante, principalmente para países subdesenvolvidos. No Brasil, esta tecnologia está muito além do alcance de várias comunidades rurais, que ainda utilizam metodologias antigas de combate às pragas, além dos agrotóxicos.

➤ Em Santa Catarina, a população rural da Grande Florianópolis, concentra-se na bacia hidrográfica do rio Cubatão Sul. Os agricultores da região utilizam uma elevada quantidade de agrotóxicos para a manutenção de suas culturas. A região destaca-se por ser a maior produtora de tomates do Estado, e por isso, utilizam agrotóxicos em quantidades apreciáveis para possibilitar níveis altos de produção. Dentre os agrotóxicos mais usados, destacam-se os carbamatos, que são compostos pouco persistentes no ambiente, mas possuem formulações com ingredientes ativos, classificados como extremamente tóxicos. Entretanto, a acentuada comercialização desses produtos químicos tóxicos na região, deve-se, principalmente, à facilidade de acesso à compra e ao seu uso excessivo nas lavouras. A sobreutilização é efetuada por muitos agricultores que desconhecem o

nível de toxicidade dos produtos e os aplicam sem proteção. Com isso, agravam-se os riscos de intoxicação dos agricultores, responsáveis pela aplicação do agrotóxico, e da contaminação ambiental.

Dentre os aspectos ambientais, a contaminação dos recursos hídricos é mais preocupante, pois o Rio Cubatão Sul é responsável pelo abastecimento de aproximadamente 500.000 habitantes da Grande Florianópolis. A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul é abastecida por precipitações pluviométricas que ocorrem em todos os meses do ano, com poucas deficiências hídricas. As precipitações, por outro lado, facilitam o transporte dos resíduos de agrotóxicos presentes no solo para camadas mais profundas, contaminando aquíferos subterrâneos, além dos rios mais próximos, através do processo de escoamento superficial. Desse modo, a água dos rios apresenta-se comprometida para o consumo humano imediato, além de afetar diretamente a vida aquática devido a sua alta toxicidade.

De acordo com pesquisas realizadas por GICQUEL & LEÃO (1997), no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foram detectados elevados níveis de inseticidas carbamatos, organofosforados e triazinas no Rio Cubatão Sul. O Carbofuran, um inseticida carbamato, foi encontrado com maior ocorrência, o que evidencia o seu elevado uso na região. Com isso, há um alto risco de contaminação da população que consome essa água, visto que o tratamento convencional da água captada, não possibilita a eliminação dos agrotóxicos.

O monitoramento da qualidade ambiental da região tem sido realizado por grupos de pesquisa do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC. Para tanto, foram desenvolvidas no Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA), várias metodologias de análises de água e solo contaminados por agrotóxicos, principalmente o Carbofuran, utilizando cromatografia líquida e gasosa, além de testes de toxicidade com organismos aquáticos.

As análises de Carbofuran em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (“High Performance Liquid Chromatography” – HPLC) utilizadas no LIMA, foram aplicadas com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência. Esta técnica, estabelecida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA – “U. S. Environmental Protection Agency”) tem alta eficiência na separação e na detecção dos carbamatos em geral, além de propiciar limites de detecção muito baixos. Entretanto, a análise de carbamatos também pode ser realizada com

detecção por ultravioleta, que fornece uma rápida análise dos agrotóxicos, sem necessitar a derivatização destes.

O presente estudo teve como objetivo geral de avaliar o potencial de bioacumulação do Carbofuran em *Poecilia reticulata* a partir de análises em CLAE com detecção ultravioleta (UV).

Como objetivos específicos:

- avaliar a toxicidade do composto químico Carbofuran em *Poecilia reticulata* através de testes de toxicidade aguda em laboratório;
- desenvolver metodologias eficientes de extração e purificação de Carbofuran e metabólitos (3-hidroxicarbofuran e 3-cetocarbofuran) em tecidos de peixes;
- detectar e quantificar em CLAE-UV o composto químico Carbofuran e seus metabólitos em peixes e na água do Rio Cubatão Sul.

As amostras foram coletadas em alguns pontos ao longo do Rio Cubatão Sul, com base em metodologias convencionais de coleta utilizadas em trabalhos científicos. Os procedimentos de preservação e extração das amostras, foram realizados de acordo com metodologias estabelecidas pela U.S. EPA, porém, modificadas segundo alguns autores de trabalhos científicos: GOEL *et al.* (1995), BRESSA *et al.* (1996), BROWN *et al.* (1996) e MARUYA & LEE (1998).

Para a determinação de resíduos de Carbofuran nas amostras ambientais do Rio Cubatão Sul (água e peixe) em CLAE-UV, também foram adaptadas algumas metodologias utilizadas em trabalhos científicos, selecionados para o desenvolvimento do presente estudo.



## CAPÍTULO II

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas ou biocidas, são denominações dadas a substâncias químicas tóxicas, naturais ou sintéticas, utilizadas para a prevenção, destruição, repulsão ou atenuação das doenças e das pragas que atacam, lesam ou transmitem enfermidades às plantas, aos animais e ao homem (ZAMBRONE, 1986; GICQUEL, 1998).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua similaridade na estrutura e na composição química. Existem os inorgânicos, compostos por metais (arsênio, cobre, chumbo, mercúrio, e outros), e os orgânicos, que podem ser encontrados naturalmente em certas espécies de plantas (nicotina, rotenona, piretróides) ou ser sintetizados (FREEDMAN, 1993). Embora os agrotóxicos da lavoura incluam alguns componentes naturais, a maioria é constituída por misturas produzidas em laboratórios. Estas incluem os organometálicos, como o metilmercúrio; os fenóis, como os triclorofenóis; os organoclorados, como o DDT; os organofosforados, como o paration; os carbamatos, como o Carbofuran; as triazinas, como a atrazina; e os piretróides sintéticos, como a piretrina (FREEDMAN, 1993; RICKLEFS, 1996).

Segundo SCHWARZENBACH *et al.* (1993) e FREEDMAN (1993), os agrotóxicos apresentam efeitos biológicos específicos para um ou vários organismos alvo, como: as ervas invasoras (herbicidas), os fungos (fungicidas), os insetos (inseticidas) e outros organismos não desejados (acaricidas, rodenticidas, piscicidas,

moluscidas, etc). Dentre estes, o grupo dos inseticidas apresenta a maior variedade de formulações químicas sintetizadas, devido a elevada biodiversidade<sup>1</sup> que os organismos desta classe apresentam.

## 2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE OS INSETICIDAS

Os inseticidas são compostos químicos tóxicos sintéticos, em sua grande maioria, mas também podem ser extraídos de várias espécies de plantas. Apesar de constituir uma prática muito antiga, os inseticidas naturais ainda são muito utilizados nas lavouras. A nicotina, extraída da *Nicotiana tabacum* (o tabaco), e a piretrina, extraída das flores do gênero *Chrysanthemum* sp., apresentam elevada ação neurotóxica. Entretanto, são instáveis à ação do ar, luz, umidade e temperatura, se comparado com as piretrinas sintéticas ou piretróides, os quais são obtidos através da estrutura química das piretrinas naturais (SHIBAMOTO & BJELDANES, 1996).

Além das piretrinas naturais e sintéticas, existem outras classes de inseticidas sintéticos representados pelos organoclorados e os inibidores da acetilcolinesterase, constituídos pelos organofosforados e carbamatos (ZAMBRONE, 1986). Ao contrário dos inseticidas naturais, apresentam maior estabilidade em condições ambientais (LU, 1996).

As propriedades de ação e a estabilidade dos compostos orgânicos sintéticos no meio ambiente, são influenciadas pelas propriedades físicas e químicas específicas que cada composto apresenta. Com isso, a distribuição do agrotóxico no meio ambiente são influenciadas diretamente pela presença dessas propriedades, as quais devem ser consideradas no estudo do movimento destes compostos em ambientes aquáticos, aéreos e terrestres (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993). Sabe-se que os inseticidas, em sua grande maioria, são compostos hidrofóbicos, solúveis em solventes orgânicos, instáveis em altas temperaturas e decompostos em meio alcalino.

A diversidade estrutural promovida pelo arranjo, disposição e número de elementos ligados ao esqueleto carbônico, confere a formação de diferentes classes

---

<sup>1</sup> Estimativas de especialistas concluem que o número final de espécies do mundo possa estar entre 10 e 30 milhões, sendo que a grande maioria está representada por invertebrados, particularmente os insetos (RICKLEFS, 1996).

de inseticidas. A figura 1 representa formas estruturais de um composto organoclorado (1,1,1-tricloro-2,2-di-(*p*-clorofenil) etano; DDT), um organofosforado (O,O-dietil-O-*p*-nitrofeniltiofosfato; Paration) e a fórmula geral dos carbamatos.

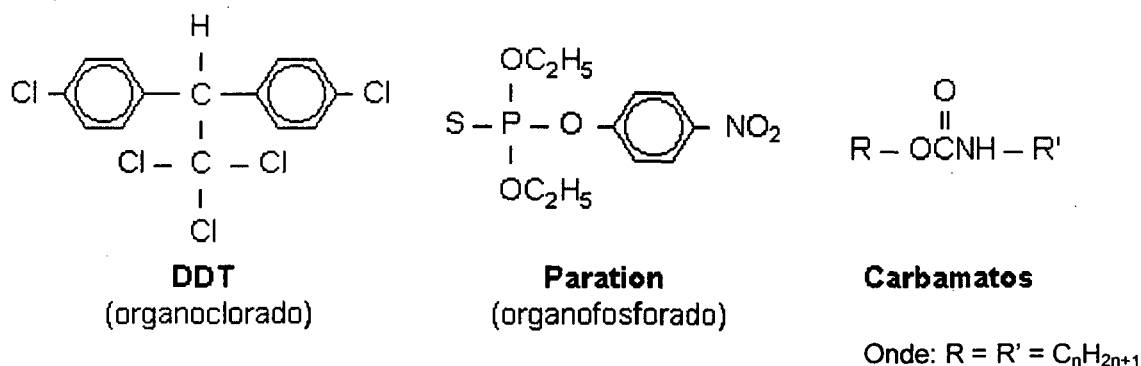


FIGURA 1 – EXEMPLO DAS FORMAS ESTRUTURAIS DOS DIFERENTES SUBGRUPOS QUÍMICOS DE INSETICIDAS

FONTE: LU, 1996.

Os agrotóxicos em geral, quando lançados ao meio ambiente, podem sofrer alterações por processos físicos (fenômenos de transporte e mistura), químicos (transformações em diferentes fases ou compartimentos ou alterações estruturais) e biológicos (reações de transformação) (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993).

Os inseticidas, quando absorvidos pelos organismos, causam reações neurotóxicas, capazes de provocar efeitos adversos no sistema nervoso central, em nervos periféricos e órgãos do sentido. Estes efeitos são considerados reversíveis quando ocorrem mudanças funcionais temporárias e, irreversíveis, quando envolvem mudanças estruturais com degeneração das células nervosas (LARINI, 1997).

Os inseticidas organoclorados, ao contrário dos organofosforados, carbamatos e piretróides, apresentam efeitos irreversíveis sobre os organismos devido às suas propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas<sup>2</sup>. Com base na elevada lipossolubilidade, os organoclorados acumulam-se na gordura animal, inclusive na humana. Sendo assim, permanece na cadeia alimentar

<sup>2</sup> Os efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos são processos identificados como alterações moleculares à nível de DNA, provocados por compostos químicos tóxicos. A carcinogênese ou oncogênese é um processo anormal de diferenciação e proliferação celular, que podem levar o organismo à morte. A mutação resulta da alteração do material genético, podendo resultar em um processo letal para o organismo ou, resultar em uma mutação somática, a qual transmite novas características para as gerações posteriores. O efeito teratogênico compreende o potencial tóxico do composto químico sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo dos organismos. Os embriões e fetos podem apresentar mortalidade precoce ou tardia, além de anomalias estruturais internas e/ou externas (LARINI, 1997).

tornando-se extremamente tóxico ao organismo do topo da cadeia, devido a alta concentração que este apresentará (LARINI, 1997; ZAMBRONE, 1986).

Em razão desta propriedade de persistência na cadeia alimentar, e de sua alta estabilidade à ação da luz, umidade, calor e acidez, muitos compostos organoclorados foram completamente banidos (SHIBAMOTO & BJELDANES, 1996). Apesar da proibição do seu uso, o Brasil ainda permite a venda destes agrotóxicos, que é facilitada pelo desrespeito às Leis e Portarias. Muitas firmas de detetização de ambientes continuam a usar esses produtos em aplicações domiciliares, em razão de sua persistência no ambiente (ZAMBRONE, 1986).

Os organofosforados, carbamatos e piretróides, ao contrário dos organoclorados, quando absorvidos pelos organismos, são metabolizados e excretados rapidamente, sem permitir a ocorrência da acumulação nos tecidos vegetais e animais. Contudo, podem causar intoxicações acidentais graves em mamíferos, sendo os maiores responsáveis pela causa de óbitos (LU, 1996; LARINI, 1997). Os sintomas básicos de envenenamento em insetos e em mamíferos, são distúrbios neurológicos capazes de produzir convulsões, paralisias e morte (ZAMBRONE, 1986).

O sistema nervoso, também característico dos insetos, é responsável pela transmissão de sinais sensoriais por impulsos elétricos através das células nervosas (CREMLYN, 1979). A atividade da enzima acetilcolinesterase, que participa deste processo de transmissão dos estímulos de um ponto do organismo para o outro, pode ser inibida na presença de organofosforados e carbamatos, como descrito anteriormente. A alteração desse processo resulta em anormalidades da transmissão neuromuscular, onde os sinais e sintomas da intoxicação, são proporcionais ao nível da atividade da enzima. Sendo assim, quanto maior for a inibição da enzima, maior a intoxicação do organismo (LARINI, 1997).

Os inseticidas carbamatos, porém, apresentam uma menor toxicidade que os organofosforados, pelo fato da inibição da acetilcolinesterase ser momentânea na presença destes compostos. A ausência do carbamato no organismo, após um curto período de exposição, permite que a atividade da enzima volte ao normal. Enquanto que, após a exposição à organofosforados, a atividade da acetilcolinesterase será prejudicada, necessitando da síntese de uma nova enzima (LARINI, 1997).

## 2.3. UTILIZAÇÃO DOS INSETICIDAS NA REGIÃO DE ESTUDO

### 2.3.1. BREVE HISTÓRICO

A indústria de agrotóxicos do Brasil iniciou sua produção logo após a Segunda Guerra Mundial. As fábricas dedicadas à síntese local de agrotóxicos instalaram-se, principalmente, no Rio de Janeiro, a partir da década de 50 (BULL & HATHAWAY, 1986). Nos anos 70, as atividades de pesquisa e desenvolvimento começaram a tomar impulso com a implantação de um parque industrial de produção de defensivos (ALVES, 1986). Para o desenvolvimento deste setor industrial, foi estabelecida uma política que obrigava os agricultores a adquirir insumos e equipamentos, muitas vezes desnecessários, para o desenvolvimento de suas culturas. Estas novas culturas, a partir dessa política de modernização agrícola, foram, em grande parte, destinadas à exportação (RÜEGG *et al.*, 1991).

O processo de modernização agrícola, contribuiu para o consumo de agrotóxicos na região sul do país, bem como na região da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul. Este processo implicou no aumento da diversificação da produção local dentro da olericultura, a qual ainda permanece como a produção comercial mais importante da região desde os anos 60 (GUIVANT, 1992). Os produtos mais cultivados nesta região são: o tomate, a batata, o feijão, o milho, o repolho, a couve-flor, o pimentão e a abóbora, sendo que o tomate destaca-se pela sua maior produção do Estado de Santa Catarina (MORTARI, 1996).

### 2.3.2. INSETICIDAS UTILIZADOS

As hortaliças são as culturas mais afetadas por pragas e doenças, e por isso, recebem aplicações freqüentes e pesadas de diversos tipos de agrotóxicos. Entre as espécies mais vulneráveis destacam-se as solanáceas<sup>3</sup>, que incluem o tomate, a batata e o pimentão (GUIVANT, 1992). Estas, são cultivadas em grande escala na região de estudo e, por serem vulneráveis, são tratadas à base de

---

<sup>3</sup> Plantas com grande capacidade de retenção de líquidos em seu interior e de seiva muito rica, e por isso, muito susceptíveis às pragas e doenças (RICKLEFS, 1996).

aplicações de agrotóxicos desde a germinação da planta até a colheita do fruto. Os agrotóxicos mais utilizados nestas culturas são os fungicidas e inseticidas carbamatos, organofosforados e piretróides, como demonstra a tabela 1 (MORTARI, 1996).

TABELA 1 – AGROTÓXICOS UTILIZADOS NAS CULTURAS DE TOMATE, BATATA E PIMENTÃO.

Agrotóxico	Classificação Química	Agente Nocivo	Dosagem (kg/ha)
Ausystin	Benzoiluréia	Inseticida	2,00
Cartap	Carbamato	Inseticida	0,80
Decis	Piretróide	Inseticida	0,30
Folimat	Organofosforado	Inseticida	0,60
Tamaron	Organofosforado	Inseticida	0,80
Orthene	Organofosforado	Inseticida	0,80
Cerconil	Ftalonitrila	Fungicida	1,50
Manzate	Carbamato	Fungicida	2,50
Rovral	Carbamato	Fungicida	1,00
Gramoxone	Paraquat	Herbicida	2,00

FONTE: MORTARI (1996)

TABELA 2 – RELAÇÃO DE FUNGICIDAS, HERBICIDAS E INSETICIDAS MAIS TÓXICOS\* UTILIZADOS NA REGIÃO DA BACIA DO RIO CUBATÃO SUL

Fungicidas		Herbicidas		Inseticidas	
Agrotóxico	Grupo Químico	Agrotóxico	Grupo Químico	Agrotóxico	Grupo Químico
Agrimicina	Antibiótico	Totril	Benzonitrila	Carboran	Carbamato
Vanox	Ftalonitrina	Paraquat	Bipiridílios	Carbofuran	Carbamato
Isatalonil	Ftalonitrina	Gramoxone	Bipiridílios	Furadan	Carbamato
Dacostar	Ftalonitrina	Tordon	Fenoxiacético	Bromex	Halogenado
		2.4 D	Fenoxiacético	Folidol	Organofosforado
		DMA	Fenoxiacético	Tamaron	Organofosforado
		Glifosato	Glicina	Tiomet	Organofosforado
				Elsan	Organofosforado
				Paration	Organofosforado
				Granutox	Organofosforado
				Vertimec	Origem biológica abamectin

\* A elevada toxicidade refere-se ao nível de periculosidade do agrotóxico ao homem e ao meio ambiente, a qual está associada com a potencialidade toxicológica do composto ativo. Os agrotóxicos também são classificados segundo ao nível de toxicológico (item 2.5.1)

FONTE: OLIVEIRA (1997)

OLIVEIRA (1997) realizou uma pesquisa de campo para a identificação dos agrotóxicos mais aplicados na bacia hidrográfica do Rio Cubatão Sul. Foram identificadas 85 marcas comerciais de agrotóxicos, distribuídos em inseticidas, fungicidas e herbicidas (tabela 2).

### 2.3.3. LEGISLAÇÃO

O negligenciamento que ocorre nos setores públicos de fiscalização do cumprimento da legislação, além das fracas campanhas informativas e educativas sobre os agrotóxicos, são fatores que contribuem para o uso inadequado destes compostos tóxicos na região (GUIVANT, 1992).

O uso do Carbofuran ou dos agrotóxicos em geral, fica relegado à responsabilidade individual dos agricultores, que acreditam estar preparados para trabalhar com estes compostos químicos. Com isso, o uso torna-se intenso e excessivo na região da bacia hidrográfica, pois os agricultores consideram essa forma de aplicação como uma estratégia de garantir a maximização da produção, de forma a assegurar maior lucratividade. Embora alguns agricultores disponham de algumas informações no procedimento do uso, acreditam que os agrotóxicos são recursos com alto grau de confiabilidade, que garantem a produtividade na lavoura e que podem ser controlados, aplicando-os a sua maneira (GUIVANT, 1992).

Segundo GRANDO (1998), várias intoxicações por agrotóxicos, principalmente os inseticidas inibidores da acetilcolinesterase, têm sido registradas na região da Grande Florianópolis. Além deste estudo, desenvolvido no Centro de Ciências Agrárias da UFSC, outros referem-se à degradação ambiental da região do Rio Cubatão Sul. O Projeto PADCT/CIAMB (Tecnologias Ambientais para o Desenvolvimento Sustentável da Bacia do Rio Cubatão Sul), desenvolvido no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, abrange estudos sobre a mobilidade dos agrotóxicos no solo, a toxicidade dos agrotóxicos para a saúde humana, a qualidade da água fornecida para a população, e outros.

Alguns órgãos governamentais do Estado também participam e auxiliam nos aspectos relacionados à problemática dos agrotóxicos, principalmente no que diz respeito à educação ambiental e à assistência técnica. Entretanto, além dessas atividades não atingirem a todos os agricultores, não conseguem estabelecer uma

possibilidade de difusão e adoção de uma agricultura sustentável. Segundo GUIVANT (1992), existe certa resistência em tentar algo novo, frente a possibilidade de aumentar o risco econômico, ao qual os agricultores da região da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul manifestaram-se extremamente contrários.

Atualmente, os agricultores da região estão satisfeitos com os agrotóxicos em termos de sua eficiência sobre as lavouras e, conseqüentemente, sobre os benefícios econômicos imediatos com o uso irresponsável de agrotóxicos (GUIVANT, 1992). O acesso à compra destes compostos químicos altamente tóxicos é facilitado sem a necessidade da apresentação do receituário agrônomo. MORTARI (1996) afirma que os agricultores da região costumam comprar grandes quantidades de agrotóxicos sem a orientação de profissionais. Os agricultores compram estes produtos sem saber se são apropriados para o seu tipo de lavoura e como devem ser manuseados, já que são extremamente tóxicos. A Lei 7.802/89, em seu Artigo 13, estabelece que: "a venda de agrotóxicos e afins aos usuários será feita através de receituário próprio, prescrito por profissionais legalmente habilitados". Entretanto, são raríssimas as exceções de casas comerciais que obedecem esta Lei, permitindo que estes compostos sejam encontrados facilmente nas mãos de agricultores sem o mínimo de informação possível sobre os riscos à sua saúde (FIER, 1999).

#### 2.3.4. IMPACTOS AMBIENTAIS

Sabe-se que grande parte dos agrotóxicos, quando mal utilizados, podem atingir não só a espécie alvo, mas também destruir os recursos naturais em áreas maiores, contaminar a fauna e a flora da região onde são aplicados (GUIVANT, 1992).

A aplicação de agrotóxicos voláteis, mesmo que efetuada com os cuidados necessários, acabam contaminando a atmosfera. O impacto dos defensivos agrícolas sobre o ar está relacionado com a natureza química e física dos mesmos, do método de aplicação e das condições atmosféricas. Após o processo de pulverização, ocorre a evaporação progressiva das formulações emulsionadas, as quais são transportadas pela atmosfera devido a sua volatilidade, co-destilação, fotodecomposição e vento (GOOLSBY *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 1997). Uma vez na atmosfera, estes compostos podem ser dispersos pelas correntes de ar e voltar a ser



depositados no solo e em cursos de águas, que estão freqüentemente localizados em áreas distantes da origem de aplicação dos compostos (GOOLSBY *et al.*, 1997).

A contaminação dos solos e a sua conseqüente desertificação ocorre, principalmente, devido à falta de controle e monitoramento da produção e da aplicação dos agrotóxicos (BAIRD, 1995). Os solos, segundo PRIMAVESI (1997), são destruídos pela exposição ao sol e à chuva; pela compactação por máquinas pesadas; pela adubação elevada com somente três elementos (nitrogênio, fósforo e potássio), esgotando todos os micronutrientes que seriam indispensáveis para a produção e manutenção da saúde vegetal; e pela esterilização dos solos a partir do uso de herbicidas persistentes no meio ambiente, evitando a germinação de qualquer semente.

As atividades de irrigação ou mesmo as chuvas, propiciam o movimento das substâncias químicas do solo em todos os sentidos, de acordo com o movimento da água. Estudos realizados na Bacia do Rio Cubatão Sul indicam que a direção principal da água é a vertical ao longo do perfil do solo, sendo que este processo denomina-se percolação.) A quantidade dos agrotóxicos carregados ou percolados, dependem da distância percorrida, da taxa de aplicação, da precipitação, da taxa de infiltração, da topografia do terreno e do tipo e quantidade da cobertura vegetal do solo (LEÃO, 1997). Entretanto, segundo BUCHELI *et al.* (1998), a contaminação dos aquíferos subterrâneos é mais severa quando há aplicação direta de agrotóxicos nos cultivos e, mais amena, quando ocorre precipitações e lixiviações que contêm resíduos de agrotóxicos. Durante longos eventos de precipitações, a maior parte dos agrotóxicos atinge os aquíferos, além de contaminar profundidades maiores do solo.

De acordo com RÜEGG *et al.* (1991), existem diversas fontes de poluição das águas por agrotóxicos, as quais pode-se destacar: o lançamento direto de restos de formulações; lavagem dos equipamentos de pulverização em águas de riachos, rios e lagoas; culturas feitas à margem das águas; lavagem e carreamento dos pesticidas pelas chuvas; respingos acidentais de formulações de pesticidas em lagoas, fontes, riachos e rios; aplicação direta de pesticidas nas águas para controlar larvas e mosquitos, caramujos e vegetação aquática excessiva.

A contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos têm sido freqüentemente divulgada através de estudos de monitoramento ambiental e de estudos realizados em estações de tratamento e abastecimento da água para

consumo humano. Recentes pesquisas realizadas por *DRISS et al.* (1993), *CHIRON & BARCELÓ* (1993), *HOGENDOORN et al.* (1996), *JINNO et al.* (1996) e *GRIFFINI et al.* (1999), divulgam a presença de baixas concentrações de diversos agrotóxicos, como carbamatos e organofosforados, em águas tratadas para o consumo humano.

O uso prioritário da água para consumo humano deveria requerer isenção de resíduos, porém isso não mais parece ser possível devido a presença de agrotóxicos, além de metais pesados (*PASCHOAL, 1979*). A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul, apresenta um ponto de captação de água da CASAN para o abastecimento da população da Grande Florianópolis, a qual está comprometida devido ao potencial de contaminação por agrotóxicos, principalmente após períodos de chuvas (*BRANCO, 1986*), *GICQUEL & LEÃO* (1997), a partir de análises de agrotóxicos no Rio Cubatão Sul e afluentes, detectaram concentrações de inseticidas carbamatos, principalmente Carbofuran, que ultrapassou os limites estabelecidos pela lei (anexo 16). A utilização dos recursos hídricos da região para o abastecimento da Grande Florianópolis é um problema que, segundo a própria CASAN, deve ser resolvido pela Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio ambiente (FATMA), pois esta empresa afirma ser apenas usuária, captando e distribuindo o produto tratado sem poder de controle deste mesmo recurso (*MORTARI, 1996*).

O uso excessivo destes produtos na agricultura e pecuária sem a devida atenção para com os intervalos de segurança (período de carência), a contaminação durante o armazenamento, o transporte e o abate, o consumo de leite sem a observação do tempo mínimo recomendado desde a última aplicação, são fatores que ocasionam uma elevada contaminação nos alimentos de origem vegetal e animal (*GRANDO, 1998*). A exposição constante ao agrotóxico e o consumo de alimentos de origem animal e vegetal, contendo doses ou resíduos relativamente baixos destes mesmos agrotóxicos, resulta em possíveis intoxicações, lesões de órgãos e sistemas, esterilidade, teores elevados de resíduos na gordura humana e animal, no leite materno e no sangue, entre outros sintomas (*OLIVEIRA, 1997*). *KAIPPER* (1998) desenvolveu metodologias de extração de pesticidas organofosforados – especialmente os mais utilizados na região – em tomates cultivados na Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul, propiciando o monitoramento da qualidade destes alimentos.

Os programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos *in natura* são importantes na abordagem de risco à saúde humana. Estes programas permitem que medidas de controle possam ser efetuadas antes que a contaminação se torne um grave perigo e cause grandes perdas econômicas (CONACHER & MES, 1993).

Sabe-se que na região da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul não existe fiscalização sobre os agrotóxicos e, portanto, é grande a probabilidade da população estar adquirindo e consumindo produtos ainda com resíduos de agrotóxicos. Cabe à FATMA fiscalizar o uso de agrotóxicos no Estado, porém, de acordo com MORTARI (1996), "esta é uma tarefa que ainda não conseguiu sair do papel".

## 2.4. CARBOFURAN

### 2.4.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O Carbofuran é um inseticida pertencente ao grupo dos carbamatos, os quais são derivados do ácido carbâmico, mais particularmente do ácido N-metilcarbâmico. Os nomes químicos denominados para o Carbofuran são: 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato; 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato; 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol metilcarbamato; ácido metil carbâmico 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil éster; 2,2-dimetil-2,3-dihidro-7-benzofuranil-N-metilcarbamato; 2,2-dimetil-7-coumaranil N-metilcarbamato (THE MERK INDEX, 1976; COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1987; WORTHING & WALKER, 1987).

A fórmula molecular do Carbofuran (figura 2) pode ser representada por  $C_{12}H_{15}NO_3$ , que tem um peso molecular de 221,26. A estrutura molecular proporciona a formação de um composto sólido cristalino sem odor. Outras propriedades físico-químicas definidas pela estrutura molecular são: ponto de fusão a 150-152 °C; pressão de vapor de  $2 \times 10^{-5}$  mmHg a 33 °C; solubilidade (25 °C) de 700 mg/L na água, de 150 g/kg na acetona, 140 k/kg na acetonitrila; instabilidade e

decomposição em meios básicos (THE MERK INDEX, 1976; WORTHING & WALKER, 1987).

A persistência dos agrotóxicos é expressa com o fator de meia-vida, que corresponde ao tempo necessário para que a concentração do ingrediente ativo seja reduzida pela metade, estimando-se, assim, a sua permanência no ambiente sob determinadas condições (GALLO, 1988). De acordo com HOWARD (1989), o tempo de meia-vida do Carbofuran na água é de 8, 2, 1 semanas para pH 6,0, 7,0 e 8,0 respectivamente. Entretanto, o tempo de meia-vida do Carbofuran vai variar de acordo com as condições abióticas, degradando-o ou mantendo-o ativo, como é o caso da acidez do meio. Neste caso, o Carbofuran, ou qualquer outro composto químico, vai apresentar diferentes valores de meia-vida de acordo com o experimento de cada autor, pois este, estabelece diferentes condições abióticas que influenciam diretamente na persistência do composto em estudo.

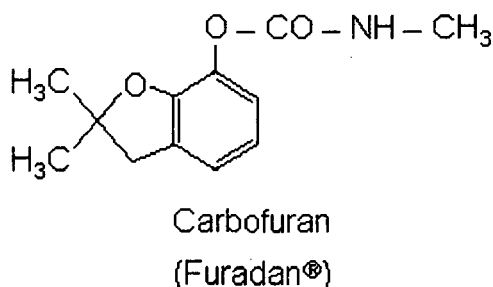


FIGURA 2 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO CARBOFURAN.

FONTE: SHIBAMOTO & BJELDANES (1996)

#### 2.4.2. DISPERSÃO NO MEIO AMBIENTE

O Carbofuran apresenta propriedades inseticidas, acaricidas e nematocidas, as quais foram descobertas em 1965 pelos pesquisadores F. L. McEwen e A. C. Davis (CREMLYN, 1979; WORTHING & WALKER, 1987). Os produtos comerciais, conhecidos como Furadan, Curaterr e Yaltox, estão disponíveis em formulações granuladas, contendo uma concentração de 5% do composto ativo Carbofuran, e em suspensão concentrada, com 350 g/L de Carbofuran (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1987).

A fonte predominante de Carbofuran no meio ambiente é a aplicação do composto como um inseticida, o qual é encontrado normalmente na formulação granulada incorporada ao solo (HOWARD, 1989). A dispersão deste composto no ambiente, vai depender das reações de hidrólise, fotodegradação<sup>4</sup>, volatilização, transformações biológicas, adsorção/dessorção<sup>5</sup> e bioacumulação<sup>6</sup>, que por sua vez, dependem das condições ambientais como a temperatura, o pH, a intensidade luminosa, a pressão, etc (SCHNOOR, 1992).

O Carbofuran, quando presente no solo, é decomposto principalmente pelas reações biológicas (microbiológicas) e hidrólise química, sendo que esta, ocorre mais rapidamente em solos alcalinos do que em solos ácidos ou neutros. LEÃO (1997), numa revisão da literatura, mostrou que o tempo de meia-vida no solo pode variar em: 2-72 dias em estudos de laboratório, 2-86 dias em solos alagados, e 26-110 dias em solos de campo. Os principais metabólitos ou derivados da degradação do Carbofuran encontrados no solo são: 3-hidroxicarbofuran, 3-cetocarbofuran e Carbofuran fenol (figura 3). O movimento do Carbofuran no solo conduzido pela água (lixiviação), é influenciado por vários fatores como: textura do solo, permeabilidade do solo, fluxo hidráulico, adsorção, solubilidade (LEÃO, 1997). Entretanto, em solos com grandes quantidades de matéria orgânica (65% de carbono), a lixiviação pode não ocorrer, devido ao fenômeno de adsorção. A volatilização do Carbofuran do solo não é significativa, apesar de ocorrer a presença deste composto químico na evapotranspiração de plantas contaminadas (EXTOXNET, 1998).

A presença do Carbofuran na água, resulta em hidrólises químicas significativas, desde que esteja em condições alcalinas. A fotólise direta e a fotooxidação podem contribuir para a degradação do Carbofuran no ambiente aquático, e além disso, podem ser fatores extremamente importantes para este processo de degradação se a água apresentar propriedades ácidas. O Carbofuran também pode ser susceptível a degradações microbiológicas, assim como ocorre no

---

<sup>4</sup> A fotodegradação é uma reação química orgânica de oxidação que ocorre devido a exposição à luz ou radiação ultravioleta. Esta reação resulta na quebra do composto orgânico em compostos mais simples (OXFORD DICTIONARY OF CHEMISTRY, 1996).

<sup>5</sup> O fenômeno de adsorção refere-se ao processo pelo qual moléculas de agrotóxicos são transferidas da fase móvel (líquida ou vapor) para a fase estacionária (partículas de solo e da matéria orgânica); dessorção é o processo inverso (LEÃO, 1997).

<sup>6</sup> A bioacumulação é um processo em que substâncias químicas são absorvidas e retidas pelos organismos, diretamente da água ou através da ingestão de alimentos (ZAGATTO, 1999).

solo. A volatilização, a adsorção e a bioconcentração, no entanto, são reações que ocorrem em menor escala no ambiente aquático (EXTOXNET, 1998).

A volatilização do Carbofuran, como especificado anteriormente, é quase insignificante. De acordo com PLIMMER (1992) a adsorção dos agrotóxicos pelo solo bem como pela água, são forças maiores capazes de reduzir o fenômeno de volatilização. Na atmosfera, o Carbofuran, em sua fase vapor, reage com os radicais hidroxil, moléculas de OH livres produzidas fotoquimicamente. Desse modo, a degradação do Carbofuran na atmosfera ocorre pela presença desses radicais e, conseqüentemente, pela fotólise direta (EXTOXNET, 1998).

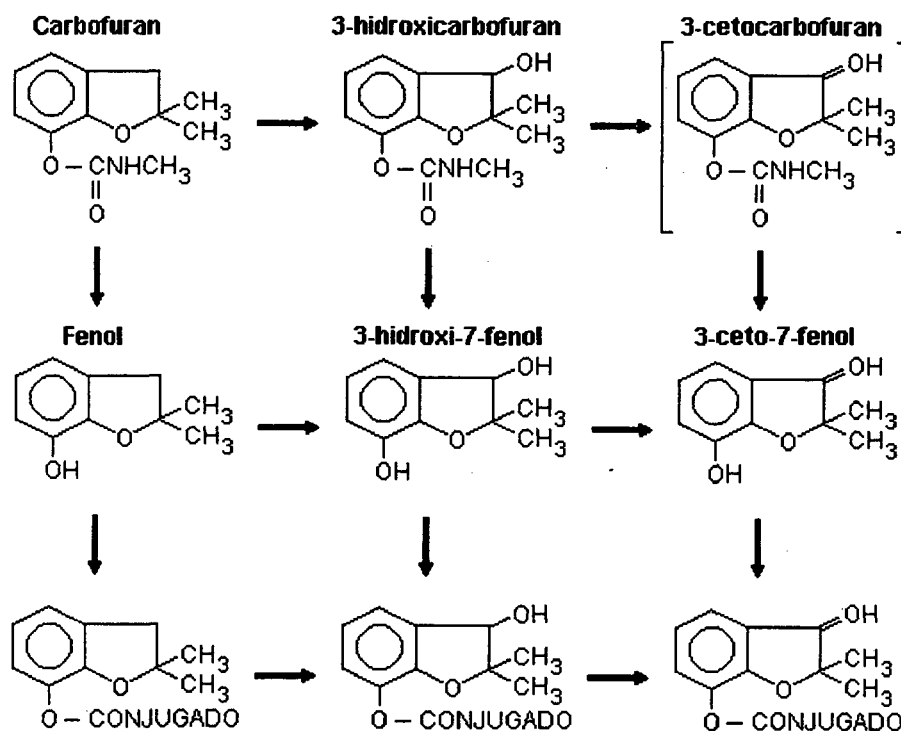


FIGURA 3 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO CARBOFURAN E DE SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS.

FONTE: HAWK & KHAN (1994) *apud* LEÃO (1997)

As reações de transformação microbiológicas são geralmente efetuadas por bactérias e fungos, os quais são capazes de degradar uma grande variedade de agrotóxicos. Estas reações podem ocorrer (1) através da via de co-metabolismo – que se refere à degradação do composto químico pelo microrganismo – sem haver a utilização do agrotóxico como substrato para crescimento; ou (2) metabolicamente,

onde muitos gêneros de bactérias são capazes de utilizar certos agrotóxicos como fonte de carbono, nitrogênio e energia (SCHNOOR, 1992).

A absorção de compostos químicos tóxicos pelos animais ou vegetais pode ser efetuada de modo passivo, sem que haja qualquer alteração na molécula dos agrotóxicos, ou ativo, envolvendo processos enzimáticos e causando alterações nas moléculas. As atividades enzimáticas dos organismos podem transformar a substância inicial em um ou mais metabólitos, ou converter todo o carbono orgânico do agrotóxico em CO<sub>2</sub> (HAWK & KHAN, 1994 *apud* LEÃO, 1997). Além destas, várias outras reações e transformações podem ocorrer com os agrotóxicos como mostra a tabela 3.

TABELA 3 – REAÇÕES IMPORTANTES DE ALGUMAS CLASSES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS QUÍMICOS.

<b>Agrotóxicos</b>	<b>Carbofuran (carbamato)</b>	<b>DDT (organoclorado)</b>	<b>Paration (organofosforado)</b>
Biotransformações	X	X	X
Hidrólises Químicas	X	X	X
Fototransformações			X
Volatilização		X	
Sorção/Bioconcentração			X

Fonte: SCHNOOR, 1992.

A figura 4 representa, esquematicamente, a cinética de bioacumulação dos agrotóxicos em animais. Os peixes podem excretar, de modo passivo, os compostos tóxicos através das vias biliares ou pelo processo de desorção que ocorre nas guelras. Entretanto, compostos orgânicos com propriedades hidrofóbicas, como os organoclorados, tendem a acumular nos tecidos lipídicos dos animais, dificultando, assim, a sua excreção (LARINI, 1997).

O comportamento dos compostos químicos orgânicos no meio ambiente é geralmente monitorado pelas suas tendências relativas de partição na água, no ar e nas fases orgânicas como lipídios e matéria orgânica natural. Os fatores que controlam essas tendências são algumas propriedades físico-químicas dos compostos químicos orgânicos: a solubilidade na água, o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), a pressão de vapor, e o coeficiente de partição ar-água ou lei de Henry (COLE & MACKAY, 1999). O coeficiente de partição é definido como a taxa de

concentração de compostos equilibrados em duas fases imiscíveis, como as fases oleosa e aquosa (LI *et al.*, 1999).

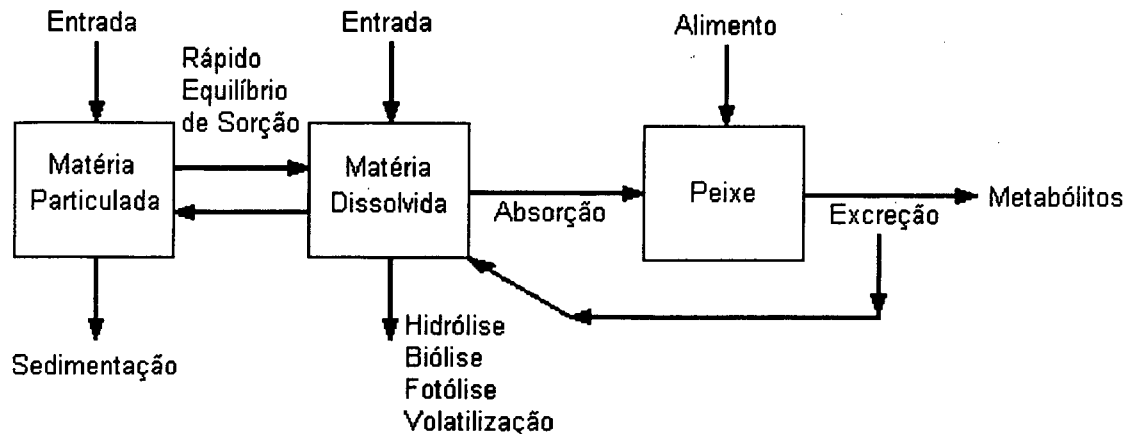


FIGURA 4 – CINÉTICA DE BIOACUMULAÇÃO DO MODELO DE TRANSPORTE DE AGROTÓXICOS.

FONTE: SCHNOOR (1992)

As propriedades físico-químicas são muito utilizadas em modelos matemáticos ambientais para prever ou estimar a dispersão dos compostos químicos no meio ambiente. Sabe-se que os compostos hidrofóbicos presentes no meio ambiente, acumulam-se principalmente nos tecidos lipídicos dos organismos aquáticos através de processos de equilíbrio de partição da água e da absorção dos alimentos através do trato gastrointestinal (RUSSEL *et al.*, 1999). O fator de bioconcentração<sup>7</sup> – FBC (“Bioconcentration factor – BCF”) é um parâmetro importante para análises de compostos hidrofóbicos acumulados em tecidos de animais. Entretanto, a análise experimental do FBC é custosa e por isso, o seu valor é freqüentemente estimado através do  $K_{ow}$  (MEYLAN *et al.*, 1999). Contudo, segundo informações ecológicas da FMC Co. (1999), o valor calculado para o FBC do Carbofuran equivale a 9, sendo um composto com baixa capacidade de bioacumulação.

O  $K_{ow}$  tem sido considerado como uma ferramenta indispensável para as ciências ambientais e áreas afins, pois é um dos parâmetros mais importantes nos estudos do destino de moléculas orgânicas no ambiente (SIJM *et al.*, 1999).

<sup>7</sup> O fator de bioconcentração, referente à bioacumulação de um composto em um organismo, definido pela sigla FBC, é um termo muito utilizado mundialmente. Desse modo, decidiu-se permanecer com esta sigla ao invés de modificar e padronizar o termo utilizando a palavra bioacumulação, criando uma nova sigla FBA (fator de bioacumulação). Os termos bioacumulação e a bioconcentração são sinônimos.



### 2.4.3. EFEITOS ECOLÓGICOS

De acordo com FREEDMAN (1993), os agrotóxicos que apresentam formulações granulares, contêm o composto tóxico na superfície dos grânulos. Após a aplicação desses agrotóxicos no solo, são freqüentes as ocorrências de restos de grânulos sobre a superfície. Estes, tornam-se atrativos para os pássaros que se alimentam de sementes com o tamanho semelhante aos grânulos.

O Carbofuran, quando aplicado no solo, pode contaminar indiretamente os pássaros, ou outros animais de maior porte, através da ingestão de carcaças ou de invertebrados contaminados pelo inseticida carbamato. Outro tipo de exposição letal pode ocorrer quando os locais de aplicação tornam-se alagados – ou pela irrigação ou por precipitações. Nestes casos, a superfície da água pode apresentar elevadas concentrações do inseticida carbamato, e, ao mesmo tempo, servir como habitat para várias espécies de animais. O risco de exposição tóxica para estes animais torna-se bastante elevado se a água for ácida, pois em pH 9,5, metade da quantidade inicial do Carbofuran é decomposta em apenas 0,2 dias, enquanto que em pH 5,2, a decomposição leva 1700 dias (FREEDMAN, 1993).

A presença de agrotóxicos nos rios em quantidades elevadas, pode resultar numa mortandade grave de organismos aquáticos, principalmente dos peixes que se alimentam do fundo dos rios. Estes peixes, podem apresentar teores de resíduos de agrotóxicos maiores do que os peixes que se alimentam em águas superficiais, devido à grande afinidade que estes compostos apresentam com o solo e a matéria orgânica do fundo (RÜEGG *et al.*, 1991). Entretanto, segundo a o Carbofuran não apresenta grande afinidade com o solo e o material em suspensão EXTOWNET (1998). Contudo, os grânulos do inseticida (das formulações granulares) podem ser encontrados no fundo, sendo um atrativo alimentar para os peixes bentônicos.

De acordo com SCHNOOR (1996), o dano ecológico de uma substância tóxica depende de sua interação com o organismo, pois quando introduzida no sistema aquático, por exemplo, pode ser eliminada da água por processos químicos, físicos ou biológicos (figura 5).

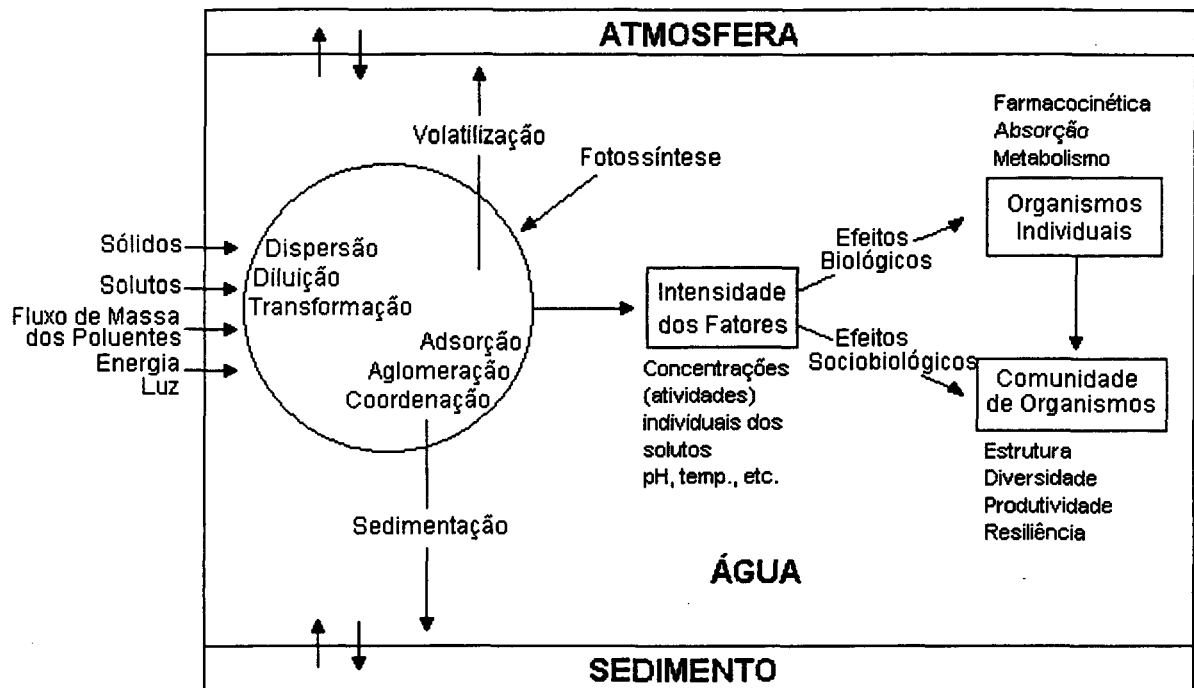


FIGURA 5 – TRANSFERÊNCIA E TRANSFORMAÇÃO DE POLUENTES EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS ATRAVÉS DE PROCESSOS QUÍMICOS, FÍSICOS E BIOLÓGICOS.

FONTES: SCHNOOR (1996)

No ambiente aquático, a quantidade de substância tóxica absorvida pelo organismo é determinada pela concentração desta na água (diluição e dispersão no meio aquático), pela concentração no alimento (carcaças contaminadas), pela taxa de respiração (entrada direta da substância pelas brânquias) e pela quantidade de alimento contaminado ingerido (CONOLLY & THOMANN, 1992). As reações químicas, físicas e biológicas variam de acordo com a estrutura e a atividade química específica que a substância em questão apresenta, além de outros fatores que podem influenciar, como a volatilização, aeração/turbulência, sedimentação, a presença de outras substâncias, etc (figura 6).

O conhecimento dos mecanismos básicos dos agentes tóxicos sobre o metabolismo dos organismos (farmacocinética, absorção, conversão, degradação e separação, distúrbio dos mecanismos de regulação) é essencial para a compreensão das respostas biológicas. Com isso, estudos de toxicologia (item 2.5.1) são realizados em experimentos de laboratório, extrapolando os possíveis efeitos sobre os organismos no ecossistema (SCHNOOR, 1996).

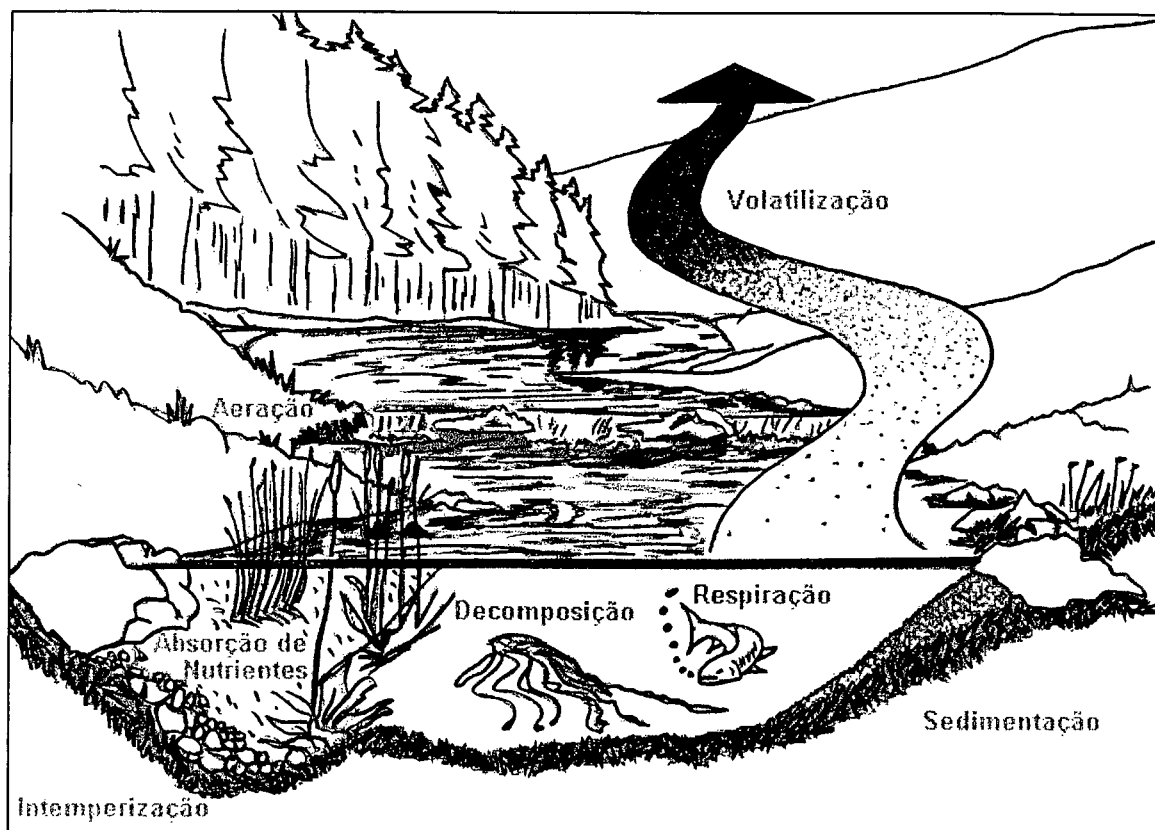


FIGURA 6 – PROCESSOS NATURAIS QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DO RIO E O COMPORTAMENTO DOS POLUENTES NO AMBIENTE AQUÁTICO.

FONTE: REEVE (1994)

#### 2.4.4. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Assim como outros compostos carbamatos, o efeito inibidor do Carbofuran sobre a acetilcolinesterase é reversível e de curta duração. Segundo LARINI (1997), o mecanismo de ação do Carbofuran ou de outro composto carbamato sobre a enzima, é explicado pela sua estrutura química muito semelhante à acetilcolina (figura 7).

A acetilcolina é uma substância neurotransmissora liberada no interior das junções das células nervosas, provocando a propagação do impulso nervoso de uma célula para outra. Para que ocorra a transmissão de um novo impulso nervoso, a acetilcolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase existente na junção. Esta

catálise enzimática ocorre devido a especificidade estrutural do substrato de ligação da enzima que a acetilcolina apresenta (LEHNINGER, 1991).

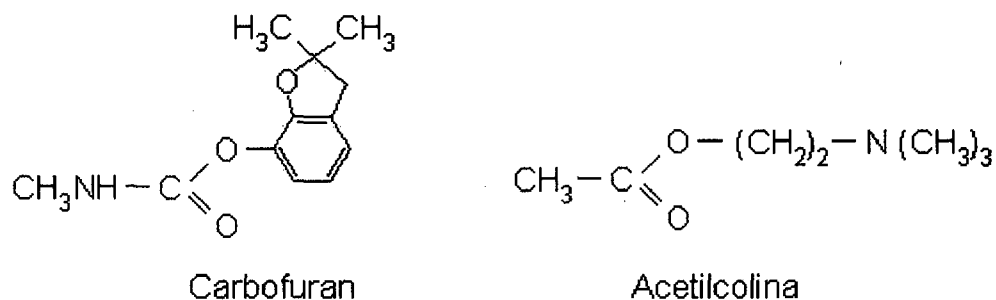


FIGURA 7 – SEMELHANÇA ESTRUTURAL ENTRE OS GRUPOS METILCARBAMIL, DO CARBOFURAN, E ACETIL, DA ACETILCOLINA (DESTACADOS EM VERMELHO)

FONTE: LARINI (1997)

A catálise enzimática pode ser bloqueada pelo Carbofuran, e outros carbamatos ou organofosforados, através de sua capacidade de se ligar com a acetilcolinesterase. A formação do complexo acetilcolinesterase/Carbofuran é proporcionada pela semelhança estrutural que o substrato de ligação do Carbofuran apresenta, como mostrado na figura 7. Sendo assim, o Carbofuran torna-se um inibidor competitivo, pois, de acordo com LEHNINGER (1991), há uma concorrência com o substrato (a acetilcolina) pelo sítio ativo da enzima devido às semelhanças moleculares do substrato de ligação. O Carbofuran liga-se reversivelmente à enzima, inibindo a ação desta sobre a acetilcolina. A inibição da acetilcolinesterase determina o acúmulo de acetilcolina resultando numa transmissão contínua e descoordenada de impulsos nervosos, responsáveis pelo aparecimento de uma sintomatologia grave, como convulsões e morte (CREMLYN, 1979; LARINI, 1997). Entretanto, o quadro sintomatológico varia em função da magnitude de exposição ao composto tóxico (LARINI, 1997).

#### 2.4.5. ASPECTOS SOBRE A INTOXICAÇÃO

As intoxicações por carbamatos representam sério risco à saúde humana como também dos animais. Os sinais e sintomas mais comumente observados em intoxicações elevadas acidentais humanas por carbamatos, estão resumidos na

tabela 4. Existem também outros efeitos bioquímicos e farmacológicos que podem ocorrer como: decréscimo na síntese cerebral de fosfolipídios, alterações dos níveis de serotonina no sangue e decréscimo da atividade da glândula digestiva (LARINI, 1997).

TABELA 4 – SINAIS E SINTOMAS NAS INTOXICAÇÕES POR INSETICIDAS CARBAMATOS

Local	Sinais e Sintomas	
	Precoces	Tardios
Sistema Nervoso Central	Tensão; ansiedade; inquietude.	Alterações do sono com sonhos e pesadelos excessivos; dificuldade de concentração; comprometimento de memória; etc.
	Cefaléia; tonteira e vertigens.	Convulsões; tremores; torpor e coma; soluços e manifestações como: tremores involuntários e incoordenação dos movimentos; etc.
Sistema Nervoso Autônomo	Aumento do ritmo respiratório; tosse.	Secreção bronquiolar excessiva; edema pulmonar; dispnéia; opressão torácica; etc.
	Perda de apetite.	Náuseas; vômitos; dores abdominais; diarreia; defecação involuntária; diurese freqüente e involuntária.
	Pulso diminuído.	Bloqueio auriculoventricular; parada cardíaca; etc.
	Visão enfraquecida.	Pupilas sem reação.
	Lacrimejamento; aumento das secreções salivar e nasal.	Transpiração excessiva
Sistema Somático	Fadiga; fraqueza muscular; contrações involuntárias.	Cãimbras; enfraquecimento muscular generalizado; etc.

FONTE: LARINI (1997)

Os agrotóxicos entram no corpo humano geralmente através do trato respiratório e pela absorção através da pele. Entretanto, pequenas quantidades podem entrar no trato gastrointestinal através das mãos e utensílios contaminados. As intoxicações mais graves ocorrem pelas vias digestiva, respiratória e mucosas (SHIBAMOTO & BJELDANES, 1996).

Os efeitos das intoxicações pelo Carbofuran, ou por outros carbamatos, representam sério risco à saúde humana devido ao déficit ventilatório associado ao edema agudo de pulmão. Apesar de não se acumularem nos tecidos dos animais, podem determinar intoxicações graves ou letais pelas vias digestivas, respiratória e mucosas e, intoxicações amenas, pela via dérmica (SHIBAMOTO & BJELDANES, 1996).

As intoxicações mais graves resultam da exposição às elevadas doses em períodos prolongados (LU, 1996).

A completa recuperação de uma intoxicação aguda pode ocorrer se a exposição da vítima ao Carbofuran for rápida. Os carbamatos podem ser excretados rapidamente pelo metabolismo, principalmente pelas vias urinárias e, por isso, não bioacumulam nos organismos. Nestes casos, a vítima consegue recuperar o nível normal de acetilcolinesterase no metabolismo em menos de 24 horas (EXTOXNET, 1998).

A exposição prolongada ao Carbofuran pode resultar em efeitos mais graves. De acordo com o Application Manual Carbamates (1999), o consumo de diário Carbofuran em níveis acima de 40 ppb (partes por bilhão ou  $\mu\text{g/L}$ ) em água potável, resulta em graves efeitos à saúde humana, além da inibição da enzima acetilcolinesterase. Recentes estudos têm demonstrado danos no aparelho reprodutivo de animais-teste, reduzindo as chances de fertilização e sobrevivência dos fetos (EXTOXNET, 1998). Isso pode ser explicado pela capacidade do Carbofuran e de seus metabólitos atravessarem a barreira placentária, causando efeitos teratogênicos e produzindo sérios efeitos sobre a unidade placentária-feto-maternal (GUPTA, 1994).

Efeitos mutagênicos não foram detectados em animais ou bactérias, entretanto, foram encontradas alterações genéticas em algas (EXTOXNET, 1998). Estudos realizados por BROWN *et al.* (1996) mostraram que o Carbofuran não possui efeitos deletérios em populações de bactérias de ambientes estuarinos, não havendo, também, nenhuma evidência de bioacumulação.

Com relação aos efeitos carcinogênicos, dados suficientes realizados em estudos com animais, indicam que o Carbofuran não representa riscos de câncer para os humanos (EXTOXNET, 1998).

Para o controle dos agentes químicos introduzidos nos ecossistemas, especialmente os aquáticos, é necessário o uso de técnicas que possam prever, com boa exatidão, o impacto desses agentes sobre os animais, inclusive no homem. Dessa forma, os testes de toxicidade são considerados uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois estes testes fundamentam-se na utilização de organismos vivos que são diretamente afetados pelos desequilíbrios que eventualmente ocorram nos ecossistemas aquáticos onde vivem (ZAGATTO, 1999).

## 2.5. METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE AGROTÓXICOS

### 2.5.1. TESTES DE TOXICIDADE

O aumento da contaminação ambiental e das intoxicações humanas causadas por compostos químicos tóxicos, proporcionou uma maior preocupação em se fazer estudos relacionados à degradação ambiental e à saúde humana, os quais envolvem extensos testes de toxicidade em uma grande quantidade de espécies (FENTEM & BALLS, 1994). Os testes de toxicidade permitem verificar se o uso e a disposição das substâncias químicas causam efeitos diretos ou indiretos sobre os ecossistemas. Além disso, avaliam o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos, proporcionando um conhecimento profundo do potencial poluidor dos vários agentes químicos introduzidos no meio ambiente (ZAGATTO, 1999).

Dentre todos os ecossistemas, os aquáticos têm merecido maiores estudos, pois, além de serem os mais suscetíveis à contaminação, recebem diretamente agentes químicos provenientes de despejos industriais e domésticos e, indiretamente, por águas de chuva ou aqueles carreados pelo escoamento superficial dos solos (ZAGATTO, 1999). Por esta razão, RÜEGG *et al.* (1991) afirma que as melhores indicações da poluição das águas por compostos químicos como os agrotóxicos, são dadas pelas análises dos resíduos em peixes.

Atualmente, as análises de monitoramento ambiental têm utilizado testes modernos para detectar, indiretamente, a presença de compostos químicos tóxicos. Dentre estes testes, destacam-se os biomarcadores, que, segundo WALKER *et al.* (1996), são definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente. A análise dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos de organismos expostos aos contaminantes ambientais, permite a detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas; a identificação de espécies ou populações em risco de contaminação; a magnitude da contaminação e o que é fundamental; a determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos compostos químicos tóxicos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Apesar dos testes com biomarcadores ambientais apresentarem respostas bioquímicas imediatas sobre os mecanismos de ação dos compostos químicos, ainda utilizam-se, em grande escala, testes de toxicidade que simulam a situação ambiental na qual determinados organismos são expostos. Estes são os testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes de toxicidade aguda simulam a situação ambiental na qual o organismo é exposto, durante curto período de tempo, à concentrações elevadas de um agente tóxico. Os testes de toxicidade crônica distinguem-se do anterior porque expõem o organismo por longos períodos de tempo, além de utilizar baixas concentrações do agente tóxico. Com base nestes testes, são avaliados os efeitos de: letalidade; imobilidade; inibição do crescimento de uma população; alteração de comportamento; inibição da reprodução; redução do crescimento; inibição da fertilização (inviabilidade dos gametas); e inibição do desenvolvimento embrionário (ZAGATTO, 1999).

Os efeitos causados pelos testes de toxicologia aguda e crônica nos organismos-teste são deletérios em ambos os casos. Porém, o efeito agudo manifesta-se rápida e severamente após curto período de exposição (0 – 96 horas); enquanto que o efeito crônico, normalmente manifesta-se após dias ou anos, dependendo do ciclo vital da espécie estudada. São observadas as incidências letais de 50% dos organismos-teste em função da exposição a uma determinada concentração do agente tóxico. Esta concentração denomina-se Concentração Letal Mediana,  $CL_{50}$  ou Dose Letal Mediana,  $DL_{50}$ . As concentrações que causam diferentes efeitos, como imobilidade, em 50% dos organismos-teste, são denominadas Concentrações Efetivas Medianas,  $CE_{50}$ . Existem outras terminologias utilizadas para definir o limite de tolerância mediano ( $LT_{50}$ ), a concentração letal inicial mediana ( $CLI_{50}$ ), a concentração de efeito observado (CEO), e etc. (BACCI, 1994; ZAGATTO, 1999).

FRELLO (1998) desenvolveu a metodologia do teste de toxicidade aguda com o Carbofuran nos organismos-teste: *Poecilia reticulata* (peixe) e *Daphnia magna* (microcrustáceo). Este método consistiu no estabelecimento das concentrações do agente tóxico Carbofuran para a obtenção da Concentração Letal Média ( $CL_{50}$ ) para os diferentes organismos-teste. Como estabelece a Norma da CETESB (1987), a autora realizou testes preliminares para a avaliação da sensibilidade dos organismos com a substância dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), além de efetuar o monitoramento das condições do pH, condutividade, temperatura e dureza da água do experimento.



As faixas de concentrações definidas para o teste de toxicidade aguda em ambos os organismos, estão demonstradas na tabela 5.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES DO CARBOFURAN UTILIZADAS POR FRELLO (1998) NOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *POECILIA RETICULATA* E *DAPHNIA MAGNA*.

	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Daphnia magna</i>
Períodos de Exposição (horas)	3; 6; 24; 48	24; 48
Número de indivíduos por recipiente	10	5
Volume de água (mL)	1000	25
Concentrações utilizadas $\mu\text{g/L}$	70; 100; 150; 200; 300	3,5; 5,8; 9,7; 16,2; 27,0; 45,0
Número de testes realizados	6	9

Além disso, FRELLO (1998) estabeleceu em seus experimentos de toxicologia aguda, diferentes períodos de exposição dos organismos teste e observou a variação da  $CL_{50}$ . Foi estabelecido que o valor da concentração letal média é inversamente proporcional ao tempo em que o organismo fica exposto. Este mesmo autor observou que a concentração máxima que não causa nenhum efeito de letalidade está abaixo de  $100 \mu\text{g/L}$ , enquanto que os efeitos de letalidade próximos a 100% estão na faixa de concentração entre 200 e  $300 \mu\text{g/L}$  em 48 horas.

TABELA 6 – CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS AGROTÓXICOS.

Classificação Toxicológica	DL <sub>50</sub> para ratos (mg/kg)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
I – Altamente perigosos	5-50	20-200	10-100	40-400
II – Moderadamente perigosos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III – Ligeiramente perigosos	500-2000	2000-6000	1000-4000	4000-12000
IV – Praticamente sem perigo	>2000	>6000	>4000	>12000

FONTE: NORMAS E MANUAIS TÉCNICOS (1982)

Os testes de toxicidade são utilizados no procedimento de avaliação de risco de agentes químicos através da mensuração dos efeitos nos organismos vivos expostos a concentrações conhecidas e da estimação da concentração da substância no ambiente. Os resultados obtidos destas duas etapas permitem a decisão, tecnicamente justificável, que servirá de base para a aprovação, proibição

ou restrição de uso de um agrotóxico, de acordo com o risco determinado (MORTARI, 1996). Segundo as Normas e Manuais Técnicos II do Ministério da Saúde (1982), os agrotóxicos podem também ser classificados em quatro categorias, de acordo com o perigo que oferecem. A categoria varia conforme a concentração do ingrediente ativo na formulação e com o estado físico, sólido ou líquido. Os critérios para a classificação estão resumidos na tabela 6.

### 2.5.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBAMATOS

Devido a sua rápida degradação e baixa acumulação na cadeia trófica, os carbamatos são amplamente utilizados em uma variedade de cultivos, principalmente os hortifrutigranjeiros. Entretanto, o seu uso em grande escala resulta na contaminação do meio ambiente, deixando resíduos não apenas nas culturas, mas também no solo e nas fontes hídricas mais próximas, como os rios, lagos e águas subterrâneas. Desse modo, o monitoramento dos resíduos nas áreas de agricultura, bem como nos produtos alimentares cultivados, tornou-se uma prioridade nas pesquisas e análises de agrotóxicos (MARTINEZ *et al.*, 1992).

A cromatografia gasosa (CG) tem sido a técnica mais utilizada para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, solos, águas superficiais e subterrâneas (MARTINEZ *et al.*, 1992). Entretanto, a temperatura da coluna cromatográfica de fase gasosa pode chegar até 200°C, propiciando modificações das estruturas químicas de alguns agrotóxicos carbamatos (KRAUSE, 1988). Segundo BROWN *et al.* (1996), “a cromatografia gasosa é comumente empregada para a determinação de agrotóxicos. Infelizmente, apenas alguns carbamatos podem ser analisados diretamente, pois, na sua maioria, são termolábeis<sup>8</sup>, ocorrendo a decomposição de seus fenóis correspondentes”. Como visto anteriormente, o Carbofuran apresenta seu ponto de fusão a 150-152 °C, sendo inadequado para a análise por CG.

A metodologia de análise para resíduos de agrotóxicos não voláteis ou termolábeis, como os carbamatos, foi desenvolvida na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O método de detecção mais utilizado pela CLAE é a absorção

---

<sup>8</sup> Compostos que apresentam elevada instabilidade em temperaturas elevadas (OXFORD Dictionary of Chemistry, 1996).

ultravioleta (UV), a qual baseia-se na absorvância da luz pela amostra (GUIMARÃES & COLLINS, 1993). As amostras que não apresentam absorção ultravioleta suficiente para a detecção, são submetidas à derivatização (REEVE, 1994). Esta técnica consiste na hidrólise das moléculas da amostra e na transformação destas moléculas em compostos fluorescentes. Neste caso, a espectroscopia de fluorescência é utilizada como um método de detecção (detecção de compostos fluorescentes) muito sensível, capaz de detectar quantidades em nível de picograma ( $10^{-12}$  g) (GUIMARÃES & COLLINS, 1993).

### 2.5.3. SISTEMA OPERACIONAL CLAE-UV

A CLAE (figura 8) é um método físico-químico de separação de compostos amostrais, que resume-se basicamente nas seguintes partes:

- a) Fase móvel: responsável pelo deslocamento da amostra em todo o sistema com a utilização de componentes líquidos (geralmente água, metanol ou acetonitrila). Estas substâncias líquidas podem ser misturadas de forma isocrática, em partes iguais, ou com gradiente, variando-se o volume dos solventes;
- b) Bomba quaternária: permite a melhor separação das substâncias analisadas devido à precisão do fluxo e do gradiente dos solventes, previamente estabelecidos;
- c) Sistema de injeção: proporciona a medida exata e precisa do volume da amostra que será analisada;
- d) Coluna analítica: separa as substâncias para posterior detecção e quantificação;
- e) Detector UV: como o próprio nome diz, proporciona a detecção da amostra e permite escolher o comprimento de onda para obter a melhor detecção;
- f) Integrador: é o responsável pela integração das áreas dos picos cromatográficos, permitindo a quantificação do resíduo analisado. Atualmente, são utilizados computadores específicos para cada tipo de sistema.

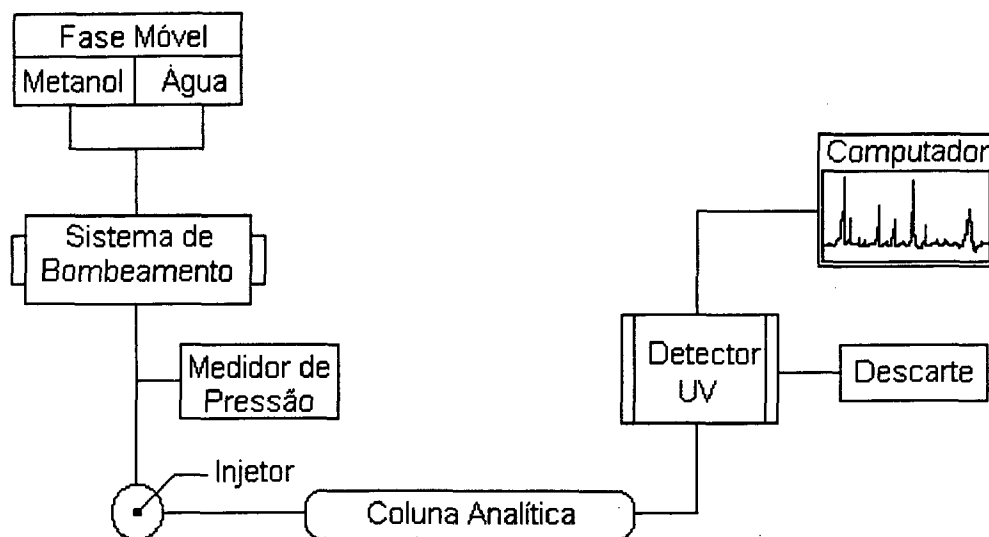


FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DA CLAE COM DETECTOR UV

#### 2.5.4. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CLAE-UV

##### 2.5.4.1. EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS

As análises de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais como alimentos, solo e água podem ser avaliadas utilizando técnicas de CLAE com detector UV. Entretanto, por ser uma técnica muito sensível, exige a ausência de interferentes, os quais são encontrados nas substâncias das plantas, animais, solos e água (MARTINEZ *et al.*, 1992).

Para a obtenção de bons resultados, cada passo no procedimento analítico vai depender do tipo de amostra a ser analisada, pois os procedimentos envolvidos, como a extração, a eliminação de interferentes, a separação e a quantificação, são diferentes e específicos para cada tipo de substrato (MUKHERJEE & GOPAL, 1996). Estes procedimentos específicos poderão consumir muitas horas de trabalho no laboratório, entretanto, proporcionarão uma preparação correta para a análise em CLAE-UV (MARTINEZ *et al.*, 1992).

BROWN *et al.* (1996) estabeleceu técnicas de extração de agrotóxicos em tecidos de animais e determinou as melhores condições para esta atividade. De acordo com este mesmo autor, os tecidos devem ser cortados em pedaços muito pequenos, a fim de proporcionar uma grande superfície de contato ao solvente de

extração utilizado. O processo de extração continua com a maceração ou agitação do tecido utilizando um homogeneizador ou um banho ultra-sônico. Também pode-se utilizar, para essa etapa, outras técnicas de extração como: Soxlet e fluido supercrítico ("SFE - supercritical fluid extraction").

A escolha do método e do solvente para a extração vai depender do tipo de tecido e da quantidade de compostos químicos tóxicos a serem extraídos. Os solventes miscíveis à água, como a acetona, extraem praticamente todos os agrotóxicos, mas também muitos co-extrativos (interferentes) que estão presentes nos tecidos. O solvente hexano pode oferecer uma extração muito mais "limpa", sem interferentes. Entretanto, pode não extrair todos os compostos necessários. Este solvente imiscível, pode ser substituído pelo dietil-éter, o qual apresenta polaridade eficiente para extração de uma grande quantidade de pesticidas sem muitos co-extrativos. Além disso, sua volatilidade permite a concentração dos extratos sem grandes perdas dos compostos tóxicos a serem avaliados, contudo, é altamente inflamável e pode provocar misturas explosivas na atmosfera. O dietil-éter e o diclorometano são solventes convenientes para a extração de organofosforados e carbamatos de materiais biológicos. Para amostras biológicas extraídas com solventes e que ainda apresentam água ou fluidos biológicos, são utilizados agentes secantes como o sulfato de sódio anidro para eliminar estes fluidos (BROWN *et al.*, 1996). Outros solventes orgânicos utilizados para a extração de carbamatos são: acetato de etila, metanol, acetonitrila, ciclohexano, *n*-hexano, etanol ou a mistura de dois solventes (BIZIUK *et al.*, 1996).

#### 2.5.4.2. PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras que apresentam material em suspensão, são geralmente filtradas em filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro, permitindo a eliminação total dos interferentes macroscópicos.

TORRES *et al.* (1996), em suas pesquisas bibliográficas, observou que os métodos oficiais de análises de resíduos em frutas e vegetais, promovidos pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais ("AOAC - Association of Official Analytical Chemists"), determinam a extração de agrotóxicos com o solvente acetona. Este método também estabelece a eliminação de interferentes com a

utilização de outro solvente orgânico ou com a utilização de uma minicoluna de sílica ou florissil.

Outras alternativas para a eliminação dos interferentes de tecidos contaminados por agrotóxicos (organofosforados e carbamatos), seriam: a utilização da cromatografia por permeação em gel (“GPC – Gel Permeation Chromatography”); técnica de co-destilação a vapor; cromatografia por exclusão; ou a completa desidratação da amostra seguida de sua redissolução em um solvente, e a passagem deste em uma minicoluna descartável de sílica (BROWN *et al.*, 1996).

As minicolunas de sílica ou florissil, são colunas capazes de reter resíduos orgânicos, como os inseticidas carbamatos e alguns co-extrativos (BENEY *et al.*, 1996). Com isso, há uma concentração de compostos-traços e a eliminação de interferentes inorgânicos de amostras ambientais. Desse modo, as amostras de água, de solo ou de tecidos animais e vegetais, são extraídas diretamente com a utilização de uma minicoluna especialmente desenvolvida para amostras contaminadas com agrotóxicos (HU *et al.*, 1999). Esta técnica de utilização de minicolunas, também conhecida como extração em fase sólida (“Solid Phase Extraction – SPE”) é aplicada freqüentemente em amostras com muita quantidade de interferentes inorgânicos (WAN & WONG, 1996). Em termos mais simples, o tratamento de amostras ambientais utilizando a minicoluna de octadecil-C18 permite a retenção de analitos orgânicos que, posteriormente, são eluídos com um solvente orgânico (BENEY *et al.*, 1996).

As técnicas de cromatografias utilizadas envolvem a injeção de apenas poucos microlitros da solução, e portanto, é necessário que a amostra seja concentrada para possibilitar a detecção de possíveis compostos tóxicos presentes (REEVE, 1994). Por isso, as minicolunas C-18 são comumente utilizadas para a concentração de analitos orgânicos, que requerem volumes menores para uma recuperação ótima destes analitos na amostra (BARCELÓ *et al.*, 1993).

O solvente utilizado para a eluição ou dessorção dos carbamatos da minicoluna deve apresentar uma solubilidade eficiente, capaz de remover grande parte dos compostos orgânicos da C-18. BAILEY *et al.* (1996) determinou a eficiência de extração do Carbofuran em minicolunas C-18 com o solvente orgânico metanol (eficiência de eluição). Os resultados mostraram que a utilização de apenas 6 mL de metanol puro (MeOH) é suficiente para a eluição de 95% do Carbofuran retido na minicoluna (90% de todo o Carbofuran foi eluído nos primeiros 2 mL e 5% nos 4 mL

seguintes). Foram testadas diferentes frações de MeOH misturado em água, e o resultado demonstrou uma recuperação de 97% de todo o Carbofuran na C-18, onde: 2% foi recuperado na fração de 25% MeOH; 30% na fração de 50% MeOH; 60% na fração de 70% MeOH; e 5% na fração de 75% MeOH.

#### 2.5.4.3. DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS

Segundo MUKHERJEE & GOPAL (1996), um procedimento analítico quantitativo utilizando técnica de cromatografia é válido somente se: (1) a extração da amostra for completa; (2) a retirada dos interferentes da amostra for eficiente e se a recuperação for quantitativa; (3) a resolução cromatográfica para análise for adequada; (4) a detecção dos inseticidas e a medida da resposta do detector for sensível, específica e reproduzível; e (5) a comparação com padrões de calibração desconhecidos for reproduzível. KAIPPER (1998) afirma que o método para a determinação de agrotóxicos, em geral, deve ser realizado por estudos de recuperação, onde são contaminadas amostras livres destes compostos tóxicos por soluções padrão com concentrações conhecidas. Todo o procedimento normal de análise é, então, realizado e, a seguir, quantifica-se os respectivos padrões. Desta forma, testa-se a eficiência do método, incluindo os solventes e adsorventes empregados no mesmo.

As soluções padrões utilizadas para a quantificação dos agrotóxicos em estudo, são obtidas através de compostos puros produzidos em laboratórios e indústrias químicas. Para as análises, são utilizados somente os agrotóxicos em questão, e quando são avaliados muitos compostos ao mesmo tempo, as soluções padrão são preparadas em forma de multipadrão. HU *et al.* (1999), em seu estudo com métodos analíticos de multirresíduos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em águas para consumo, selecionou 31 agrotóxicos termolábeis e com baixa polaridade. A solução padrão de cada composto puro foi preparada na concentração de 1000 mg/L. A partir desta, o autor preparou a solução multipadrão com a adição de uma pequena alíquota de cada composto em um volume de água destilada.

O detector seletivo mais apropriado para a análise de resíduos de carbamatos em CLAE, é o detector de fluorescência. Para tanto, é necessário o

procedimento da técnica de derivatização pós-coluna, a qual realiza a hidrólise dos compostos e a formação de um composto fluorescente para a detecção. Entretanto, vários estudos a partir da detecção de carbamatos com UV foram realizados. Estes, de acordo com DALLAGO *et al.* (1997), apesar de ter uma menor sensibilidade se comparado ao detector de fluorescência, apresentam rápida análise dos pesticidas estudados, sem necessitar da derivatização destes.

Segundo CHIRON & BARCELÓ (1993), muitos compostos carbamatos, incluindo o Carbofuran, apresentam o UV máximo abaixo de 220 nm. TORRES *et al.* (1996) também afirmam que os carbamatos, apesar de poderem ser determinados utilizando o detector UV, apresentam baixa seletividade e sensibilidade devido ao comprimento de onda muito baixo (190 nm) em que estes são absorvidos. Por isso, o método mais válido para a análise de resíduos de carbamatos ainda permanece sendo com a coluna de derivatização e a detecção por fluorescência, como estabelecido pela U.S. EPA (1989; 1994; 1996).

#### 2.5.4.4. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

De acordo com GICQUEL (1998), para a determinação de carbamatos em CLAE, emprega-se uma coluna analítica composta por partículas de octadecil-C18 em seu interior. Existem diversos tipos de colunas empregadas para a análise de outros tipos de compostos com diferentes propriedades, as quais definem os processos de separação: física, química ou mecânica. Dentre estes, identificam-se os mecanismos de: adsorção (Cromatografia Sólido-Líquido); partição (Cromatografia Líquido-Líquido); troca de íons (Cromatografia por troca iônica); exclusão estérica (Cromatografia por "Permeação em Gel"); e bioafinidade (Cromatografia de Bioafinidade).

As características da fase móvel, como o gradiente de eluição e o fluxo do eluente, têm sido estabelecidas de diversas formas, de acordo com os objetivos de cada trabalho científico proposto pelos autores (tabela 7).

As diferentes condições estabelecidas na fase móvel, como a presença de um gradiente de eluição e o bombeamento de um fluxo determinado, proporcionam uma análise rápida e eficiente do composto estudado. Estas condições são responsáveis por alterar a composição ou a polaridade da fase móvel,



resultando em diferentes tempos de retenção do composto. Uma vez encontrada a melhor condição do gradiente e do fluxo de eluição, aplica-se na análise. As condições de análises também podem ser efetuadas sem um gradiente de eluição, utilizando-se a fase móvel de modo isocrático, ou seja, de composição igual durante toda a análise.

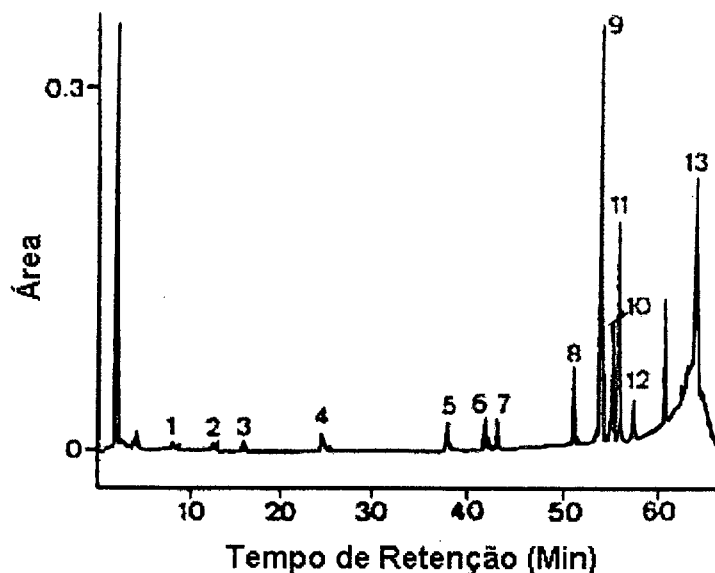
TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DE FASES MÓVEIS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DO COMPOSTO CARBOFURAN EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.

Composição da Fase Móvel	Gradiente de Eluição	Fluxo (ml/min)	Referências Bibliográficas
	Início → Fim		
ACN : água	12:82; 70:30	1,5	KRAUSE, 1988
ACN : água	35 :65	0,8	DE KOK <i>et al.</i> , 1990
ACN : água	20:80; 85:15	1,0	CORCIA & MARCHETTI, 1992
ACN : água	12:88; 57:43	1,0	CORCIA & MARCHETTI, 1992
ACN + MeOH + água : acetoneitrila + água	20:80; 30:70; 65:35	2,0; 0,8	CHIRON & BARCELÓ, 1993
MeOH : água	70:30; 100:0	1,0	BAILEY <i>et al.</i> , 1996
MeOH : água	70:30; 100:0	1,0	BROWN <i>et al.</i> , 1996
ACN : água	3:97; 27:73; 37:63; 100:0	1,0	BROWN <i>et al.</i> , 1996
ACN : MeOH : água	15:0:85; 25:25:50; 40:40:20; 15:0:85	1,0	MOTOHASHI <i>et al.</i> , 1996
ACN : água	35:65; 40:60; 35:65	1,0	MOTOHASHI <i>et al.</i> , 1996
MeOH : água	18:82; 70:30; 100:0; 18:82	1,0	LEÃO, 1997

O sistema de bombeamento, controlado por uma pressão alta, é responsável por eluir a fase móvel através do sistema cromatográfico. A vazão varia de acordo com o sistema de pressão, o qual é indispensável na otimização de separação da amostra e na indicação de problemas com o sistema (vazamentos, entupimentos e etc.).

#### 2.5.4.5. REGISTRO DAS ANÁLISES

A separação de uma mistura por cromatografia líquida é caracterizada por um gráfico, denominado cromatograma, onde cada composto está representado por um pico e um tempo de retenção, como demonstrado na figura 9. O registro desta representação, depende do detector utilizado na metodologia, o qual deve estar conectado na saída da coluna para medir a variação da composição da fase móvel, fornecendo um sinal elétrico (GICQUEL, 1998).



Cromatograma da análise de água contaminada por diversos agrotóxicos. O picos demonstrados podem ser numerados no computador após a análise do detector, eles são: 1 = aldicarb sulfoxide; 2 = aldicarb sulfone; 3 = 3-hidroxi-7-fenolcarbofuran; 4 = 3-hidroxicarbofuran; 5 = 3-cetocarbofuranfenol; 6 = aldicarb; 7 = 3-cetocarbofuran; 8 = Carbofuran; 9 = carbaril; 10 = clortoluron; 11 = 1-naftol; 12 = isoproturon; 13 = metolaclor. Esse cromatograma foi efetuado com a utilização de um detector UV e comprimento de onda de 220 nm (CHIRON & BARCELÓ, 1993).

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DE UM CROMATOGRAMA

FONTE: CHIRON & BARCELÓ (1993)

Os sinais elétricos são processados a partir de um microcomputador, que define o tempo de retenção, a altura e a área do composto separado da mistura (GUIMARÃES & COLLINS, 1993). Atualmente, com o recurso do computador, pode-se controlar as condições cromatográficas e dos cromatogramas.

Os picos serão detectados de forma correta se o equipamento estiver preparado com uma padronização interna específica para o composto que está sendo estudado. Como estabelecido anteriormente, é preciso determinar todas as condições cromatográficas, como a fase móvel utilizada, o tipo de coluna, o fluxo da fase móvel, a pressão do fluxo, a utilização de um gradiente ou não, o tipo de detector e o comprimento de onda aplicado. Para isso, deve-se obter soluções padrões referentes ao composto estudado, pois, a partir destas é que são estabelecidas as condições cromatográficas.

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. AVALIAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

##### 3.1.1. LOCALIZAÇÃO

A Bacia do Rio Cubatão Sul está localizada no litoral leste do Estado de Santa Catarina, entre os paralelos  $27^{\circ}35'$  e  $27^{\circ}50'$  de latitude Sul e  $49^{\circ}$  e  $48^{\circ}30'$  de longitude Oeste do meridiano de Greenwich (figura 10). Possui uma área de  $738,04 \text{ km}^2$  com  $167,44 \text{ km}$  de perímetro, abrangendo os municípios de Águas Mornas (integralmente), Palhoça (extremo norte), Santo Amaro da Imperatriz (integralmente) e São Pedro de Alcântara (sudoeste).

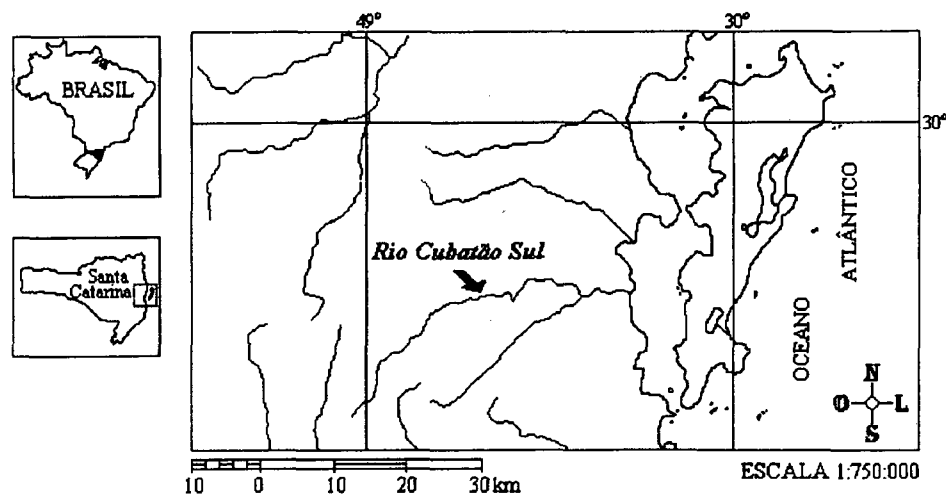


FIGURA 10 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DO RIO CUBATÃO SUL

FONTE: ATLAS ESCOLAR DE SANTA CATARINA (1991)

### 3.1.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AMBIENTAL

O Rio Cubatão Sul origina-se da junção dos rios Cedro e dos Bugres, e tem sua foz na baía sul da região da grande Florianópolis, no município de Palhoça. O comprimento dos cursos de água somam 1.284 km, distribuídos entre os afluentes principais do Rio Cubatão Sul: Rio do Bagre, Rio das Antas, Rio de Forquilha, Rio Matias, Rio Ribeirão Vermelho, Rio das Águas Claras e Rio Vargem do Braço. Os rios mais importantes da Bacia são drenados para leste, onde deságuam no Rio Cubatão e dirigem-se para a Baía sul, formando em sua foz um Ecossistema de manguezal (UFSC – Projeto PADCT/CIAMB, 1997).

De acordo com a classificação de Köppen, o tipo climático desta região é o Cfa – subtropical úmido com verão quente, apresentando temperaturas que variam dos 25 a 38°C. Os invernos são frios e com geadas nas regiões mais elevadas, devido às constantes entradas de frente fria, sendo que a variação da temperatura fica entre -3 °C e +18 °C. As precipitações médias mensais são maiores nos meses de dezembro a fevereiro (200 mm) e, menores nos meses de maio, junho e julho (100 mm). As chuvas na região são causadas pela passagem de frentes frias que atuam durante todos os meses. Estas, provocam enchentes com grande potencial erosivo quando alcançam uma precipitação acima de 200 mm em 24 horas (BÜCHELE *et al.*, 1994). Além disso, o solo da Bacia é o chamado podzólico vermelho-amarelo, muito susceptível à erosão, caso fique sem cobertura vegetal. O relevo possui duas unidades bem distintas. Os depósitos sedimentares que demarcam as planícies litorâneas planas e os relevos elevados, resultantes da ação de falhas, dobramentos e metamorfismos que formaram os vales profundos e encostas íngremes (UFSC – Projeto PADCT/CIAMB, 1997).

As formações vegetais existentes na Bacia do Rio Cubatão Sul integram as florestas nativas ou Mata Atlântica, denominada Floresta Ombrófila Densa, a qual situa-se entre o planalto e o oceano da região leste de Santa Catarina. Atualmente, essa floresta encontra-se intensamente explorada pela retirada das madeiras de significativo valor econômico para ceder lugar às pastagens e à agricultura (figura 11). Entretanto, face ao relevo bastante acidentado e de difícil acesso, grande parte da floresta encontra-se em estado original (NETO *et al.*, 1994).



FIGURA 11 – A AGRICULTURA ENTRE A MATA ATLÂNTICA DOS MORROS. LOCAL: DIVISA DOS MUNICÍPIOS DE SANTO AMARO DA IMPERATRIZ E ÁGUAS MORNAS.

### 3.1.3. DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

Sabe-se que a Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul é uma região que apresenta muitas atividades agrícolas devido à grande quantidade de produtos que são cultivados. Para a manutenção destas culturas, são aplicados agrotóxicos em todas as culturas, abrangendo grandes áreas que estão localizadas na bacia, e que, por sua vez, é banhada por muitos rios.

O Rio Cubatão Sul foi escolhido para a análise de resíduos de pesticidas devido à sua grande extensão e à sua importância como um recurso hídrico indispensável para o abastecimento da população da Grande Florianópolis. Foram estabelecidas quatro estações de amostragem, distribuídas ao longo de todo o Rio Cubatão Sul, as quais foram determinadas de acordo com a equidistância entre estas e à facilidade de acesso para a coleta (figura 12). Os pontos de coleta estão demonstrados na figura 13.



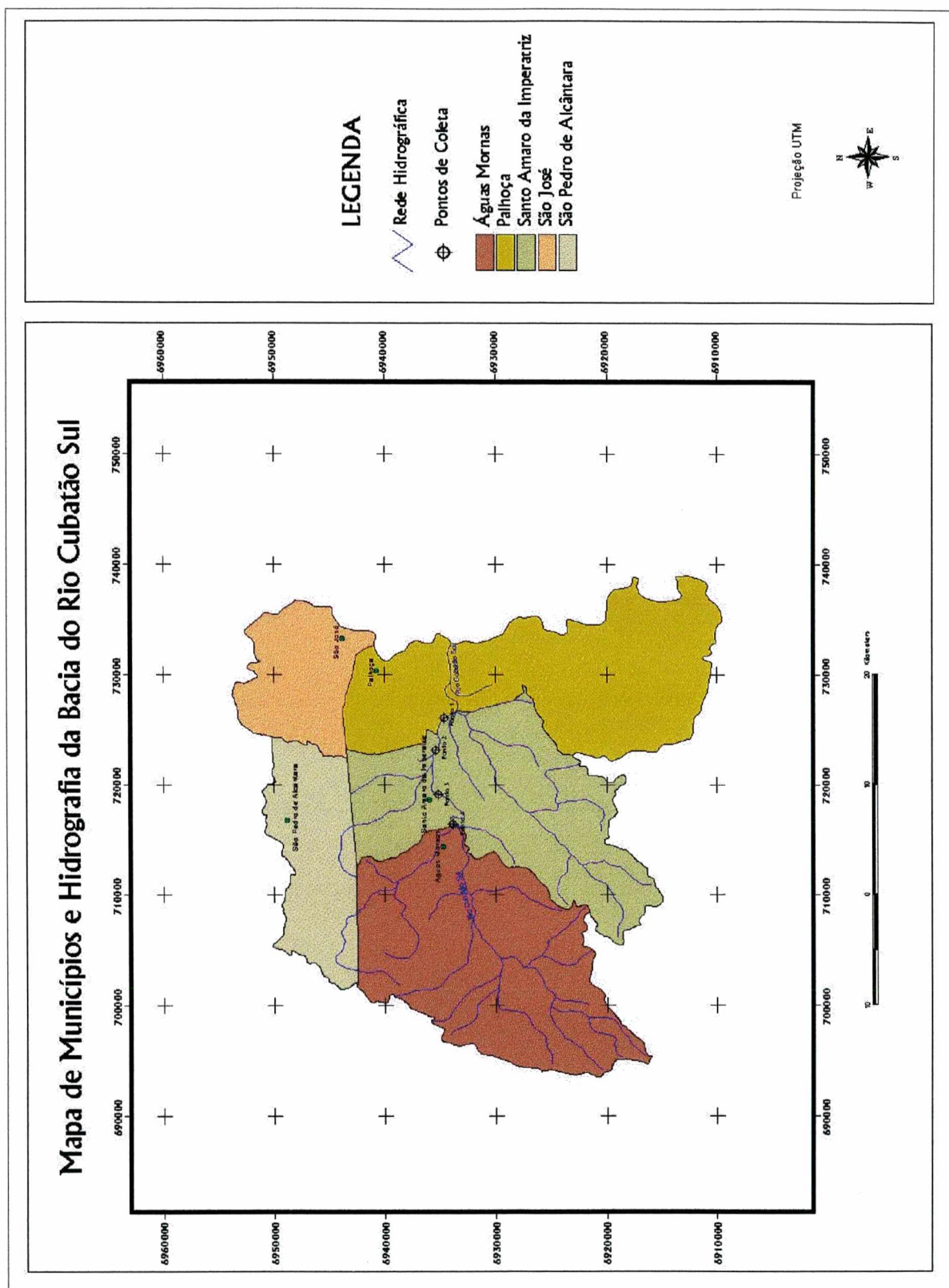


FIGURA 12 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRAIS AO LONGO DO RIO CUBATÃO SUL E MUNICÍPIOS.



FIGURA 13 – PONTOS DE COLETA REALIZADOS AO LONGO DO RIO CUBATÃO SUL.

## 3.2. COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

### 3.2.1. AMOSTRAS LÍQUIDAS

As amostras de água foram coletadas a 1 metro de profundidade da superfície e armazenadas segundo as metodologias 8318 (EPA, 1994), 8325 (EPA, 1996) e segundo HU *et al.* (1999). Estas foram armazenadas em frascos âmbar de 1 litro para evitar a luz solar direta e transportadas dentro de uma caixa de isopor com gelo até o laboratório. Antes de serem armazenadas nos frascos âmbar, foram medidas a temperatura (°C) e o Oxigênio Dissolvido (OD) em mg/L. No laboratório, o pH foi analisado nas amostras de água, onde posteriormente foram ajustadas a um pH de 3,5 com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), com o objetivo de manter a atividade dos N-metilcarbamatos estável. Os frascos com as amostras foram mantidos a -20 °C para posterior análise.



### 3.2.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas do Rio Cubatão Sul foram capturadas com uma rede de pesca e acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados para cada ponto de coleta. Os peixes foram transportados até o laboratório em uma caixa de isopor com gelo e mantidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para sua preservação e posterior identificação e análise, como estabelecido pelo método 1613 da EPA FISH CONTAMINANT WORKGROUP (1997).

### 3.2.3. DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES COLETADAS

A identificação sistemática foi realizada com o auxílio de profissionais do Departamento de Aqüicultura da UFSC e com as chaves dicotômicas pertencentes às literaturas de MENEZES (1987) e VARI (1991).

#### 3.2.3.1. CARÁ

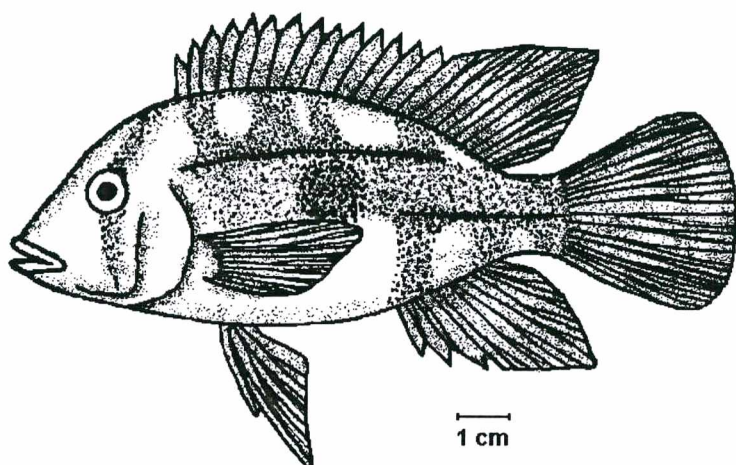
Os ciclídios pertencem à Ordem Perciformes, constituindo uma das famílias de peixes teleósteos de água doce mais expressivas em comunidades aquáticas tropicais. A família Cichlidae apresenta elevada diversidade ecológica e morfológica, além de serem amplamente distribuídos na África e na América do Sul. Na América do Sul, estão distribuídos em vários rios ao longo da costa Atlântica do Brasil e da Argentina, desde a Bahia até La Plata (MEURER, 1994).

O ciclídio *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), popularmente conhecido como cará ou acará-topete, é o maior e mais comum dos ciclídeos do nosso Estado predominando entre os demais em nosso mercado consumidor. Difere das demais espécies do grupo por ter a borda da nadadeira caudal arredondada. Atinge cerca de 20 centímetros e, quando jovem, apresenta um vistoso colorido (BUCKUP & REIS, 1993).

O nome científico *Geophagus*, refere-se ao tipo de habitat alimentar: *Geo* = terra, *phagus* = comer. Os “comedores de terra” vivem em ambientes com



substratos arenosos, que são ingeridos mas não fazem parte da dieta desses peixes. O substrato é ingerido porque nele são encontrados os alimentos procurados (animal, vegetal ou detrito) sendo que esses peixes contam com um aparelho digestivo adaptado para selecioná-lo. Devido a este hábito alimentar, são peixes que nadam próximo ao fundo do meio em que se encontram (BUCKUP & REIS, 1993).



Espécie: *Geophagus brasiliensis*

Gênero: GEOPHAGUS

Família: CICHLIDAE

Ordem: PERCIFORMES

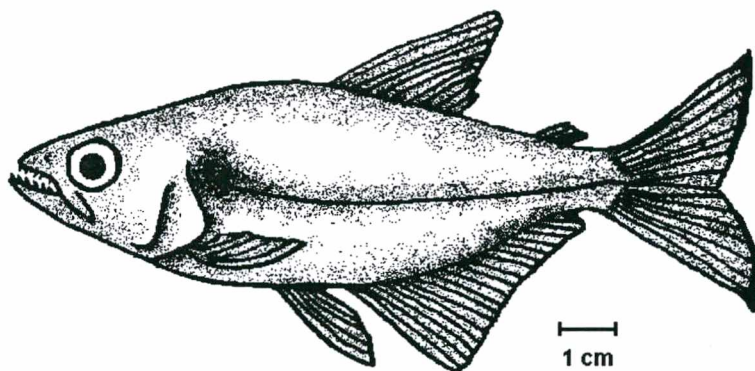
FIGURA 14 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO CARÁ.

FONTE: BUCKUP & REIS (1993).

### 3.2.3.2. DENTUDO

A espécie *Oligosarcus jenynsii* (Günther, 1864), pertencente à família Characidae, distribui-se nos arroios, rios e lagoas da região costeira e da planície interior do Rio Grande do Sul, Brasil, Uruguai e Argentina (MENEZES, 1971). A família Characidae engloba a maior parte dos peixes de água doce do Brasil (cerca de 400 espécies). Vivem em uma grande diversidade de ambientes apresentando uma imensa variedade de formas, que variam em tamanhos desde 2 centímetros até mais de 1 metro, como o dourado, por exemplo. Os peixes do gênero *Oligosarcus* não ultrapassam 15 centímetros de comprimento, apresentando pouco interesse na pesca comercial. São espécies onívoras<sup>9</sup>, com preferência para peixes (MENEZES, 1987).

<sup>9</sup> Os peixes onívoros utilizam de alimento animal e vegetal vivo, em partes bastante equilibradas. Quando há um certo domínio de algum dos itens. Referem-se às espécies como: onívoras com tendência à carnívora ou onívoras com tendência à herbívora. Em relação à ecologia trófica, usa o termo onívoro para se referir às espécies que se utilizam de alimentos pertencentes a dois ou mais níveis tróficos.



Espécie: *Oligosarcus jenynsii*

Gênero: OLIGOSARCUS

Família: CHARACIDAE

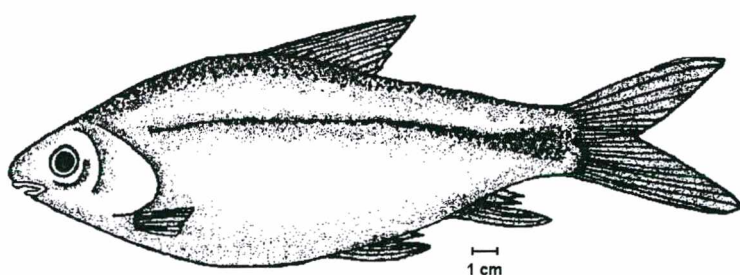
Ordem: CHARACIFORMES

FIGURA 15 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO DENTUDO.

FONTE: MENEZES (1988)

### 3.2.3.3. BIRU

Os curimatídeos distribuem-se por toda a América do Sul, ocorrendo desde a Bacia do Rio Orinoco na Região Amazônica e o oeste da Cordilheira dos Andes até a Bacia do Rio da Prata, na região Argentina (VARI, 1991). Embora apresentem uma ampla distribuição, várias espécies ainda são desconhecidas devido à falta de amostragens nos diversos afluentes interiores da América do Sul (VARI, 1991).



Espécie: (não identificada)

Gênero: STEINDACHNERINA

Família: CURIMATIDAE

Ordem: CYPRINIFORMES

FIGURA 16 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO BIRU.

FONTE: VARI (1991)

Os birus ou curimbatizinhos, cientificamente conhecidos como *Steindachnerina* sp., são peixes pertencentes à Ordem Characiformes e à família Curimatidae (figura 16). Quando adultos, alcançam até 15 centímetros de comprimento, não representando grande valor comercial. São peixes detritívoros, que se alimentam de matéria orgânica de origem animal em putrefação e/ou matéria

vegetal em fermentação, normalmente encontrados no fundo de rios e lagos (VARI, 1991).

### **3.3. LAVAGEM DE VIDRARIA**

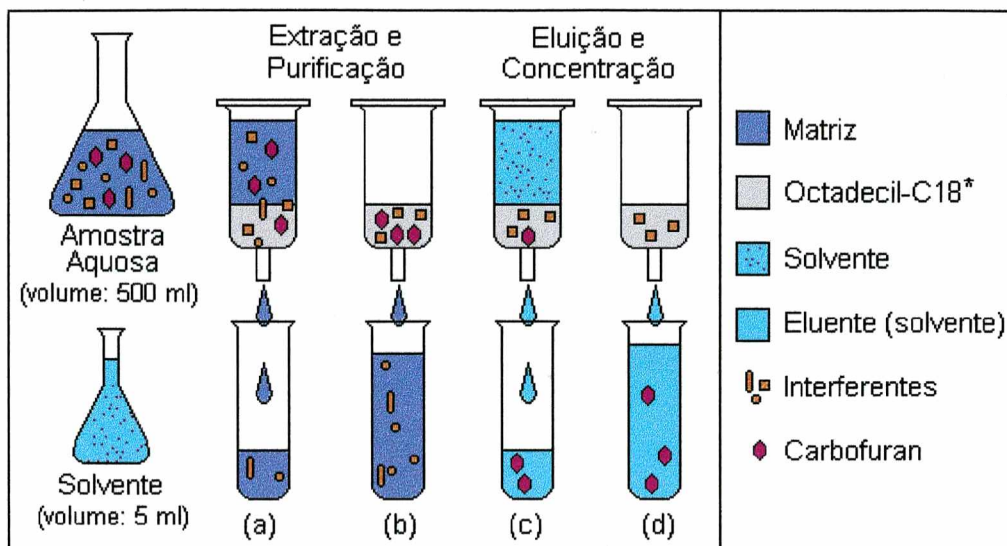
Para a lavagem da vidraria, utilizou-se uma solução de detergente neutro 3% (VETEC Química Fina Ltda.) previamente aquecida a 60 °C. A vidraria foi lavada com esta solução com o auxílio de escovas e esponjas. Após este procedimento, as vidrarias receberam água destilada por várias vezes e, finalmente, água ultra-pura.

### **3.4. METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO**

#### **3.4.1. AMOSTRAS LÍQUIDAS**

As amostras de água foram descongeladas e filtradas com membranas de 47 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro (MILIPORE), e com o auxílio de uma bomba a vácuo. A membrana foi utilizada com o objetivo de eliminar material em suspensão e, conseqüentemente, reduzir as impurezas. As amostras filtradas foram depositadas em balões volumétricos, os quais permaneceram em geladeira à uma temperatura de 4 °C. Após 12 horas, 500 mL das amostras foram percoladas através de uma minicoluna de 3 mL contendo 500 mg de octadecil-C18 (SPE-ED™ C18/OH), as quais foram previamente ativadas com 5 mL de metanol (grau HPLC) e 5 mL de água ultra-pura (figura 17). As minicolunas estavam conectadas a uma câmara ou "manifold" ligada a uma bomba a vácuo, a qual propiciava a passagem da amostra de água do balão volumétrico à minicoluna (figura 18).

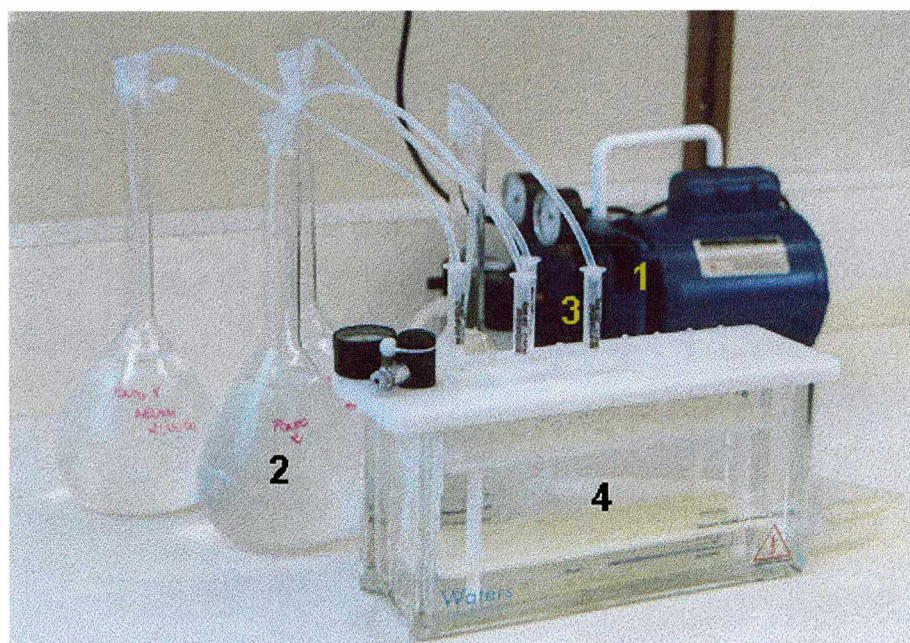




\* Octadecil-C18: é um material adsorvente da minicoluna que retém compostos polares.

- Passagem dos 500 mL de amostra pela minicoluna.
- Retenção de todos os compostos orgânicos (inclusive o Carbofuran) e poucos interferentes (extração do Carbofuran e purificação). Todo o volume passado pela minicoluna é descartado.
- Os compostos de Carbofuran são liberados da coluna (dessorção) com a passagem de 5 mL do solvente orgânico, obtendo-se o eluente (solvente e Carbofuran).
- O volume final do eluente obtido (5 mL) é menor que o volume da amostra aquosa (500 mL), o que proporciona a concentração.

FIGURA 17 – ESQUEMA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO, ELUIÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS CONTAMINADAS COM CARBOFURAN UTILIZANDO MINICOLUNAS.



1 = bomba de vácuo; 2 = amostra aquosa em balão volumétrico; 3 = minicoluna C-18; 4 = cuba de estocagem da água.

FIGURA 18 – SISTEMA (MANIFOLD) PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA LÍQUIDA.

Após a passagem da amostra de água, foi adicionado aproximadamente 5 mL de metanol para a eluição do resíduo. Este foi coletado em tubos de ensaio e transferido para balões volumétricos de 10 mL. O eluente foi, então, conservado em geladeira à uma temperatura de 4 °C. O procedimento de extração está representado na figura 19.

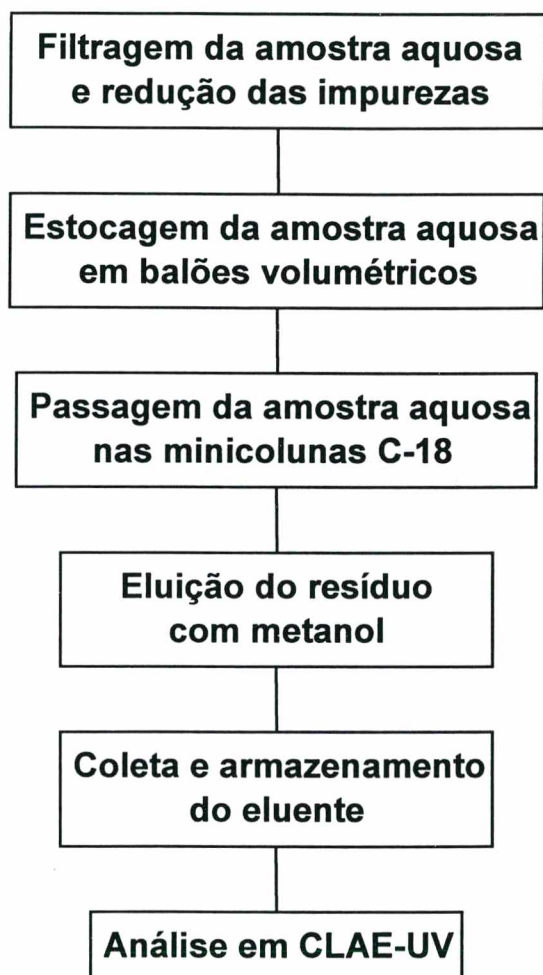


FIGURA 19 – FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE ÁGUA DO RIO CUBATÃO SUL.

### 3.4.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A metodologia utilizada para a extração do Carbofuran, foi desenvolvida e adaptada com base nos trabalhos científicos de GOEL (1995), BRESSA *et al.* (1996), BROWN *et al.* (1996) e MARUYA & LEE (1998). De acordo com a pesquisa realizada



por estes autores, foi possível perceber técnicas de extração distintas para análise de agrotóxicos em peixes. Desse modo, foram realizadas duas técnicas de extração, identificadas como Metodologia de Extração de Tecidos I e II (MET I e MET II), as quais foram avaliadas quanto à eficiência de extração do Carbofuran.

Em ambas as metodologias as amostras biológicas foram primeiramente descongeladas e medidas segundo o peso e o comprimento de cada indivíduo. Após a biometria, os organismos e o material cirúrgico foram limpos com água e acetona, evitando, assim, qualquer tipo de contaminação externa.

#### 3.4.2.1. METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE TECIDOS I

Esta metodologia consiste na aplicação direta de um solvente sobre o tecido a ser analisado. O solvente utilizado para o procedimento foi a acetonitrila (TEDIA, grau HPLC). O tecido, antes de entrar em contato com o solvente, foi cortado e triturado. O volume do solvente adicionado nos tecidos foi o equivalente a 20 vezes o peso do tecido. Após a adição do solvente, a amostra foi sonificada (BRANSONIC® Ultrasonic Cleaner, modelo 2210 R-MT) por 10 minutos.

Para a obtenção da fração sobrenadante, a amostra foi centrifugada (HITACHI, modelo Himac CR20B2) a uma velocidade de 12.000 rpm durante 15 minutos para proporcionar a redução das impurezas. O sobrenadante coletado recebeu o agente secante sulfato de sódio anidro, o qual tinha a capacidade de retirar a água fisiológica da amostra. Esta, foi novamente centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos para evitar a presença do agente secante na fração sobrenadante. A fração foi evaporada com o auxílio de um evaporador rotatório (FISATOM Schott Duran, modelo 802 D) e redissolvida em água ultra pura. A amostra foi, então, percolada sob vácuo através das minicolunas C-18 de 3 mL, as quais foram previamente ativadas.

Após a passagem da amostra de água, foi adicionado 5 mL de metanol para a eluição do resíduo orgânico. Este foi coletado diretamente em balões volumétricos de 5 mL e conservado em geladeira à uma temperatura de 4 °C.

### 3.4.2.2. METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE TECIDOS II

Esta metodologia diferencia-se da anterior devido a utilização de uma solução tampão na homogeneização da amostra (figura 20). Após a limpeza com água e acetona, os tecidos foram homogeneizados em uma solução tampão (TRIS 50 mM; NaCl 0,1 M; EDTA 20 mM; pH 8,0), estabelecida por MATIAS (1996). O volume do tampão foi o equivalente a 20 vezes o peso do tecido. Após a adição da solução tampão, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm durante 15 minutos com o mesmo objetivo de reduzir impurezas.

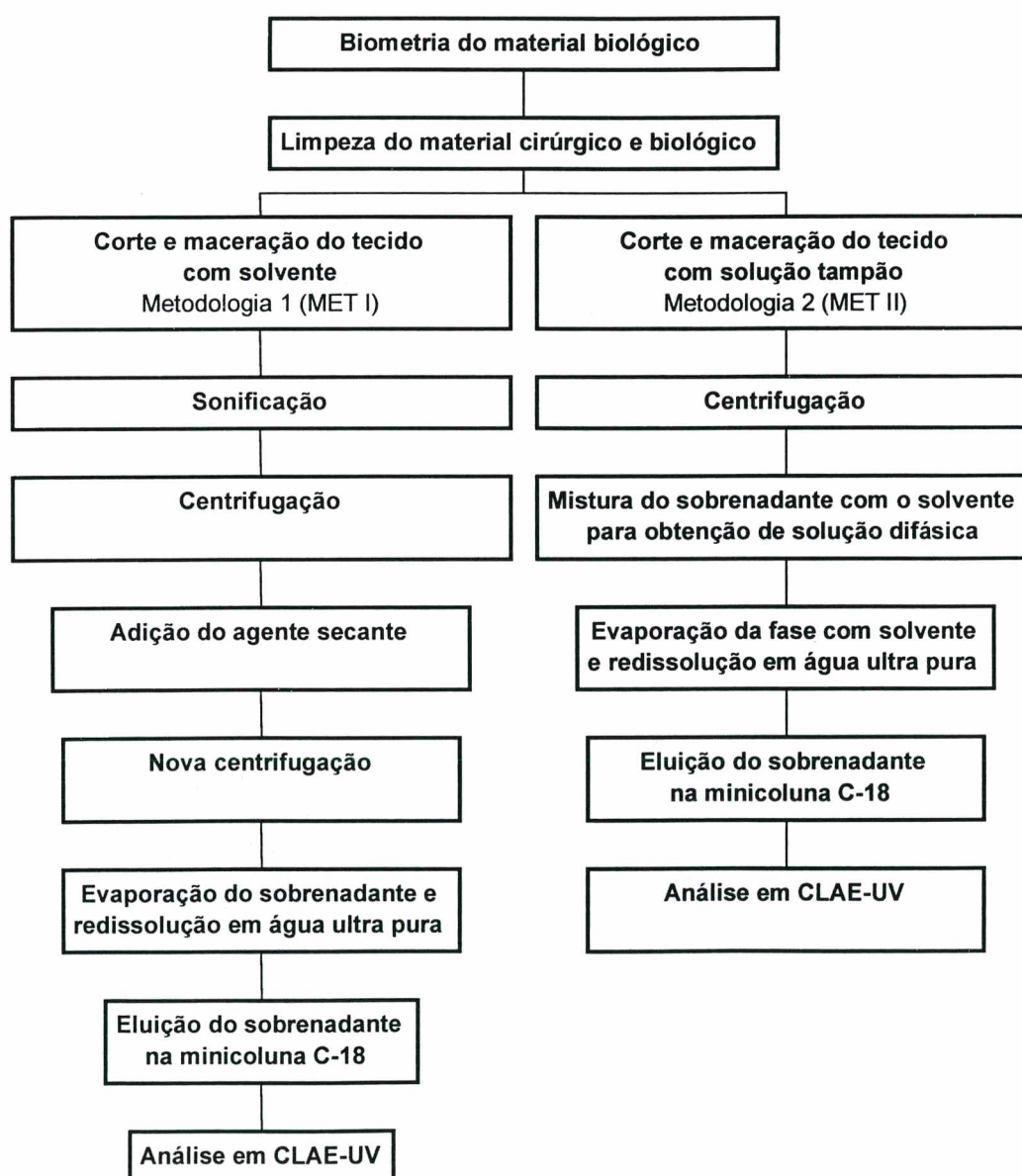


FIGURA 20 – PROCEDIMENTO GERAL DA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO DE PEIXES REALIZADO PELAS METODOLOGIAS MET I E MET II.

O sobrenadante foi coletado e homogeneizado com o solvente orgânico éter, proporcionando uma solução difásica e a extração do Carbofuran do tecido e outros compostos orgânicos. Foram realizadas três frações com este solvente para extrair todo o Carbofuran presente no tecido. Todas as três frações sobrenadantes que continham o éter e o Carbofuran, foram totalmente evaporadas com o auxílio do evaporador rotatório e, logo após, redissolvidas em água ultra pura. A amostra foi, então, percolada a vácuo através das minicolunas C-18 de 3 mL. Após a passagem da amostra, foi adicionado 5 mL de metanol para a eluição do resíduo. Este, também foi coletado diretamente em balões volumétricos e conservado à uma temperatura de 4 °C.

### **3.5. DETERMINAÇÃO DE CARBAMATOS**

#### **3.5.1. SEPARAÇÃO E DETECÇÃO**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) da Hawllet Packard™ – HP, modelo 1050. Para a separação, foi empregada uma coluna analítica de 25 cm de comprimento contendo octadecil-C18 (partículas de 5 µm de diâmetro) em seu interior.

Foi programado um gradiente isocrático com a fase móvel constituído por 60% metanol e 40% água ultra pura. A vazão utilizada para a análise foi estabelecida em 1,2 mL/min, a qual possibilitou a separação e a detecção de carbamatos em apenas cinco minutos. Para a detecção, foi empregado o detector ultravioleta (Hawllet Packard™ – HP, modelo 1050) utilizando o comprimento de onda de 190 nm. Este comprimento de onda foi previamente determinado com base nas metodologias de análise utilizadas por CHIRON & BARCELÓ (1993) e TORRES *et al.* (1996), e a partir da análise de absorbância do composto Carbofuran em espectrofotômetro (HACH Flight®, modelo FN12B0X). O Carbofuran, como esperado, mostrou a maior absorbância no comprimento de onda de 190 nm.



### 3.5.2. CURVA PADRÃO DO CARBOFURAN

Após estabelecer a técnica de detecção de Carbofuran na CLAE, foi realizada a preparação das curvas padrões de calibração externa a partir de uma solução mãe. Esta foi preparada com o composto Carbofuran puro em pó, diluído em metanol. A concentração da solução mãe preparada foi de 1000 ppm ou 1000 mg/L, no qual dissolveu-se 0,025 g de Carbofuran em 25 mL de metanol. De acordo com a EPA (1994), esta solução mãe pode permanecer estocada em refrigeração (4 °C) e sem contato com a luz por um período de 6 meses.

Para possibilitar a quantificação do Carbofuran em amostras ambientais possivelmente contaminadas por resíduos deste agrotóxico, deve-se preparar uma curva de calibração externa. De acordo com a metodologia 531.1 da EPA (1989), a curva de calibração externa deve ter, no mínimo, cinco níveis de concentração. Foram preparadas seis níveis de concentração da solução mãe diluída em água ultra pura, obtendo-se: 0,050 mg/L; 0,125 mg/L; 0,250 mg/L; 0,500 mg/L; 1,000 mg/L e 2,000 mg/L. Essas concentrações, utilizadas para a curva padrão, apresentam uma quantidade mínima de Carbofuran, visto que este pode ser encontrado também em quantidades mínimas no ambiente em virtude da época de aplicação nas plantações. Como pode-se observar no item 4.2.2 do capítulo IV, a concentração mínima do Carbofuran estabelecida na curva padrão é de 50 ppb.

As soluções padrão foram injetadas no Cromatógrafo Líquido impreterivelmente no dia de injeção das amostras, com o objetivo de estabelecer uma curva padrão do composto Carbofuran e possibilitar a detecção deste nas amostras aquosas e biológicas que porventura possam estar contaminadas.

### 3.5.3. INJEÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

Após estabelecer as curvas padrão, as amostras aquosas e biológicas foram injetadas no CLAE-UV. Todas as amostras foram injetadas em triplicata. O volume de amostras ou de solução padrão injetado no cromatógrafo foi de 100 µL.

### 3.6. TESTES CONTROLE PARA DETERMINAÇÃO DO FATOR DE RECUPERAÇÃO

Todos os testes realizados na extração de amostras aquosas e biológicas foram previamente avaliados quanto à eficiência de recuperação do Carbofuran, utilizando-se soluções padrão para fortificar amostras controle. De acordo com a metodologia 531.1 da U.S.EPA (1989), a fortificação de branco (amostra controle) e de amostra biológica é essencial para determinar, em porcentagens, a eficiência de extração. Para tanto, foram preparadas amostras controle contendo uma concentração conhecida de Carbofuran que, após passarem pelos procedimentos da extração, são analisadas no CLAE-UV para a determinação de sua concentração final obtida.

Para a determinação da melhor técnica de extração de peixes e/ou a eficiência dessas técnicas, indivíduos da espécie *Poecilia reticulata* (item 3.7.1) foram sacrificados. Os tecidos foram fortificados, antes de serem homogeneizados, com a adição de uma concentração conhecida da solução padrão de Carbofuran.

A recuperação do Carbofuran foi determinada pela comparação das áreas dos picos da amostra juntamente com as obtidas de misturas de padrões de concentração conhecida, por curvas de calibração externa.

### 3.7. TESTE DE TOXICOLÓGICOS

O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com FRELLO (1998), que desenvolveu ensaios de toxicidade aguda com o mesmo reativo biológico (*Poecilia reticulata*) exposto ao composto Carbofuran.

#### 3.7.1. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE UTILIZADA PARA OS TESTES

Pertencentes à família dos poecilídeos (Poeciliidae), a *Poecilia reticulata* (Bloch & Schneider, 1801), é uma espécie originária da América Central, Trindade e Barbados; e de países sul-americanos vizinhos, como a Venezuela e a Guiana. Esta espécie foi introduzida no Brasil e em outros países para combater o mosquito da



malária, pois as larvas deste mosquito servem de alimento para o referido peixe. As únicas espécies originárias do Brasil, segundo IHERING (1931), são *Poecilia vivipara*, *Poecilia branneri* e *Poecilia parae*.

São denominados popularmente como barrigudinho, guaru, sarapintado, bobó e gupi ou “guppy”. O nome *reticulata* provém do aspecto de rede que as escamas deste peixe formam, pois tem bordas mais escuras e bem definidas. São peixes muito pequenos, com diferenças sexuais externas ou dimorfismo sexual externo, onde os machos destacam-se pela variedade de nadadeiras caudais coloridas e pelo tamanho (figura 21). Os machos medem aproximadamente 3,5 centímetros de comprimento e, as fêmeas, 5,5 centímetros. Devido ao aspecto colorido, ao seu tamanho e ao curto período de reprodução da fêmea – que pode repetir-se a cada 4 ou 5 semanas – são peixes muito importantes na aquariofilia. Devido à falta de cuidado parental, os alevinos são freqüentemente comidos pelos peixes adultos. São onívoros ou polípagos e buscam seus alimentos na superfície (ROSEN & BAILEY, 1963).

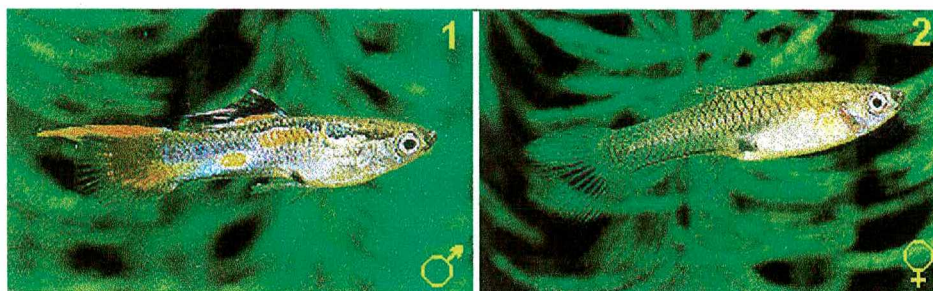
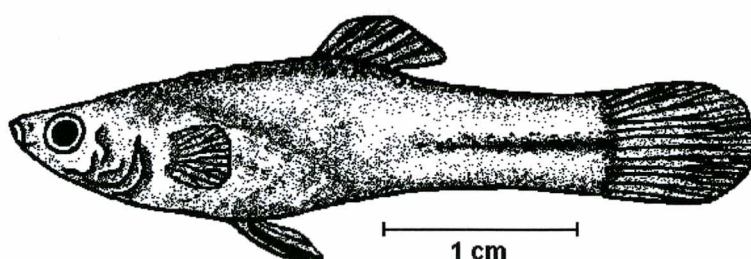


FIGURA 21 – DIMORFISMO SEXUAL EXTERNO DE *POECILIA RETICULATA*.

FONTE: <http://www.guppys.cjb.net/>



Espécie: *Poecilia reticulata*

Gênero: POECILIA

Família: POECILIIDAE

Ordem: ATHERINIFORMES

FIGURA 22 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESPÉCIE *POECILIA RETICULATA*.

FONTE: IHERING (1931)

### 3.7.2. CAPTURA E ADAPTAÇÃO

Os indivíduos da espécie *Poecilia reticulata*, provenientes do lago do Centro de Convivência da Universidade Federal de Santa Catarina, foram capturados com redes de *nylon* de malha ¼". Os peixes foram acondicionados em um recipiente plástico contendo água do próprio lago e, posteriormente, transportados para o Laboratório de Toxicologia Ambiental visando a adaptação nos aquários e posterior utilização em testes de toxicidade.

No laboratório, os organismos que ainda permaneciam dentro do recipiente plástico (recipiente 1 – R1), receberam aeração ao mesmo tempo em que era preparado o aquário de capacidade para 60 litros (recipiente 2 – R2) com 20 litros de água do lago e 10 litros de água tratada da CASAN<sup>10</sup> (Companhia Catarinense de Água e Saneamento). Todo o conteúdo (peixes e água) do R1 foi depositado no R2 onde continha um aerador para aquário.

A cada 2 horas, aproximadamente, eram retirados cerca de ¼ de litros do R2 por sifonação e o mesmo volume era repostado com água tratada da CASAN. As várias trocas de água resultaram na obtenção de um aspecto mais límpido da água, pois era necessário para a adaptação dos peixes neste tipo de ambiente. Após esta etapa, os peixes foram transferidos para outro recipiente (R3), com capacidade para 60 litros, contendo água de diluição<sup>11</sup> e da CASAN, na proporção de 1 para 2, além de aerador para aquário. O tempo de permanência no R3 foi aproximadamente de 2 a 3 dias, com a constante troca de alguns litros de água (o necessário para retirar o material depositado no fundo – restos de alimentos e fezes) por sifonamento e reposição do mesmo volume por água de diluição.

Por fim, os peixes foram transferidos para um quarto recipiente (R4) de adaptação. Este apresentava capacidade para 30 L e continha 100% de água destilada e filtro para aquário. Os organismos permaneceram em aclimação neste recipiente pelo mínimo 2 dias, onde finalmente, estariam prontos para serem utilizados em testes de sensibilidade.

---

<sup>10</sup> Esta água permaneceu em um recipiente com aeração durante 96 horas com o objetivo de propiciar a retirada do cloro presente por evaporação.

<sup>11</sup> A água de diluição para testes de toxicidade com peixes é uma água constituída, preparada pela dissolução de sais em água destilada ou deionizada. A água de diluição deve ter pH  $7,4 \pm 0,2$ ; dureza total de 40 a 48 mg/l em  $\text{CaCO}_3$  e condutividade aproximada de 160  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (ver modo de preparação no anexo 1).



Antes de iniciar os testes, foi realizada a biometria de cada indivíduo (peso e comprimento), tomando-se o cuidado para que a massa total dos organismos não ultrapassasse 1,0 g/L de solução-teste, de acordo com as recomendações da CETESB (1987). Além disso, a alimentação dos organismos-teste, que até então era controlada, foi interrompida 24 horas antes do início dos ensaios, sendo que e os indivíduos com malformações ou doentes foram descartados.

O procedimento do transporte e aclimação dos organismos em todos os recipientes até o início dos testes está representado esquematicamente na figura 19.

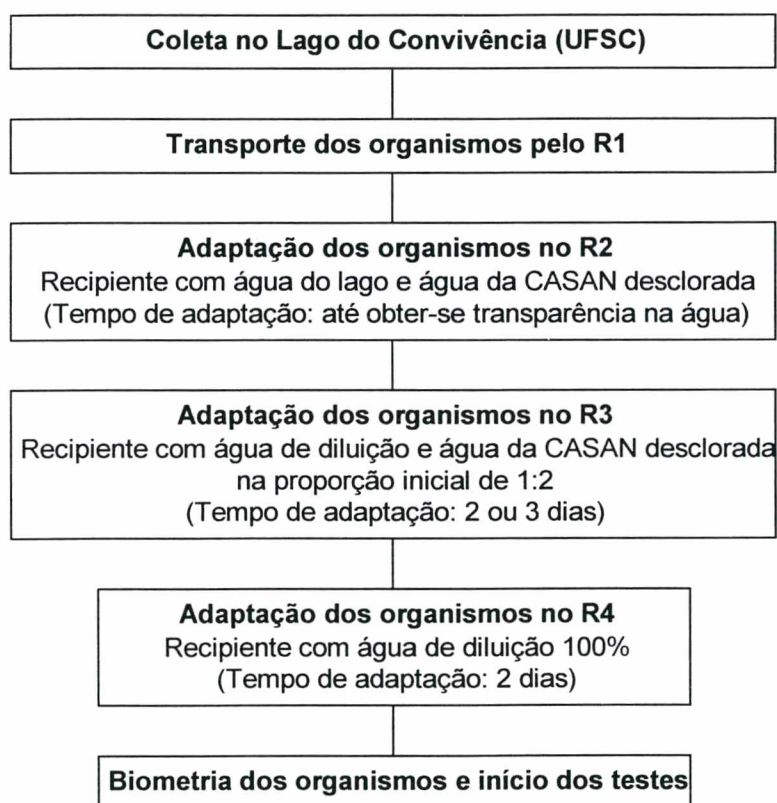


FIGURA 23 – FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE TRANSPORTE E ADAPTAÇÃO DOS ORGANISMOS.

### 3.7.3. REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE

O teste de sensibilidade refere-se à avaliação da sensibilidade dos lotes dos peixes coletados, através da determinação da Concentração Letal Inicial Média

– CL(I)<sub>50</sub>. O resultado desta avaliação permite verificar se os organismos estão aptos para um teste de toxicidade aguda.

Como descrito pelas normas da CETESB (1987), os testes de sensibilidade são realizados num período de 24 horas e os peixes são expostos à diferentes concentrações de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), que é a substância de referência utilizada.

Os testes foram realizados em aquários com capacidade para 2000 mL, os quais foram mantidos com aeração constante e em banho-maria, para o controle da temperatura, como mostra o esquema representado na figura 20. Foram realizados apenas 2 ensaios com 5 diluições diferentes (56; 110; 320; 480; 800 mg/L), que, posteriormente, foram comparados com os resultados obtidos por FRELLO (1998). A comparação dos resultados permitiu avaliar se os organismos estavam aptos ou não para o teste de toxicidade aguda.

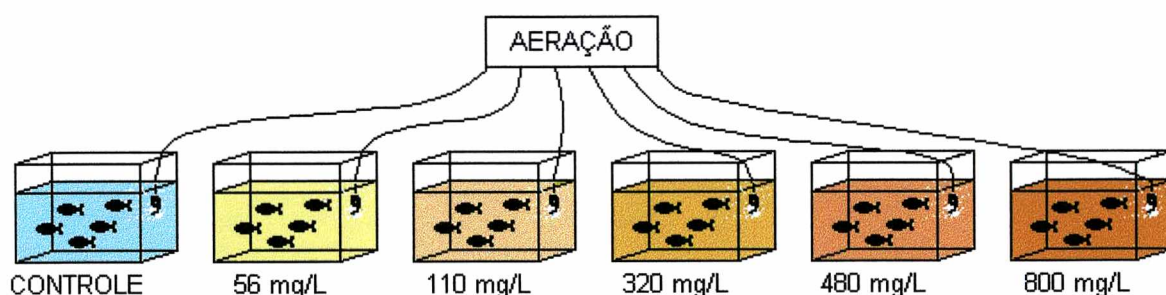


FIGURA 24 – ESQUEMA DO TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS COM DICROMATO DE POTÁSSIO

#### 3.7.4. REALIZAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Após a avaliação dos organismos do teste de sensibilidade, foram realizados os testes de toxicidade aguda. Este método consistiu na exposição direta dos organismos a várias concentrações do composto Carbofuran comercial (Furadan<sup>®</sup>). Em cada aquário, foram estabelecidas diferentes faixas de concentrações do Furadan e foram utilizados 10 peixes, os quais permaneceram sob observação no período de 3, 6, 24 e 48 horas da duração do teste. Nestes períodos,

foram observados os comportamentos anormais dos peixes, além da retirada dos peixes mortos com redes de nylon.

As faixas de concentrações utilizadas para os testes de toxicidade aguda foram de 70, 100, 150, 200 e 300  $\mu\text{g/L}$ , como estabelecido por FRELLO (1998). Para a realização deste teste de toxicidade aguda, foram utilizados 6 aquários, cada um com capacidade para 2 litros e colocados em banho-maria. Cada aquário recebeu diferentes concentrações de Carbofuran, sendo que um deles foi estabelecido como aquário controle, mantendo-se com água de diluição.

Análises de condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH e Oxigênio Dissolvido (OD) em  $\text{mg/L}$  também foram efetuadas ao longo de todo o experimento de toxicidade aguda (a cada período de observação).

### 3.7.5. REALIZAÇÃO DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO

Foram realizados 5 ensaios com três diluições (110; 130; 200  $\mu\text{g/L}$ ), além de 1 ensaio controle sem reativos biológicos para determinar a eventual degradação do Carbofuran a partir de processos abióticos. No teste de bioacumulação, os valores das três diluições utilizadas permitiram, segundo os cálculos obtidos por FRELLO (1998), a obtenção dos reativos vivos nas menores concentrações e mortos, nas maiores. Ou seja, as concentrações utilizadas foram estabelecidas nos valores abaixo da  $\text{CL}_{50}$  (110 e 130  $\mu\text{g/L}$ ) e acima (200  $\mu\text{g/L}$ ). Nos testes de bioacumulação, foram utilizados 5 reativos biológicos em cada aquário.

Assim como no teste de toxicidade aguda, foram efetuadas as análises físicas do teste (Temperatura e OD) a cada período de observação, onde foram retirados os reativos biológicos mortos. Sendo assim, o tempo de exposição deste teste foi de 48 horas, com observações às 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

Amostras dos reativos biológicos e de água dos aquários, foram armazenadas segundo as metodologias previamente definidas, para posterior análise na CLAE-UV. As concentrações dos aquários, também foram estabelecidas devido à elevada concentração que pode ser detectada pela metodologia do presente trabalho.

### 3.7.6. COLETA E PRESERVAÇÃO DOS REATIVOS BIOLÓGICOS

Após cada período de observação (3, 6, 24 e 48 horas), as amostras biológicas mortas eram coletadas com uma rede de nylon e armazenadas em papel alumínio a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ao fim dos testes (toxicidade aguda e bioacumulação), as amostras biológicas ainda vivas, eram sacrificadas e armazenadas do mesmo modo.

Além dos reativos biológicos, foram coletadas alíquotas de aproximadamente 10 mL da água de todos os aquários que estavam contaminados por Carbofuran. Estas foram mantidas em uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  e conservadas à ausência total de luz.

Todos os materiais coletados nos testes realizados foram preparados para posterior análise de resíduos de Carbofuran em CLAE-UV. Os procedimentos de extração e análise seguem os mesmos estabelecidos para as análises ambientais.



## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO

##### 4.1.1. SENSIBILIDADE DO SISTEMA DE DETECÇÃO UV

As análises na CLAE-UV foram realizadas no comprimento de onda de 190 nm, como determinado previamente no espectrofotômetro, possibilitando a melhor detecção possível. Este comprimento de onda, além de constituir o limite mínimo de detecção do aparelho, apresentou o melhor pico de absorção do Carbofuran no UV.

Os cromatogramas obtidos apresentaram linhas de base muito sensíveis, com diversos picos pequenos ou ruídos devido à elevada sensibilidade do comprimento de onda utilizado. Estes, comprometem a detecção e a análise de amostras com concentrações muito baixas de Carbofuran. Os picos destas amostras apresentaram-se alterados e irreais, devido à presença de ruídos que ocorreram no mesmo tempo de retenção do Carbofuran. Portanto, foram estabelecidas concentrações mais elevadas até a determinação do valor mínimo, posteriormente definido como o limite de detecção do Carbofuran na CLAE-UV (190 nm). O valor mínimo estabelecido, em geral, é definido como a concentração mínima de um composto na amostra necessária para resultar em um pico com razão sinal-ruído de 3:1 (SUNDARAM & NOTT, 1992; AGÜERA & CONTRERAS, 1993; MAGDIC *et al.*, 1996).

A presença de picos negativos em todos os cromatogramas analisados, também prejudicou a interpretação das amostras devido à integração errônea dos picos do Carbofuran. Portanto, era necessário integrar manualmente cada pico de detecção, traçando uma linha base para permitir a definição da área real do pico detectado (figura 25).

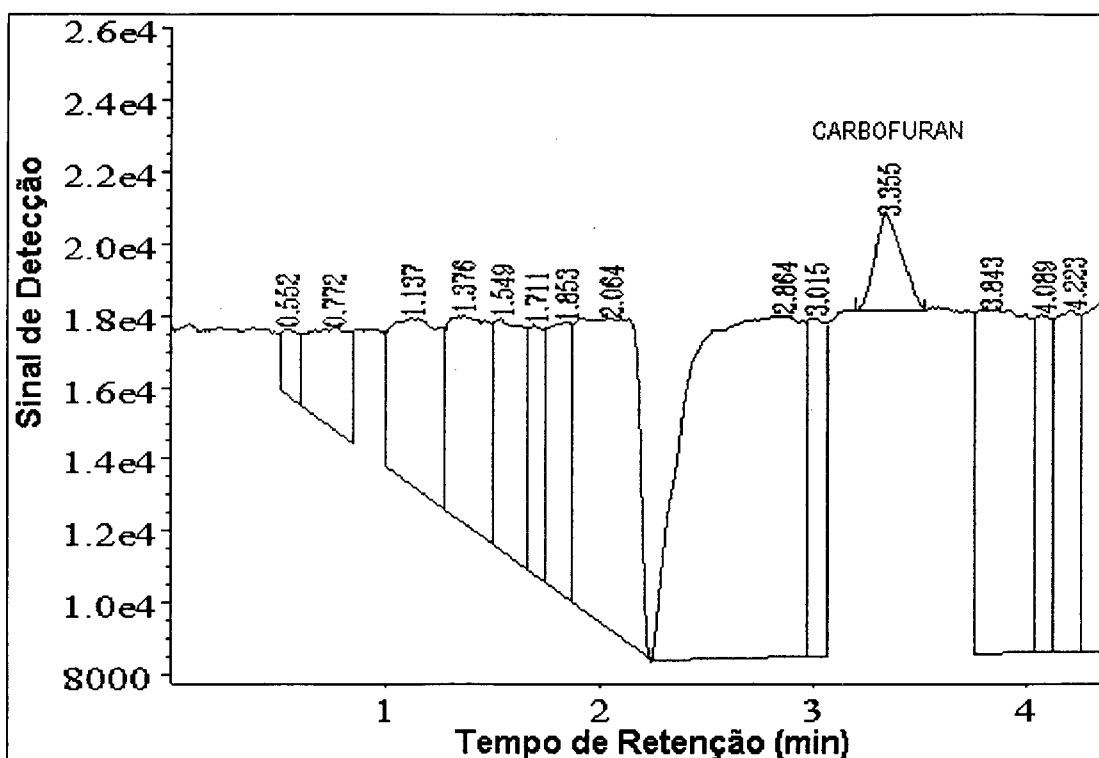


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA INTEGRAÇÃO MANUAL PARA A CORREÇÃO DO CÁLCULO DA ÁREA REAL DO PICO DO CARBOFURAN.

Os picos negativos são freqüentemente encontrados em cromatogramas de diversos trabalhos científicos. O pico negativo na região inicial do cromatograma é provocado pela amostra que, normalmente diluída em água, é mais transparente no UV do que a própria fase móvel. Como a água não é retida, esta é liberada, ocorrendo o pico negativo.

#### 4.1.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA

Os cromatogramas obtidos pelo método de detecção do presente trabalho, apresentaram limites de detecção de 50 ppb, como definido pela curva de calibração externa (figura 26). Faixas de concentrações menores que 50 ppb não foram válidas devido à presença de muitos ruídos na linha de base do cromatograma. DALLAGO *et al.* (1997), em análises de resíduos de Carbofuran e carbaril em amostras de água por CLAE-UV, também determinou o limite mínimo de 50 ppb. Sabe-se que as análises de carbamatos a partir da utilização da coluna de derivatização e da detecção por fluorescência fornecem resultados mais sensíveis. DE KOK *et al.* (1990) destaca que os limites de detecção obtidos por esta metodologia de análise pode atuar em faixas de 1 a 10 ppb, ou seja, inferiores aos níveis de detecção por ultravioleta. Entretanto, o “Application Manual Carbamates” (1999) determina que o limite de detecção encontrado para a metodologia de derivatização chega a 0,2 ppb. Desse modo, apesar dos diferentes limites de detecção, a metodologia com o uso de derivatização é, sem dúvida, mais sensível que a metodologia de detecção por UV. Entretanto, a CLAE-UV ainda destaca-se por ser uma metodologia eficiente e de rápida análise de amostras ambientais.

A curva de calibração externa do Carbofuran, de acordo com a metodologia da U.S. EPA (1996), deve conter um número suficiente de pontos de calibração para determinar, de forma precisa, a equação da curva. Segundo o método 531.1 (U.S. EPA, 1989), o número mínimo requerido de níveis de concentrações (pontos) para a curva de calibração é 3, entretanto, recomenda-se 5 pontos. No presente trabalho, foram realizadas, para cada dia de análise, curvas de calibração externa com 6 concentrações diferentes, como destacado no item 3.5.2.

As curvas de calibração externa, preparadas e plotadas em todos os dias de análise, apresentaram bons coeficientes de linearidade, em torno de 0,998, o que demonstra um alto grau de confiabilidade nas preparações das concentrações e nas injeções (figura 26). De outro modo, o erro metodológico não percebido ou a falta de precisão na preparação das concentrações, poderia resultar em um coeficiente linear inferior não aplicável.

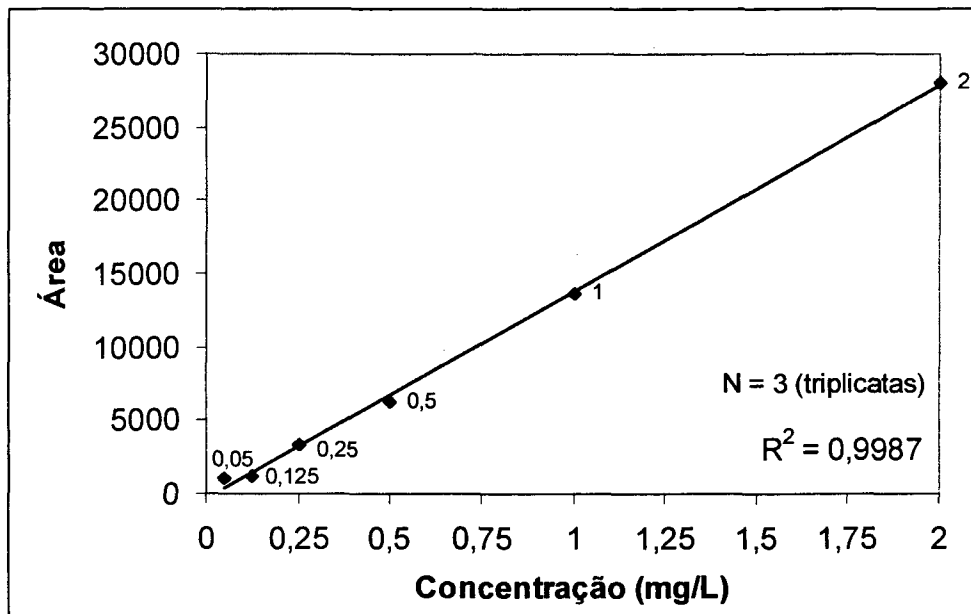


FIGURA 26 – CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA DO CARBOFURAN.

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN

Para determinar a eficiência da recuperação do Carbofuran nos procedimentos de extração, foram preparadas algumas amostras fortificadas com o carbamato em estudo, conforme exige a metodologia 531.1 da U.S. EPA (1989). As amostras foram fortificadas com a solução padrão de Carbofuran e analisadas, após a extração, em CLAE-UV com base nas comparações das áreas dos picos obtidos e dos picos da curva de calibração externa.

Os resultados obtidos estão mostrados nas tabelas 9, 10 e 11, seguidos pela representação dos cromatogramas de recuperação (cromatograma das amostras destacadas em vermelho nas tabelas).

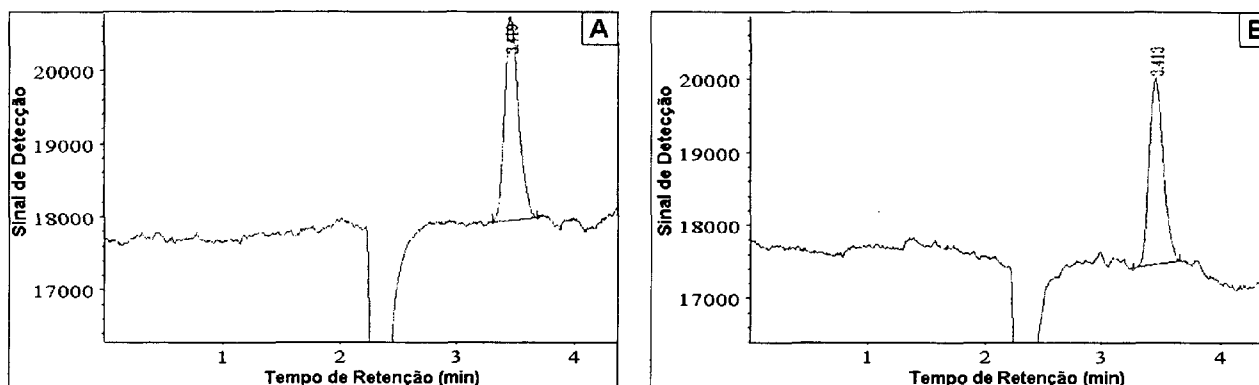
#### 4.2.1. EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO PELAS MINICOLUNAS C-18

O procedimento de análise para a determinação da eficiência de recuperação do Carbofuran após a eluição pelas minicolunas C-18, consistiu na passagem direta da amostra de água ultra pura e a posterior eluição com metanol (tabela 8).

TABELA 8 – PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTROLE DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN EM ÁGUA. ELUIÇÃO COM 5 ML DE METANOL EM MINICOLUNAS C-18.

Volume da Amostra (mL)	Fortificação (mg/L)	Recuperação (%)
5	1	93,54 <sup>a</sup>
5	1	92,21
5	1	89,48
5	1	87,96
5	1	94,35

<sup>a</sup> Resultado demonstrado pelo cromatograma ilustrado na figura 27 B.



A = 1 mg/L (curva de calibração); B = 1 mg/L (amostra de água fortificada).

FIGURA 27 – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA LÍQUIDA (ÁGUA ULTRA PURA) FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN PELA MINICOLUNA C-18.

Os resultados apresentaram uma recuperação elevada do composto Carbofuran, com uma média de 91,51%. Entretanto, melhores resultados foram obtidos por BAILEY *et al.* (1996), que utilizou 6 mL de metanol para a extração do Carbofuran de

amostras aquosas e obteve uma média total de recuperação de 95%. De acordo com este mesmo autor, os primeiros 2 mL de metanol eluíram cerca de 90% do Carbofuran, enquanto que os outros 5% foram obtidos gradualmente nos 4 mL restantes.

#### 4.2.2. EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS BRANCO FORTIFICADAS

As amostras branco fortificadas ou “Laboratory Fortified Blank (LFB)” são requisitos necessários para o controle de qualidade das análises. Segundo a metodologia 531.1 da U. S. EPA (1989), estas amostras têm o objetivo principal de determinar se a técnica utilizada permite uma medição acurada e precisa nos limites de detecção previamente estabelecidos.

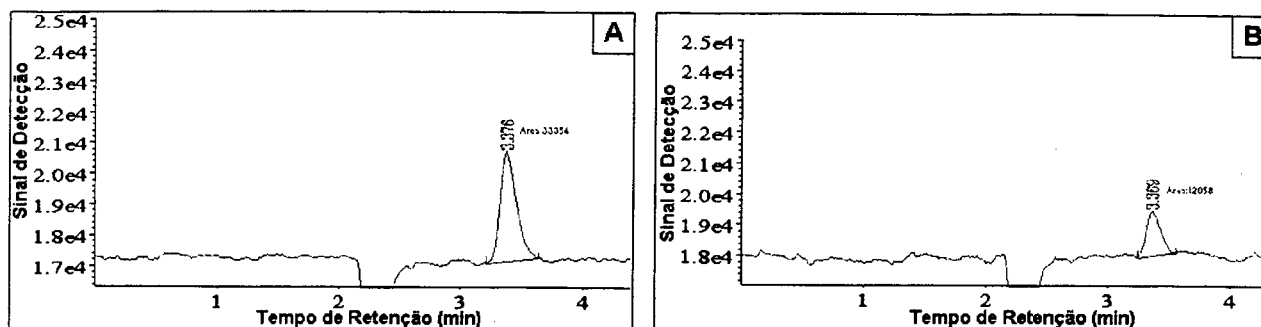
As amostras seguiram os procedimentos das metodologias de extração de tecidos I e II (MET I e MET II), porém, sem a presença do tecido biológico e, portanto, sem a necessidade dos procedimentos de homogeneização, centrifugação e sonificação. Os resultados mostraram uma maior eficiência de extração com a MET II do que com a MET I (tabela 9).

TABELA 9 – PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTROLE DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN EM MET I E MET II. ELUIÇÃO COM 5 mL DE METANOL EM MINICOLUNAS C18.

Volume de Amostra (mL)		Fortificação (mg/L)		Recuperação (%)	
MET I	MET II	MET I	MET II	MET I	MET II
5	5	1	1	36,15 <sup>a</sup>	72,36 <sup>b</sup>
5	5	1	1	42,91	71,68
5	5	1	1	51,46	83,72
5	5	1	1	35,21	77,52
5	5	1	1	54,96	84,10
5	5	1	1	47,35	84,23

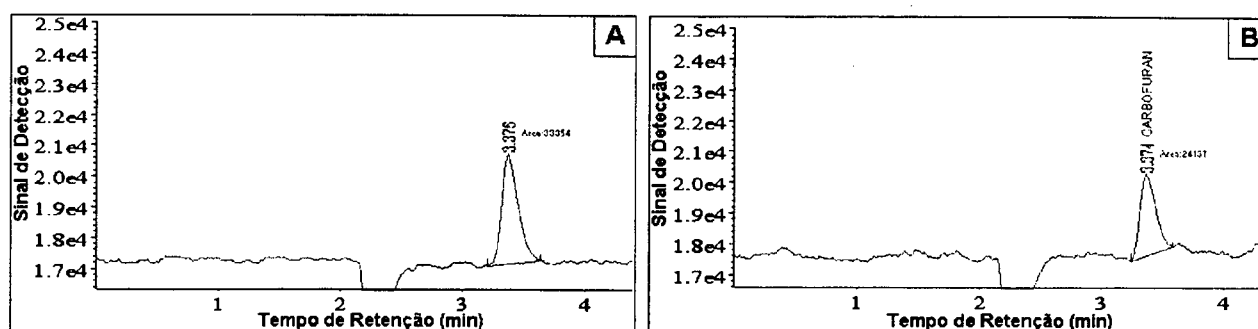
<sup>a</sup> Resultado demonstrado pelo cromatograma ilustrado na figura 28 B.

<sup>b</sup> Resultado demonstrado pelo cromatograma ilustrado na figura 29 B.



A = 1 mg/L (curva de calibração); B = 1 mg/L (amostra branco da MET I fortificada).

FIGURA 28 – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA BRANCO DA MET I (LFB I) FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET I.



A = 1 mg/L (curva de calibração); B = 1 mg/L (amostra branco da MET II fortificada).

FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA BRANCO DA MET II (LFB II) FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET II.

Sabe-se que um processo com muitas etapas implica na perda de resíduos devido à grande quantidade de vidraria e objetos que entram em contato com a amostra. Desse modo, o procedimento da MET I, que requer menos etapas que a MET II, deveria apresentar uma maior eficiência de recuperação do Carbofuran. O MET I apresentou uma média de recuperação equivalente a 44,67%, enquanto que a média obtida pela MET II foi de 78,94%. Esta contradição pode ser explicada pelo fato de que o éter, utilizado na MET II, segundo BROWN *et al.* (1996), é o solvente mais conveniente para a extração de tecidos contaminados por agrotóxicos devido às suas propriedades físico-químicas. A eficiência de extração do Carbofuran pelo solvente orgânico éter pode ser definida pela elevada volatilidade (p.e. 34,5 °C). Esta propriedade torna o

processo de evaporação, no evaporador rotatório, rápido e sem a necessidade de temperaturas elevadas, propiciando pouca instabilidade do composto termolábil Carbofuran.

A acetonitrila, solvente utilizado para a homogeneização e extração dos tecidos (MET I), apresenta ponto de ebulição em torno de 80 °C. Para tanto, foi aplicada uma temperatura em torno de 100 °C para a sua total evaporação, podendo ter influenciado na estrutura do Carbofuran, visto que é um composto termicamente instável. Além disso, uma ineficiente extração com acetonitrila pode ter ocorrido no procedimento de evaporação da amostra. Esta, não foi completamente evaporada devido à provável presença de água, definida pelo tempo gasto neste procedimento. A redissolução desta pequena alíquota restante do processo de evaporação em água ultra pura e a passagem desta na minicoluna C-18, pode ter propiciado a perda de uma porcentagem do Carbofuran. Esta perda pode ter ocorrido devido à presença de uma pequena fração de acetonitrila que pode ter causado a eluição e a conseqüente perda do Carbofuran após a passagem na minicoluna.

#### 4.2.3. EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS DE TECIDO FORTIFICADAS

As amostras de tecido fortificadas, também denominadas "Laboratory Fortified Sample Matrix (LFM)", foram utilizadas para determinar a eficiência de extração do Carbofuran a partir de tecidos de peixes. As amostras foram fortificadas com a adição das mesmas concentrações utilizadas nas amostras branco na solução homogeneizadora. Os resultados obtidos, em ambas as metodologias, demonstraram um baixo percentual de recuperação do composto Carbofuran, como destacado na tabela 10. Estes também mostraram uma eficiência um pouco melhor com o procedimento da MET II, que utiliza a solução tampão para a homogeneização do tecido, e o éter, para a extração do Carbofuran.



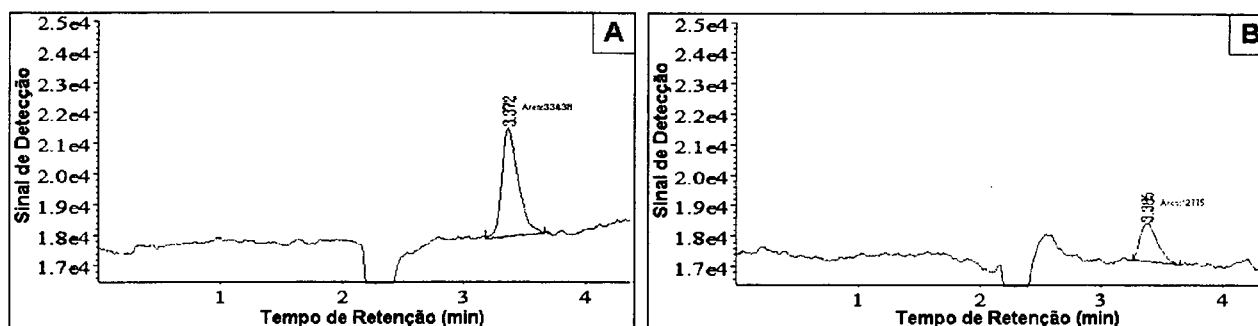
TABELA 10 – PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DO CARBOFURAN UTILIZANDO AMOSTRAS BIOLÓGICAS FORTIFICADAS (LFM). ELUIÇÃO COM 5 ML DE METANOL EM MINICOLUNAS C-18.

Volume de Amostra* (mL)		Fortificação (mg/L)		Recuperação (%)	
MET I	MET II	MET I	MET II	MET I	MET II
2,996	1,670	1	1	38,21 <sup>a</sup>	37,54 <sup>b</sup>
3,410	1,810	1	1	36,25	37,25
2,290	1,810	1	1	24,87	29,21
3,426	1,892	1	1	34,78	27,64
2,246	1,498	1	1	21,57	36,67
2,882	1,786	1	1	29,48	28,32

\* Volume da amostra no início do procedimento de extração.

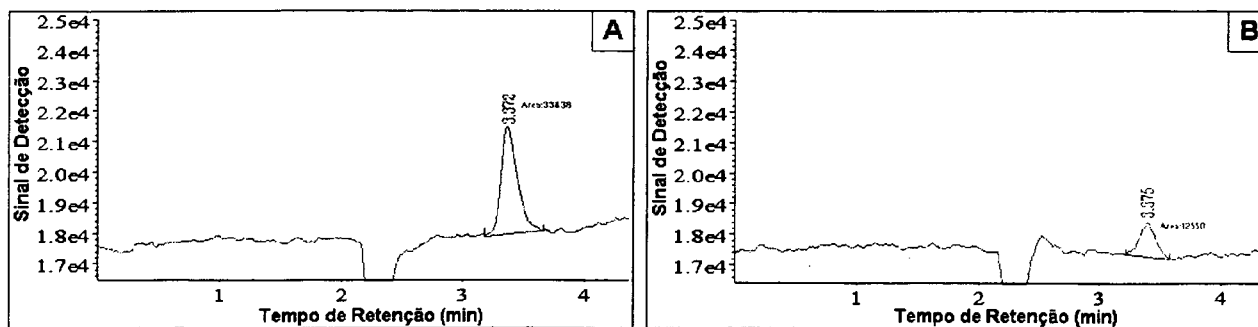
<sup>a</sup> Resultado demonstrado pelo cromatograma ilustrado na figura 30 B.

<sup>b</sup> Resultado demonstrado pelo cromatograma ilustrado na figura 31 B.



A = 1 mg/L (curva de calibração); B = 1 mg/L (amostra de tecido da MET I fortificada).

FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA DE TECIDO DA MET I FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET I.



A = 1 mg/L (curva de calibração); B = 1 mg/L (amostra de tecido da MET II fortificada).

FIGURA 31 – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 MG/L) E DA AMOSTRA DE TECIDO DA MET II FORTIFICADA COM 1 MG/L. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DO CARBOFURAN NO PROCEDIMENTO DE MET II.

A baixa eficiência de extração do Carbofuran com as amostras de tecido fortificadas, pode ter ocorrido devido as atividades químicas do Carbofuran. Desse modo, a degradação do Carbofuran, ao longo do experimento, contribuiu para a baixa recuperação deste em ambas as metodologias de extração.

De acordo com a U. S. EPA (1995), o monitoramento e a análise de agrotóxicos em peixes é recomendado, principalmente, para compostos que atuam sobre a ecologia da população, bem como o ecossistema e também, sobre a saúde humana. Os critérios para a seleção destes agrotóxicos estão destacados em quatro pontos relevantes: toxicidade oral (Classificação I e II da DL<sub>50</sub> para animais de laboratório – I equivale a concentrações de 0-50 mg/kg e, II equivale a concentrações de 50-500 mg/L); meia-vida de 30 dias ou mais; e fator de bioconcentração (FBC) acima de 300. O tempo de meia-vida e o fator de bioconcentração de um composto químico são propriedades indispensáveis para a avaliação e a quantificação deste em uma amostra biológica, pois permitem uma análise eficiente sem que ocorra a degradação do composto ao longo do experimento.

O Carbofuran, apesar de apresentar uma toxicidade de classificação I, não propicia uma análise eficiente, visto que o seu FBC corresponde a 9, sendo rapidamente degradado ou expelido pelo organismo (EXTOXNET, 1998). Em peixes da espécie *Heteropneustes fossilis*, o Carbofuran é bioacumulado por um curto espaço de tempo, sendo rapidamente excretado sem que ocorra a permanência deste composto ou de produtos derivados (KALE *et al.*, 1996). MOSTAFA *et al.* (1992), em estudos com mamíferos roedores, determinou que 46% do Carbofuran é eliminado via CO<sub>2</sub> e urina, 25% é retido nos tecidos por pouco tempo e o restante é degradado em metabólitos, encontrados na urina.

Os resultados obtidos nos cromatogramas, como representado nas figuras 30 e 31, apresentaram sinais de detecção anterior ao Carbofuran. Estes sinais foram considerados como possíveis metabólitos, visto que o Carbofuran é facilmente metabolizado em tecidos animais. Sendo assim, foram injetadas amostras padrões de dois dos três principais metabólitos encontrados em tecidos animais: 3-hidroxicarbofuran e 3-cetocarbofuran (figura 32). Estas, foram preparadas a partir de soluções concentradas (100 ppm) em acetonitrila, as quais foram diluídas para a

obtenção de 50 ppm e evaporadas para a redissolução em metanol – solvente utilizado para a preparação da amostra padrão do Carbofuran e demais carbamatos.

O tempo de retenção do composto 3-hidroxicarbofuran obtido, em torno de 2,5 minutos, coincidiu com o tempo de retenção dos picos detectados nos cromatogramas das amostras LFM I e II. Com isso, é provável que estes sinais de detecção possam ter sido causados pela presença deste metabólito na amostra. Porém, a hipótese de que este não seja o pico do 3-hidroxicarbofuran também deve ser válida, visto que não foi analisado o tempo de retenção do terceiro metabólito (3-cetocarbofuran fenol). A identificação deste pico como sendo um interferente de origem biológica é desprezada pois, ao longo de todo o experimento, com as diversas amostras biológicas, não foi detectado nenhum pico que coincidissem neste tempo de retenção.

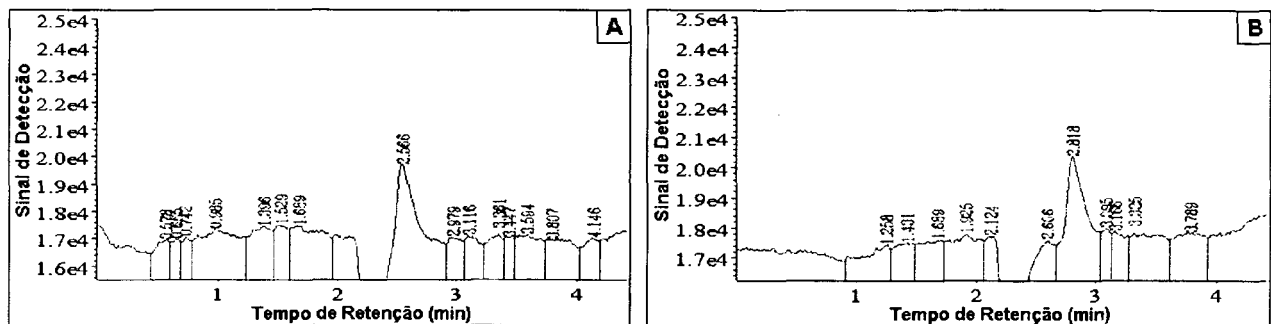
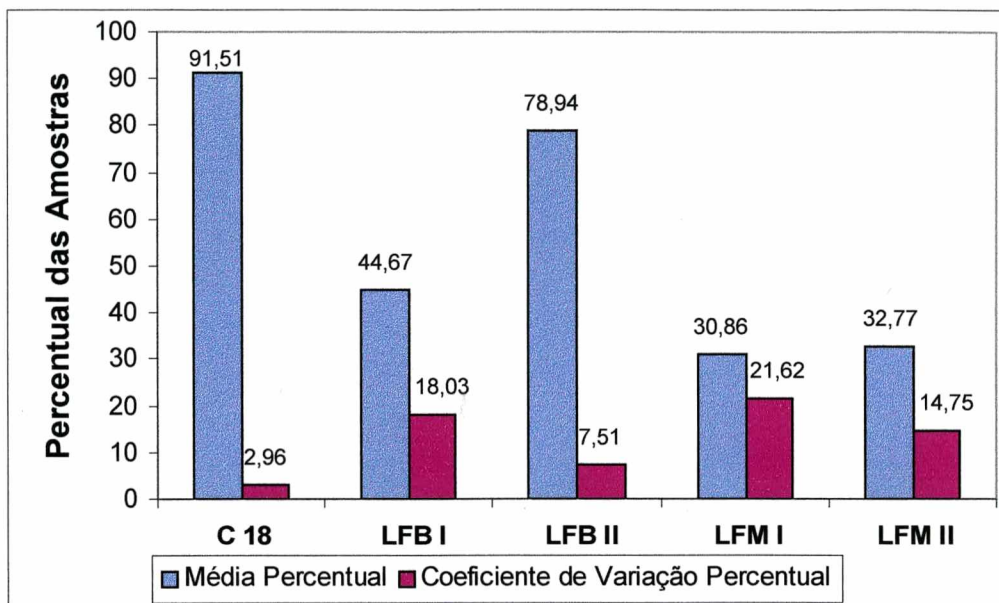


FIGURA 32 – CROMATOGRAMAS DOS METABÓLITOS 3-HIDROXICARBOFURAN (A) E 3-CETOCARBOFURAN (B) EM CONCENTRAÇÕES DE 2 MG/L.

Os resultados da eficiência de extração dos procedimentos anteriormente descritos, estão representados no gráfico a seguir (figura 33). Os coeficientes de variação (CV) também estão representados. O grau de confiabilidade do CV não deve ser maior do que 20%, o que resultaria em uma metodologia não exequível. A eficiência de extração da LFM I com a utilização do solvente acetonitrila, apresentou um CV equivalente a 21,62%, o qual demonstra um grau de confiabilidade baixo.



C 18: eficiência de extração da água; LFB I: eficiência de extração das amostras branco fortificadas na MET I; LFB II: eficiência de extração das amostras branco fortificadas na MET II; LFM I: eficiência de extração das amostras de tecido fortificadas na MET I; LFM II: eficiência de extração das amostras de tecido fortificadas na MET II.

FIGURA 33 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO NOS DIFERENTES PROCEDIMENTOS AVALIADOS E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO.

### 4.3. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS EM LABORATÓRIO

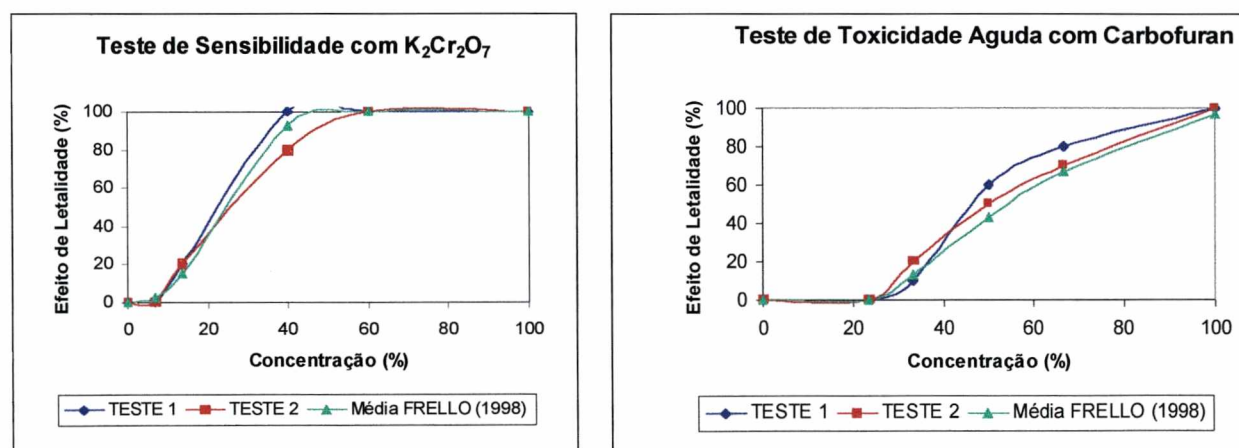
#### 4.3.1. TESTES DE SENSIBILIDADE E TOXICIDADE AGUDA

Os testes com dicromato de potássio e Carbofuran foram realizados de acordo com as condições e as concentrações determinadas por FRELLO (1998). Contudo, os períodos de observação para o teste de toxicidade aguda foi modificado, apresentando um horário a mais para a observação. Os resultados das observações para a determinação do comportamento e contagem dos peixes mortos, estão destacados no anexo 8.

Os parâmetros físico-químicos da água de diluição de ambos os testes, previamente medidos, estão demonstrados em anexo (anexos 12, 13, 14), bem como

os parâmetros biométricos dos peixes (anexo 11). Entretanto, com relação aos parâmetros biológicos, não foi realizada uma biometria completa dos peixes utilizados para o teste de sensibilidade com dicromato de potássio. Houve apenas uma seleção de organismos com aproximadamente o mesmo tamanho, sendo que alguns deles foram pesados para estimar o valor do peso médio total obtido em cada aquário, não ultrapassando o valor recomendado pela CETESB (1987).

Os resultados de ambos os testes foram equivalentes aos obtidos por FRELLO (1998), exceto alguns testes que apresentaram resultados não confiáveis, sendo posteriormente descartados e substituídos por outros lotes de peixes. Foram realizados somente dois ensaios válidos para a análise, pois os resultados foram complementados e, conseqüentemente, melhorados com as médias dos resultados obtidos por FRELLO (1998), como demonstram os gráficos e a tabela a seguir.



\* No teste de sensibilidade, a concentração 100% equivale a 800 mg/L, ou seja, a maior concentração aplicada. No teste de toxicidade aguda, o princípio é o mesmo, onde 100% equivale à maior concentração utilizada: 300  $\mu$ g/L.

FIGURA 34 – EFEITO DA  $CL_{50}$  SOBRE OS REATIVOS BIOLÓGICOS DOS TESTES DE SENSIBILIDADE E TOXICIDADE AGUDA. COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS POR FRELLO (1998).

TABELA 11 – CL<sub>50</sub> EM µg/L CALCULADA NO PROGRAMA “TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD FOR ESTIMATING MEDIAN LETHAL CONCENTRATIONS IN TOXICITY BIOASSAYS” PARA *POECILIA RETICULATA* NOS TESTES DE SENSIBILIDADE E TOXICIDADE AGUDA.

	Teste de Sensibilidade (24 horas) (mg/L)	Teste de Toxicidade Aguda (48 horas) (µg/L)
TESTE 1	157,61	145,15
TESTE 2	182,62	149,75
<b>Média</b>	<b>170,12</b>	<b>147,45</b>

\* As médias dos testes de sensibilidade e toxicidade aguda obtidas por FRELLO (1998), apresentaram resultados próximos aos obtidos nos testes do presente trabalho. FRELLO (1998) obteve a média de 170,48 mg/L para o teste de sensibilidade, e 153,27 µg/L para o teste de toxicidade aguda.

#### 4.4.2. TESTE DE BIOACUMULAÇÃO

Os testes de bioacumulação com Carbofuran foram realizados para determinar a ocorrência do evento de absorção deste composto em peixes da espécie *Poecilia reticulata*. As concentrações estabelecidas (110, 130 e 200 µg/L) apresentavam abaixo e acima da CL<sub>50</sub>, porém, detectáveis no método da CLAE-UV. Estas concentrações foram utilizadas com o objetivo de manter uma baixa ou uma elevada taxa de mortalidade dos reativos biológicos após 48 horas de exposição ao Carbofuran.

O Carbofuran, quando liberado na água, não é volatilizado, adsorvido em partículas de suspensão ou sedimentada, ou bioacumulado em animais aquáticos e, por isso, permanece na água (EXTOXNET, 1998). Apesar disso, o Carbofuran foi analisado nos reativos biológicos de todas as diferentes concentrações, não apresentando nenhum sinal de detecção deste composto.

A frequência da hidrólise do Carbofuran na água varia de acordo com o seu tempo de meia-vida que, por sua vez, depende diretamente do pH do meio. Com base nisso, foram analisadas amostras de água dos aquários dos reativos biológicos expostos e, também, amostras de água de aquários controle – sem reativos biológicos. Os cromatogramas obtidos não apresentaram picos de retenção do Carbofuran e nem mesmo de seus dois produtos metabólicos analisados.

A ausência do Carbofuran nas análises realizadas em CLAE-UV pode ter sido causada pela hidrólise e fotólise do composto. O pH da água utilizado para o experimento de bioconcentração, apresentou um valor de 7,6. Sabe-se que a meia-vida do Carbofuran em ecossistemas aquáticos com pH 6,0; 7,0 e 8,0 é de 690; 8,2 e 1 semanas, respectivamente (EXTOXNET, 1998). Sendo assim, este composto não poderia ter sido degradado pela hidrólise em apenas 48 horas.

A fotólise do Carbofuran pode ser inibida na presença de matéria orgânica em suspensão em águas naturais, como rios e lagos (BACHMAN & PATTERSON, 1999). Contudo, à presença da luz solar, o Carbofuran apresenta um tempo de meia-vida muito curto, variando de 4 a 12,5 dias, sendo que seu principal produto de degradação fotoquímica está representado pelo composto 3-hidroxi-7-fenol (CHIRON *et al.*, 1996). Sendo assim, mesmo com a ausência de matéria orgânica em suspensão, a degradação total do composto químico em estudo não poderia ter ocorrido em apenas 2 dias com a presença da luz.

A degradação do Carbofuran ao longo de 48 horas nos experimentos com os reativos biológicos, pode ter ocorrido devido às atividades metabólicas biológicas sobre o composto, durante o ensaio toxicológico. Entretanto, os experimentos sem reativos biológicos, também não apresentaram evidências do composto Carbofuran. Pode ser que a aeração tenha sido um fator contribuinte para a decomposição do composto químico.

Todos estes aspectos de decomposição do Carbofuran podem ter contribuído para a degradação do composto em uma quantidade suficiente para não ser detectado na metodologia utilizada (CLAE-UV).

#### **4.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Os resultados das análises dos cromatogramas das amostras de água do Rio Cubatão Sul e dos peixes, não registraram picos de detecção de Carbofuran. Foram registrados outros picos em tempos de retenção diferentes nas amostras de água, os quais foram comparados com amostras padrão de outros compostos carbamatos. Para

tanto, foram injetadas concentrações equivalentes a 2 mg/L dos carbamatos: metomil, carbaril, aldicarb e metiocarb, preparados exatamente como o Carbofuran. Nenhum dos tempos de retenção destes carbamatos coincidiu com o obtido na amostra de água do Rio Cubatão Sul. Os picos de retenção obtidos podem ter sido provocados pela presença de algum interferente orgânico, proveniente da amostra do Rio, que foi eluído juntamente com o Carbofuran, atravessando a minicoluna C-18.

A ausência do Carbofuran nas amostras ambientais, entretanto, pode ter sido causada por causa da época em que foram coletadas e que não havia sido aplicado este inseticida na região de estudo. Apesar da metodologia de extração do Carbofuran para peixes ser pouco eficiente, a análise das amostras líquidas seria suficiente para a detecção e a quantificação deste no meio ambiente, como já foi observada em pesquisas anteriores (anexo 16). Com isso, seria possível estimar o risco de toxicidade deste composto sobre as populações aquáticas, bem como todo o ecossistema.



## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSÕES

- A  $CL_{50}$  dos testes de Sensibilidade e Toxicidade Aguda apresentaram valores próximos aos obtidos por FRELLO (1998), o que permitiu a utilização dos lotes de peixes para a realização do teste de bioacumulação.
- O teste de bioacumulação foi realizado com o objetivo de avaliar a possibilidade da absorção e permanência do composto Carbofuran no organismo animal, através do teste com os peixes da espécie *Poecilia reticulata*. A ausência do Carbofuran, a partir da análise dos cromatogramas, está de acordo com o fato deste composto possuir um baixo Fator de Bioconcentração (FBC) que este composto apresenta.
- Os processos de fotodecomposição, biodegradação, hidrólise e aeração, como observado no presente trabalho, são fatores que contribuem para a degradação do composto Carbofuran.
- A análise dos cromatogramas, em geral, mostraram poucos interferentes co-extrativos, o que demonstra a eficiência da eliminação destes interferentes após o processo de Extração de Fase Sólida ("SPE – Solid Phase Extraction"), utilizando a minicoluna C18.
- O solvente orgânico acetonitrila, utilizado para a extração do Carbofuran de tecidos de peixes, mostrou uma baixa eficiência de recuperação do inseticida.

- A análise de compostos carbamatos a partir da técnica de detecção CLAE-UV, aplicando-se o comprimento de onda de 190 nm, indica um grande potencial da metodologia empregada para a análise destes resíduos em amostras ambientais.
- O fato de não terem sido detectados compostos carbamatos no Rio Cubatão Sul, não significa que este não esteja contaminado por outros agrotóxicos como organofosforados e organoclorados, também utilizados na região. A água foi analisada somente para compostos carbamatos, e as amostras representam apenas um dado de um dia de coleta.

## CAPÍTULO VI

### 6. RECOMENDAÇÕES

- A extração de compostos com baixo FBC em tecidos animais, como o Carbofuran, é um procedimento que requer um tempo mínimo para a manipulação do material, devido às atividades metabólicas de degradação que ocorrem sobre o composto químico. Com isso, recomenda-se este procedimento de extração em compostos com elevado FBC.
- Para futuros experimentos com peixes expostos ao Carbofuran, seria adequado efetuar experimentos para comparar a degradação do composto em aquários aerados e não aerados. Os resultados poderiam demonstrar se este fator influencia ou não no processo de degradação do Carbofuran. Para tanto, as análises devem ser efetuadas com detecção por fluorescência, para permitir uma análise mais acurada. Em resultados positivos, na qual a aeração poderia efetuar a degradação do composto, esse procedimento poderia ser recomendado no tratamento de águas contaminadas por este tipo de agrotóxico.
- Novos testes de extração devem ser efetuados com ambos os solventes utilizados no presente trabalho (éter e acetonitrila), visto que a eficiência de extração pode ter sido comprometida por erros metodológicos. Deve ser enfatizada a metodologia com a utilização de acetonitrila para a extração, visto que é um solvente orgânico muito indicado em trabalhos científicos.
- A derivatização e detecção por fluorescência são metodologias de análise mais sensíveis do que a detecção por UV. Entretanto, a quantificação e detecção por CLAE-UV permite a determinação de compostos carbamatos na faixa de ppb,

sendo uma metodologia adequada para análises de monitoramento da qualidade ambiental em regiões agrícolas. Portanto, pode ser recomendada a utilização da CLAE-UV em amostras ambientais.

- A substituição da técnica de análise de tecidos biológicos contaminados por compostos químicos com baixo FBC, é recomendada. Outras técnicas de detecção para este tipo de composto, como análises enzimáticas e histológicas, podem oferecer vantagens sobre a CLAE-UV. As análises desses parâmetros permitiriam uma rápida detecção de compostos tóxicos, além de determinar a magnitude da contaminação e o grau de severidade dos efeitos causados sobre o organismo e, conseqüentemente, sobre a população e o ecossistema.
- Para a efetivação de uma atividade de monitoramento da qualidade do meio ambiente, devem ser realizadas coletas ao longo de um ano, além do acompanhamento do tipo de agrotóxico utilizado nas lavouras, a quantidade, as formas e as épocas de sua aplicação. Sendo assim, recomenda-se coletas mensais para a obtenção de dados confiáveis e aplicáveis em uma avaliação do meio ambiente.

## ANEXOS

### ANEXOS SOBRE AS SOLUÇÕES UTILIZADAS

#### ANEXO 1 – ÁGUA DE DILUIÇÃO

Para o preparo da água de diluição, utilizar água destilada ou deionizada, com condutividade menor que 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

TABELA 12 – QUANTIDADES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO.

Reagentes	Quantidade
Cloreto de potássio (KCl)	0,04 g
Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )	0,96 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ )	1,22 g
Sulfato de Cálcio ( $\text{CaSO}_4$ )	0,60 g
Água (destilada ou deionizada)	20,00 L

A água de diluição preparada recebe aeração por 24 horas, permitindo a solubilização e a manutenção da saturação de oxigênio dissolvido e pH.

A água de diluição deve apresentar os seguintes parâmetros:

- pH:  $7,4 \pm 0,2$
- dureza total: 40 a 48 mg/L
- condutividade:  $\cong 160 \mu\text{S}/\text{cm}$

Antes de qualquer uso, são registrados os parâmetros acima, além de medir o oxigênio dissolvido. O pH pode ser ajustado ao valor requerido com soluções de ácido clorídrico, HCl 1 mol/L ou, hidróxido de sódio, NaOH 1 mol/L. Após o acerto de pH, a água não deve ser mais aerada. Se a dureza estiver fora da

faixa de 40 a 48 mg/L em  $\text{CaCO}_3$ , esta água deve ser desprezada e um novo lote deve ser preparado.

## ANEXO 2 – SOLUÇÃO TAMPÃO

A solução tampão utilizada na Metodologia de Extração de Tecido II (MET II), foi utilizada para impedir as mudanças bruscas do pH que eventualmente poderiam ocorrer durante a manipulação do tecido. A solução tampão TRIS é constituída pelas seguintes concentrações:

TABELA 13 – REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DO TAMPÃO TRIS.

Reagentes	Quantidade (g)
Cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M	5,844
EDTA 20 mM	7,444
TRIS 50 mM	6,057

As concentrações acima referem-se à um volume de 1000 mL. Os volumes preparados para a homogeneização dos tecidos variaram de acordo com a quantidade de tecidos utilizados para a análise.

O pH da solução, para apresentar o valor de 8,0, foi ajustado com soluções de ácido clorídrico, HCl 1 mol/L ou, hidróxido de sódio, NaOH 1 mol/L.

## ANEXO 3 – SOLUÇÃO DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ PARA TESTE DE SENSIBILIDADE

O dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), substância de referência utilizada nos testes de sensibilidade, foi preparado em uma solução-mãe com uma concentração de 2 g/L.

Cada um dos cinco aquários, contendo 1000 mL de água de diluição, recebeu um volume da solução-mãe equivalente à concentração a ser obtida:

TABELA 14 – VOLUMES DA SOLUÇÃO-MÃE DE  $K_2Cr_2O_7$  UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ESTABELECIDAS PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE.

Concentração da solução no aquário (mg/L)	Volume da solução-mãe de $K_2Cr_2O_7$ (2 g/L)	Volume de água de diluição (mL)
56	28 mL	972
110	55 mL	945
320	160 mL	840
480	240 mL	760
800	400 mL	600

#### ANEXO 4 – SOLUÇÃO DE FURADAN PARA TESTES

Para os testes de toxicidade aguda e bioacumulação, foi preparada uma solução-mãe de Carbofuran granular com uma concentração de 100 mg/L. Sabe-se que o Furadan apresenta somente 5% do produto ativo Carbofuran e, portanto, a concentração foi calculada e preparada em um béquer de 50 mL com:

- 50 mL de álcool etílico
- 0,2 g de Furadan

O álcool etílico foi utilizado para facilitar a dessorção do agente ativo Carbofuran presente nos grânulos do inseticida comercial. Os grânulos foram triturados com o auxílio de um bastão de vidro com o objetivo de eliminação destes e a completa homogeneização da solução. Foi possível eliminar os grânulos, entretanto, permaneceram muitas partículas menores na solução.

TABELA 15 – VOLUMES DA SOLUÇÃO-MÃE DE FURADAN, UTILIZADOS NOS AQUÁRIOS CONTENDO 1 L DE ÁGUA DE DILUIÇÃO, PARA OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PREESTABELECIDAS.

Teste de Toxicidade Aguda		Teste de Bioacumulação	
Concentrações ( $\mu\text{g/L}$ )	Volume da solução-mãe (mL)	Concentrações ( $\mu\text{g/L}$ )	Volume da solução-mãe (mL)
70	0,7	110	1,1
100	1,0	130	1,3
150	1,5	200	2,0
200	2,0		
300	3,0		

A solução-mãe de 50 mL permaneceu sob constante agitação (agitador magnético) para a retirada de uma solução homogênea. Os volumes da solução-mãe foram retirados com pipetas volumétricas de 1 e 2 mL. Antes de serem adicionados aos aquários, para a obtenção de determinadas concentrações, foram retirados os mesmos volumes da água de diluição presente nos aquários.

Apesar dos volumes utilizados representarem uma alíquota muito pequena, essa correção foi estabelecida para evitar erros maiores para obtenção das concentrações determinadas.

#### ANEXO 5 – CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA

A curva de calibração externa, utilizada para quantificar o Carbofuran e alguns de seus metabólitos das amostras analisadas, foi preparada segundo as metodologias da U.S. EPA (1989, 1994 e 1996).

O Carbofuran, o 3-Hidroxicarbofuran e o 3-cetocarbofuran foram preparados em uma solução de concentração igual a 50 mg/L. Para tanto, retirou-se uma pequena porção de 0,025 g do carbamato que foi adicionado em 25 mL de metanol, obtendo-se uma concentração de 1000 mg/L ou 1000 ppm. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 2,5 mL, a qual foi diluída em 50 mL de metanol, obtendo-se a concentração de 50 mg/L ou 50 ppm.

Para a curva de calibração externa, definiram-se as seguintes concentrações: 0,050; 0,125; 0,250; 0,500; 1,000 e 2,000 mg/L.

TABELA 16 – PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA EM 5 ML.

Concentração da solução-mãe (mg/L) (C <sub>1</sub> )	Concentração da curva (mg/L) (C <sub>2</sub> )	Volume adicionado (μL) (V <sub>1</sub> ) ( $V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$ )	Volume total (mL) (V <sub>2</sub> )
50	0,050	5,0	5,0
50	0,125	12,5	5,0
50	0,250	25,0	5,0
50	0,500	50,0	5,0
50	1,000	100,0	5,0
50	2,000	200,0	5,0



## ANEXOS SOBRE AS OBSERVAÇÕES REALIZADAS EM CAMPO

### ANEXO 6 – OBSERVAÇÕES REALIZADAS NOS PONTOS DE COLETA DO RIO CUBATÃO SUL

Os pontos de coleta estabelecidos abrangem uma grande extensão ao longo do Rio Cubatão Sul. O primeiro ponto estabelecido (ponto 1) localiza-se próximo ao Hotel Fazenda Jomar, situado no interior do município de Santo Amaro da Imperatriz. O segundo, o terceiro e o quarto ponto de coleta foram realizados no município de Águas Mornas. Também foi realizada uma coleta de peixes em uma piscicultura particular localizada em Santo Amaro da Imperatriz, com o objetivo de obtenção de amostras biológicas não contaminadas por agrotóxicos.

A coleta de água e dos peixes foi realizada no segundo dia do mês de dezembro, com variações bruscas de condições climáticas, com repentinas precipitações, ventos e sol em todo o período de coleta.

TABELA 17 – DADOS SOBRE AS OBSERVAÇÕES REALIZADAS EM CAMPO.

Pontos de Coleta	Ponto Controle	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Hora	07:20	08:20	09:15	10:00	11:00
T °C do ar	23,0	24,0	27,0	26,0	25,5
T °C da água	20,7	22,8	23,8	23,7	22,3
PH	6,91	6,87	7,02	7,25	7,26
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,27	4,85	5,85	5,39	5,45
Salinidade*	0	2	0	0	0
Peixes coletados (número)	Cará (7)	Cará (5); Biru (2)	Cará (4); Dentudo (3)	Cará (4)	–

\* A salinidade foi medida devido à proximidade do primeiro ponto de coleta à foz do Rio Cubatão Sul.

## ANEXOS SOBRE AS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

### ANEXO 7 – TRATAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras dos peixes coletados no Rio Cubatão Sul, foram armazenadas conforme a metodologia estabelecida pela U.S. EPA (1995). O tempo máximo de armazenamento permitido para análise de vários compostos químicos e metais, estão definidos na tabela abaixo.

TABELA 18 – RECOMENDAÇÕES PARA ESTOCAGEM, PRESERVAÇÃO E TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE TECIDOS DE PEIXES, MOLUSCOS, CRUSTÁCEOS E TARTARUGAS PARA PROCEDIMENTO DE ANÁLISE EM LABORATÓRIO.

Composto	Matriz	Material para armazenamento	Estocagem	
			Preservação	Tempo de armazenamento
Mercúrio	Tecido (fatias e porções, homogenatos)	Plástico, vidro de borosilicato, quartzo, PTFE	Congelar a uma temperatura de <-20 °C	28 dias
Outros metais	Tecido (fatias e porções, homogenatos)	Plástico, vidro de borosilicato, quartzo, PTFE	Congelar a uma temperatura de <-20 °C	6 meses
Orgânicos	Tecido (fatias e porções, homogenatos)	Vidro de borosilicato, PTFE, quartzo, e folha de alumínio	Congelar a uma temperatura de <-20 °C	1 ano
Metais e orgânicos	Tecido (fatias e porções, homogenatos)	Vidro de borosilicato, quartzo, PTFE	Congelar a uma temperatura de <-20 °C	28 dias (para o mercúrio); 6 meses (para outros metais); e 1 ano (para orgânicos)
Lipídios	Tecido (fatias e porções, homogenatos)	Plástico, vidro de borosilicato, quartzo, PTFE	Congelar a uma temperatura de <-20 °C	1 ano

PTFE = Politetrafluoroetileno (Teflon).

## ANEXO 8 – OBSERVAÇÕES E MORTALIDADE DE PEIXES NOS TESTES TOXICOLÓGICOS

TABELA 19 – NÚMERO DE PEIXES MORTOS NOS TESTES DE SENSIBILIDADE COM DICROMATO DE POTÁSSIO APÓS UM PERÍODO DE 24 HORAS (N = 5).

Concentração (mg/L)	Número de peixes mortos (24 horas)	
	TESTE 1	TESTE 2
0	0	0
56	0	0
110	1	1
320	5	4
480	5	5
800	5	5

TABELA 20 – NÚMERO DE PEIXES MORTOS NOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM CARBOFURAN APÓS UM PERÍODO DE 48 HORAS (N = 10).

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Número de peixes mortos (24 horas)	
	TESTE 1	TESTE 2
0	0	0
70	0	0
100	1	2
150	6	5
200	8	7
300	10	10

As observações realizadas ao longo de ambos os experimentos revelaram sintomas de toxicidade aguda, como movimentos irregulares e acelerados. Estes sintomas, provenientes de alterações neurológicas, resultaram na morte dos indivíduos. Além disso, foram observados nascimentos prematuros de alguns alevinos.

**ANEXO 9 - DADOS BIOMÉTRICOS DOS INDIVÍDUOS DE POECILIA RETICULATA UTILIZADOS PARA OS TESTES DE RECUPERAÇÃO**

Número de Identificação*	Peso (g)	Comprimento (cm)	Sexo	Volume da Solução (mL)
1 A	0,1498	1,9	F	2,996
2 A	0,1705	1,8	F	3,410
3 A	0,1145	1,7	F	2,290
4 A	0,1713	1,9	F	3,426
5 A	0,1123	1,7	F	2,246
6 A	0,1441	1,8	F	2,882
7 T	0,0836	1,7	F	1,670
8 T	0,0905	1,9	F	1,810
9 T	0,0915	1,5	F	1,810
10 T	0,0946	1,5	F	1,892
11 T	0,0749	1,5	F	1,498
12 T	0,0893	1,6	F	1,786

\* As letras identificam a solução utilizada para a homogeneização (A = acetona, T = tampão TRIS).

**ANEXO 10 – DADOS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES COLETADOS NO RIO CUBATÃO SUL**

Ponto Controle		Ponto 1			Ponto 2			Ponto 3			
Espécie	Peso (g)	Comp. (cm)	Espécie	Peso (g)	Comp. (cm)	Espécie	Peso (g)	Comp. (cm)	Espécie	Peso (g)	Comp. (cm)
G. b.	7,68	6,1	G. b.	13,39	7,3	O. j.	129,42	19,0	G. b.	17,33	7,6
G. b.	8,74	6,6	G. b.	15,09	8,6	O. j.	140,36	22,7	G. b.	24,73	9,7
G. b.	9,88	7,1	G. b.	12,93	8,2	O. j.	59,51	12,6	G. b.	17,26	7,0
G. b.	7,48	6,3	G. b.	14,48	8,0	G. b.	18,10	8,4	G. b.	23,41	9,3
G. b.	5,69	5,2	G. b.	22,23	9,7	G. b.	19,17	9,2			
G. b.	6,79	5,7	S. sp.	58,66	13,2	G. b.	13,13	6,9			
G. b.	6,55	5,4	S. sp.	63,99	14,7	G. b.	18,85	8,2			

G. b. = *Geophagus brasiliensis*; S. sp. = *Steindachnerina* sp.; O. j. = *Oligosarcus jenynsii*

**ANEXO 11 – DADOS BIOMÉTRICOS DA ESPÉCIE *POECILIA RETICULATA* PARA OS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA**

Concentração 70 µg/L		Concentração 100 µg/L		Concentração 150 µg/L		Concentração 200 µg/L		Concentração 300 µg/L						
Peso (g)	Comp. (cm)	Sexo	Peso (g)	Comp. (cm)	Sexo	Peso (g)	Comp. (cm)	Sexo	Peso (g)	Comp. (cm)	Sexo			
T	0,0931	F	0,0949	1,8	M	0,0822	1,50	M	0,0900	1,80	M	0,0943	1,60	F
E	0,0913	F	0,1096	1,7	M	0,0724	1,50	F	0,1092	1,75	M	0,0754	1,65	M
S 1	0,1045	M	0,0723	1,6	F	0,0716	1,60	M	0,0995	1,70	F	0,0677	1,50	F
T	0,0768	F	0,0889	1,7	M	0,0952	1,70	M	0,0771	1,65	M	0,0870	1,50	M
E	0,0967	M	0,1124	1,9	F	0,0458	1,30	M	0,1175	1,70	F	0,0915	1,60	F
T	0,1192	M	0,0856	1,6	M	0,0589	1,50	F	0,0960	1,70	F	0,0958	1,70	F
E	0,1628	F	0,0792	1,7	M	0,0896	1,70	F	0,0670	1,50	F	0,0637	1,40	M
S 2	0,1132	F	0,0947	1,8	F	0,0668	1,45	F	0,0884	1,70	M	0,0908	1,70	F
T	0,1203	F	0,0763	1,6	F	0,0703	1,45	F	0,0828	1,70	M	0,0613	1,50	M
E	0,0915	M	0,1045	1,8	F	0,0727	1,50	F	0,0564	1,50	F	0,1045	1,70	M

**ANEXOS SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS**

**ANEXO 12 – ANÁLISE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE**

Parâmetros	Teste de Sensibilidade	
	Teste 1	Teste 2
pH	7,56	7,42
Condutividade (µS/cm)	141,9	139,4
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,17	6,04
Dureza (mg/L em CaCO <sub>3</sub> )	41,30	40,18

### ANEXO 13 – PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

TABELA 21 – ANÁLISE DOS PARÂMETROS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 0 HORAS (INÍCIO DO TESTE).

	Teste 1						Teste 2					
	0	70	100	150	200	300	0	70	100	150	200	300
pH	7,62	7,54	7,56	7,48	7,55	7,53	7,59	7,62	7,61	7,50	7,41	7,45
Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	154,7	162,8	161,1	163,6	161,2	155,0	150,9	158,2	156,5	153,4	161,1	159,7
O. D. (mg/L)	6,05	5,93	5,93	6,26	6,41	6,17	8,27	7,44	7,81	7,78	7,42	7,64
T °C	19,9	19,7	19,6	19,4	19,3	19,4	18,7	18,8	18,8	18,7	18,8	18,7

TABELA 22 – ANÁLISE DOS PARÂMETROS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 24 HORAS.

	Teste 1						Teste 2					
	0	70	100	150	200	300	0	70	100	150	200	300
pH	7,82	7,81	7,81	7,81	7,81	7,79	7,81	7,72	7,74	7,75	7,75	7,73
Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	163,9	146,3	164,8	165,4	151,0	158,8	164,5	167,2	152,1	148,9	166,8	149,2
O. D. (mg/L)	6,96	5,80	6,11	6,28	6,44	6,17	6,43	6,37	6,20	6,30	6,28	6,57
T °C	20,0	19,9	19,7	19,6	19,6	19,4	18,4	18,4	18,3	18,3	18,3	18,4

TABELA 23 – ANÁLISE DOS PARÂMETROS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 48 HORAS.

	Teste 1						Teste 2					
	0	70	100	150	200	300	0	70	100	150	200	300
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
pH	7,83	7,81	7,83	7,83	7,81	7,81	7,82	7,73	7,74	7,74	7,76	7,73
Condutividade (µS/cm)	166,3	148,8	152,3	157,9	153,2	163,4	168,4	167,3	158,1	150,7	169,7	152,4
O. D. (mg/L)	6,85	6,17	6,05	6,13	6,24	5,91	6,63	6,92	6,38	6,47	6,03	6,15
T °C	19,9	19,6	19,4	19,1	19,3	19,2	18,9	18,0	17,9	18,2	18,2	18,4

**ANEXO 14 – PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO COM *POECILIA RETICULATA*.**

TABELA 24 – ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 0 HORAS (INÍCIO DO TESTE).

	Teste 1			Teste 2			Teste 3			Teste 4			Teste 5			
	0	110	130	200	110	130	200	110	130	200	110	130	200	110	130	200
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
O. D. (mg/L)	8,48	8,48	8,49	8,46	8,35	8,39	8,40	8,39	8,21	8,64	7,28	7,56	7,51	7,31	7,70	7,33
T °C	19,6	19,4	19,5	19,4	19,5	19,3	19,4	19,7	19,7	19,8	20,0	19,9	19,9	19,9	19,8	19,9

TABELA 25 – ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 24 HORAS.

	Teste 1			Teste 2			Teste 3			Teste 4			Teste 5			
	0	110	130	200	110	130	200	110	130	200	110	130	200	110	130	200
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
O. D. (mg/L)	7,03	6,05	6,18	7,18	6,51	6,74	6,24	5,79	5,99	7,16	6,84	6,36	6,07	6,01	6,10	6,10
T °C	18,6	18,3	18,2	18,2	18,1	18,3	18,3	18,6	18,6	18,5	18,9	18,9	19,0	18,9	19,0	19,0

TABELA 26 – ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO NO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DE 48 HORAS.

	Teste 1			Teste 2			Teste 3			Teste 4			Teste 5		
	0	110	200	110	130	200	110	130	200	110	130	200	110	130	200
µg/L	5,90	6,14	6,24	7,25	6,13	6,15	6,13	6,89	7,36	6,16	6,79	7,41	6,15	6,30	6,52
O. D. (mg/L)	18,6	18,4	18,4	18,4	18,4	18,4	18,5	18,5	18,5	18,5	18,6	18,6	18,5	18,5	18,6
T °C															

ANEXO 15 – PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS DO TESTE DE BIOACUMULAÇÃO DO EXPERIMENTO CONTROLE (SEM PEIXES).

	Período de 0 Horas			Período de 24 Horas			Período de 48 Horas					
	0	110	200	0	110	200	0	110	200			
µg/L	8,39	7,37	8,21	8,64	5,79	6,87	6,26	18,7	5,71	7,37	6,29	8,35
O. D. (mg/L)	19,7	19,7	19,7	19,8	18,6	18,6	18,7	18,7	18,5	18,4	18,4	18,6
T °C												



## ANEXOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CARBOFURAN

### ANEXO 16 – CONCENTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBAMATOS ENCONTRADOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO CUBATÃO SUL

<b>Substância</b>	<b>Concentração (ppb)</b>
<b>Aldicarb</b>	4.25
<b>Carbofuran</b>	6.65
	7.32
	10.10
	4.35
	23.97
	9.47
	21.76
<b>Carbaril</b>	2.83
	2.64
	3.76
	2.47
	2.04
	2.58
	0.83
<b>Metiocarb</b>	0.64
	0.55
	0.59
	0.74
	1.82
	1.26

FONTE: GICQUEL & LEÃO (1997)

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGÜERA, A. & CONTRERAS, M. Gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides of horticultural concern. **Journal of Chromatography**, v. 655, p. 293-300, 1993.
- ALVES, A. Consumo: usos e abusos. In: Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? **Revista Ciência Hoje**, v. 4, n. 22, p. 49-52, jan./fev., 1986.
- APPLICATION MANUAL CARBAMATES. Pickering Laboratories, Inc. Versão 1.1, 1999. <http://www.pickeringlabs.com>
- ATLAS ESCOLAR DE SANTA CATARINA. Secretaria de Estado de Coordenação Geral e Planejamento – SEPLAN. Florianópolis : SEPLAN, 1991.
- BACCI, E. **Ecotoxicology of organic contaminants**. Florida : CRC Press, 1994.
- BACHMAN, J. & PATTERSON, H. H. Photodecomposition of the carbamate pesticide carbofuran: Kinetics and the influence of dissolved organic matter. **Environmental Science & Technology**, n. 33, v. 6, p. 874-881, 1999.
- BAILEY, H. C.; DIGIORGIO, C.; KROLL, K.; MILLER, J. L.; HINTON, D. E. & STARRETT, G. Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 837-845, 1996.
- BAIRD, C. **Environmental chemistry**. New York : W. H. Freeman and Company, 1995.
- BARCELÓ, D.; DURAND, G.; BOUVOT, V. & NIELEN, M. Use of extraction disks for trace enrichment of various pesticides from river water and simulated seawater samples followed by liquid chromatography – rapid-scanning UV – visible and thermospray – mass spectrometry detection. **Environmental Science and Technology**, v. 27, p. 271-277, 1993.
- BENEY, P. J.; BREUER, G. M.; JACOBS, G. H.; LARABEE-ZIERATH, D.; MOLLENHAUER, P. J.; NORTON, K. K. & WICHMAN, M. D. Review, evaluation, and application of solid phase extraction methods. **Hotline**, v. 35, n. 6, p. 1-5, 1996. [http://www.uhl.uiowa.edu/Publications/Hotline/1996\\_12/solidphase.html](http://www.uhl.uiowa.edu/Publications/Hotline/1996_12/solidphase.html)
- BIZIUK, M; PRZYJAZNY, A.; CZERWINSKI, J. & WIERGOWSKI, M. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

- BRANCO, S. M. **Hidrologia aplicada à Engenharia Sanitária**. 3ª Edição, São Paulo : CETESB, 1986.
- BRESSA, G.; BRONZI, P.; ROMANO, P.; CARMIGNATO, F.; DORINI, M. & SISTI, E. Chlorinated pesticides and PCB content in thermal aquaculture of sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 7, p. 843-850, 1996.
- BROWN, P.; CHARLTON, A.; CUTHBERT, M.; BARNETT, L.; ROSS, L.; GREEN, M.; GILLIES, L.; SHAW, K. & FLETCHER, M. Identification of pesticide poisoning in wildlife. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 463-478, 1996.
- BÜCHELE, F. A.; IACOVSKI, E. & SÔNEGO, M. **Inventário das terras em microbacias hidrográficas – 2. Microbacia: Sul do Rio/Vila Santana/Sertão (Santo Amaro da Imperatriz, SC)**. Projeto Microbacias/BIRD. EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARIA S. A. Florianópolis, 1994.
- BUCHELI, T. D.; MÜLLER, S. R.; HEBERLE, S. & SCHWARZENBACH, R. P. Occurrence and behavior of pesticides in rainwater, roof runoff, and artificial stormwater infiltration. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 3457-3464, 1998.
- BUCKUP, P. A. & REIS, R. E. Conheça os nossos peixes. **Natureza em Revista**, n.10, p. 22-29, 1993.
- BULL, D. & HATHAWAY, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópoles, RJ : Editora Vozes Ltda., 1986.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Água: teste de toxicidade aguda com peixes – sistema estático**. Norma CETESB L5019-1. São Paulo : CETESB, 1987
- CHIRON, S. & BARCELÓ, D. Determination of pesticides in drinking water by on-line solid-phase disk extraction followed by various liquid chromatographic systems. **Journal of Chromatography**, v. 645, p. 125-134, 1993.
- CHIRON, S.; TORRES, J. A.; FERNANDEZ, A. A.; ALPENDURADA, M. F. & BARCELO, D. Identification of carbofuran and methiocarb and their transformation products in estuarine waters by on-line solid phase extraction liquid chromatography - Mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, n. 65, v. 1-4, p. 37-52, 1996.
- COLLE, J. G. & MACKAY, D. Correlating environmental partitioning properties of organic compounds: the three solubility approach. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 265-270, 1999.
- COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. **Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 2ª Edição, São Paulo : Andrei Editora Ltda., 1987.

- CONACHER, H. B. S. & MES, J. Assessment of human exposure to chemical contaminants in foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 5-15, 1993.
- CONOLLY, J. P. & THOMANN, R. V. Modeling the accumulation of organic chemicals in aquatic food chains. In: SCHNOOR, J. L. **Fate of pesticides and chemicals in the environment**. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 385-406.
- CORCIA, A. & MARCHETTI, M. Method development for monitoring pesticides in environmental waters: liquid-solid extraction followed by liquid chromatography. **Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 66-74. 1992.
- CREMLYN, R. **Pesticides: preparation and mod of action**. Chichester : John Wiley & Sons, Inc., 1979.
- DALLAGO, R. M.; PRESTE, C. V.; MARTINS, A. F. & ZANELLA, R. Determinação de resíduos de carbofuran e carbaril em águas por HPLC-UV. Encontro Nacional de Química Analítica, 1997. Resumo.
- DE KOK, A.; HIEMSTRA, M. & VREEKER, C. P. Optimization of the postcolumn hydrolysis reaction on solid phases or the routine high-performance liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate pesticides in food products. **Journal of Chromatography**, v. 507, p. 459-472, 1990.
- DRISS, M. R.; HENNION, M. C. & BOUGUERRA, M. L. Determination of carbaryl and some organophosphorus pesticides in drinking water using one-line liquid chromatographic preconcentration techniques. **Journal of Chromatography**, v. 639, p. 352-358, 1993.
- EXTOXNET – Extension Toxicology Network. **Pesticide information profiles**. Oregon State University, 1998. <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01pips/carbofur.htm>
- FENTEN, J.; BALLS, M. Alternative methods in ecotoxicological research and testing. In: RENZONI, A.; MATTEI, N.; LARI, L.; FOSSI, M. C. **Contaminants in the environment: a multidisciplinary assessment of risks to man and other organisms**. Florida : CRC Press, 1994. p. 145-159.
- FIER, F. (Dr. Rosinha). **Agrotóxicos, o veneno nosso de cada dia**. Fonte: Jornal Gazeta do Povo (PR) - Edição de 06/07/1999. <http://www.quimica.ufpr.br/Servicos/Seguranca/noticia2.html>
- FMC CORPORATION. **Material Safety Data Sheet: Furadan® 4 F Inseticide/Nematicide**. 1999. <http://msds.princeton.fmc.com/msds/9066klu3.htm>
- FREEDMAN, B. **Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses**. 2. ed. San Diego, CA : Academic Press Inc., 1993.

- FRELLO, C. P. **Avaliação da toxicidade aguda do agrotóxico carbofuran utilizando reativos biológicos: *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*.** Florianópolis – SC, 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- GALLO, D. **Manual de entomologia agrícola.** 2ª Edição, São Paulo : Agronômica Ceres, 1988.
- GICQUEL, L. A. P. & LEÃO, J. C. Estudos sobre a contaminação das águas do Rio Cubatão Sul por carbamatos e triazinas. In: UFSC – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Tecnologias ambientais para o desenvolvimento sustentável da Bacia do Rio Cubatão Sul.** Projeto PADCT/CIAMB. Florianópolis, 1997. 1 disco compacto – CD-room.
- GICQUEL, L. A. P. **Curso agrotóxico.** UFSC, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1998. Apostila.
- GOEL, S. Determination of methyl parathion in the liver and kidney of freshwater fish *Channa punctatus* by high-performance liquid chromatography. **Environment & Ecology**, v. 13, n. 4, p. 824-826, 1995.
- GOOLSBY, D. A.; THURMAN, E. M.; POMES, M. L.; MEYER, M. T. & BATTAGLIN, W. A. Herbicides and their metabolites in rainfall: origin, transport, and deposition patterns across the midwestern and northeastern United States, 1990 – 1991. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 1325-1333, 1997.
- GRANDO, M. **Intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina. Um perfil dos casos registrados pelo centro de informações toxicológicas.** Florianópolis – SC, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- GRIFFINI, O.; BAO, M. L.; BURRINI, D.; SANTIANNI, D.; BARBIERI, C. & PANTANI, F. Removal of pesticides during the drinking water treatment process at Florence water supply, Italy. **Journal of Water SRT – Aqua**, v. 48, n. 5, p. 177-185, 1999.
- GUIMARÃES, L. F. & COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; LEITE, G. B. & BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 4ª Edição, Campinas : Editora da UNICAMP, 1993. p. 185-238.
- GUIVANT, J. S. **O uso de agrotóxicos e os problemas de sua legitimação. Um estudo de sociologia ambiental no município de Santo Amaro da Imperatriz, SC.** Campinas – SP, 1992. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) – Departamento de Sociologia, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- GUPTA, R. C. Carbofuran toxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 4, n. 43, p. 383-418, 1994.

HAWK, R. E. & KHAN, A. R. **Carbofuran – Data Summary – Furadan® Inseticide Nematicide.** FMC CORPORATION, 1994.

HOGENDOORN, E. A.; HOOGERBRUGGE, R.; BAUMANN, R. A.; MEIRING, H. D.; JONG, A. P. J. M. & ZONEN, P. Screening and analysis of polar pesticides in environmental monitoring programmes by coupled-column liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 49-66, 1996.

HOWARD, P. H. **Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals.** Michigan : Lewis Publishers, 1989.

HU, J. Y.; AIZAWA, T. & MAGARA, Y. Analysis of pesticides in water with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Water Research**, v. 33, p. 417-425, 1999.

IHERING, R. Cyprinodontes brasileiros (peixes “Guarús”): sistemática e informações biológicas. **Archivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 1, p. 234-252. 1931.

JINNO, K.; MURAMATSU, T.; SAITO, Y.; KISO, Y.; MAGDIC, S. & PAWLISZYN, J. Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase micro-extraction-high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 137-144, 1996.

KAIPPER, B. I. **Desenvolvimento de métodos de extração e purificação para a determinação de pesticidas organofosforados em tomate por cromatografia.** Florianópolis – SC, 1998. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

KALE, S. P.; SARMA, G.; GOSWAMI, U. C. & RAGHU, K. Uptake and distribution of C-14-Carbofuran and C-14-HCH in cat fish. **Chemosphere**, v. 33, n. 3, p. 449-451, 1996.

KRAUSE, R. T. High-performance liquid chromatographic determination of aryl n-methylcarbamate residues using post-column hydrolysis electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 442, p. 333-343, 1988.

LARINI, L. **Toxicologia.** São Paulo : Manole, 1997.

LEÃO, J. C. **Estudo do Movimento do carbofuran no perfil de um solo agrícola.** Florianópolis – SC, 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica.** 7ª Edição, São Paulo : Savier Editora de Livros Médicos Ltda., 1991.

- LI, L.; WANG, L.; HAN, S. & ZHANG, Z. Comparison of four methods of predicting newly measured octanol/water coefficients ( $\log K_{ow}$ ) for heterocyclic nitrogen compounds and the partition mechanism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 2723-2728, 1999.
- LU, F. C. **Basic toxicology: fundamentals, target organs and risk assessment**. 3. ed. Washington : Taylor & Francis Ltd., 1996.
- MAGDIC, S.; BOLAND-BOYD, A.; JINMO, K. & PAWLISZYN, J. B. Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography**, v. 736, p. 219-228, 1996.
- MARTINEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; MORAN, M. J. A. & MENDEZ, J. H. Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography**, v. 607, p. 37-45, 1992.
- MARUYA, K.A. & LEE, R.F. Aroclor 1268 and toxaphene in fish from a southeastern U.S. estuary. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 1069-1075, 1998.
- MATIAS, W. G. **Etude des mecanismes moleculaires d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, *in vivo* et *in vitro***. Bordeaux, França, 1996. Tese de Doutorado da Universidade de Bordeaux II.
- MENEZES, N. A. *et al.* **Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil**. Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP- Instituto de Pesca. Comissão Interestadual da Bacia Paraná e Uruguai. 1971.
- MENEZES, N. A. Três espécies novas de *Oligosarcus* Günther, 1864 e redefinição taxonômica das demais espécies do gênero (Osteichthyes, Teleostei, Characidae). **Bolm. Zool.**, v. 11, p. 1-39, 1987.
- MENEZES, N. A. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. In: HEYER, W. R. & VANZOLINI, P. E. **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro : Academia de Ciências Brasileira, 1988. p. 295-304.
- MEURER, S. **Estudo comparativo de aspectos do comportamento intra-específico de diferentes espécies de cichlidae (PISCES, TELEOSTEI)**. Florianópolis – SC, 1994. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- MEYLAN, W. M.; HOWARD, P. H.; BOETHLING, R. S.; ARONSON, D.; PRINTUP, H. & GOUCHIE, S. Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 664-672, 1999.

- MORTARI, J. R. **Características dos agrotóxicos nas microbacias hidrográficas do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis – SC, 1996. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- MOSTAFA, I. Y.; ZAYED, S. M. A. D.; FARGHAL, Y. M.; MAHDY, F. Bioavailability to rats and toxicity in mice of Carbofuran residues bound to faba beans. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 27, n. 4, p. 399-405, 1992.
- MOTOHASCHI, N.; NAGASHIMA, H.; PÁRKÁNYI, C.; SUBRAHMANYAM, B. & ZHANG, G. W. Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 333-346, 1996.
- MUKHERJEE, I. & GOPAL, M. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 33-42, 1996.
- NORMAS E MANUAIS TÉCNICOS II. **Praguicidas em saúde pública**. Ministério da saúde. Brasília, p. 13-21, 1982.
- NETO, J. A. L.; PANICHI, J. A. V., SÔNEGO, M & MÜLLER, J. E. **Inventário das terras em microbacias hidrográficas – 4. Microbacia: Alto Rio Cubatão (Águas Mornas, SC)**. Projeto Microbacias/BIRD. EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARIA S. A. Florianópolis, 1994.
- OLIVEIRA, F. B. **Manejo de produtos residuários do uso de agrotóxicos na bacia hidrográfica do Cubatão Sul**. Florianópolis – SC, 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- OXFORD Dictionary of Chemistry. **A Dictionary of Chemistry**. 3<sup>a</sup> Edition, New York : Oxford University Press, 1996.
- PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções**. Rio de Janeiro, RJ : Editora da Fundação Getúlio Vargas – FGV, 1979.
- PLIMMER, J. Dissipation of pesticides in the environment. In: SCHNOOR, J. L. **Fate of pesticides and chemicals in the environment**. Iowa : A Wiley-Interscience Publication, 1992. p. 79-90.
- PRIMAVESI, A. **Agroecologia: ecosfera, tecnosfera e agricultura**. São Paulo, SP : Livraria Nobel S. A., 1997.
- REEVE, R. N. **Environmental analysis**. West Sussex, UK : John Wiley & Sons Ltd., 1994.



- RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ : Editora Guanabara Koogan S. A., 1996.
- ROSEN, D. E. & BAILEY, R. M. The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography, and systematics. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 126, article 4, 1963.
- RÜEGG, E. F.; PUGA, F.R.; SOUZA, M.C.M; ÚNGARO, M.T.S.; FERREIRA, M.S.; YODOMIZO, Y.; ALMEIDA, W.F. **O impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde e a sociedade**. 2. ed. São Paulo, SP : Editora Ícone Ltda., 1991.
- RUSSEL, R. W.; GOBAS, F. A. P. C. & HAFFNER, G. D. Role of chemical and ecological factors in trophic transfer of organic chemicals in aquatic food webs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 1250-1257, 1999.
- SCHNOOR, J. L. Chemical fate and transport in the environment. In: SCHNOOR, J. L. **Fate of pesticides and chemicals in the environment**. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 1-24.
- SCHNOOR, J. L. **Environmental modeling: fate and transport of pollutants in water, air and soil**. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M. & IMBODEN, D. M. **Environmental Organic Chemistry**. Canada : John Wiley & Sons, 1993.
- SHIBAMOTO, T. & BJELDANES, L. F. **Introducción a la toxicología de los alimentos**. 1. ed. Zaragoza : Acribia, 1996.
- SIJM, D. T. H. M.; SCHÜÜRMAN, G.; VRIES, P. J. & OPPERHUIZEN, A. Aqueous solubility, octanol solubility, and octanol/water partition coefficient of nine hydrophobic dyes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 1109-1117, 1999.
- STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M. & VAN HELD, P. A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE Jr., P. P. & BERGMAN, H. L. **Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress**. Florida : CRC Press, 1992. p. 235-335.
- SUNDARAM, K. M. & NOTT, R. Gas chromatographic method for simultaneous determination of acephate and methamidophos in bark, cone and seed samples of conifers. **Journal of Chromatography A**, v. 627, p. 300-304, 1992.
- THE MERK INDEX. **An encyclopedia of chemicals and drugs**. 9<sup>a</sup> Edition, 1976.
- TORRES, C. M.; PICÓ, Y. & MAÑES, J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, n. 754, p. 301-331, 1996.

- UFSC – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Tecnologias ambientais para o desenvolvimento sustentável da Bacia do Rio Cubatão Sul.** Projeto PADCT/CIAMB. Florianópolis, 1997. 1 disco compacto – CD-room.
- U. S. EPA (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatization**, method 531.1. 1989. <http://searchpdf.adobe.com/proxies/0/69/41/70.html>
- U. S. EPA (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **N-methylcarbamates by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**, method 8318. 1994. <http://searchpdf.adobe.com/proxies/0/81/47/54.html>
- U. S. EPA (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Guidance for assessing chemical contaminants data for use in methods fish advisories.** Second Edition, EPA Publication No. EPA 823-R-95-007. 1995. <http://www.epa.gov/OST/fishadvice/vol1/doc2ndx.html>
- U. S. EPA (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Solvent extractable nonvolatile compounds by High Performance Liquid Chromatography/particle beam/ mass spectrometry (HPLC/PB/MS)**, method 8325. 1996. <http://searchpdf.adobe.com/proxies/2/14/29/74.html>
- VARI, R. P. **Systematics of the neotropical characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces : Ostariophysi).** Washington, DC : Smithsonian Institution Press, 1991.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKAL, D. B. **Principles of ecotoxicology.** London : Taylor & Francis Ltd., 1996
- WAN, H. B. & WONG, M. K. Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 43-47, 1996.
- WORTHING, C. R.; WALKER, S. B. **The pesticide manual: a world compendium.** 8. ed. Suffolk, UK : The Lavenham Press Limited, 1987.
- ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia aquática. In: **Congresso Brasileiro de Limnologia** (VII : 1999 : Florianópolis). Apostila do mini-curso de ecotoxicologia aquática.
- ZAMBRONE, F. A. D. Descrição: perigosa família. In: **Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Revista Ciência Hoje**, v. 4, n. 22, p. 49-52, jan./fev., 1986.