



**TOXICIDADE AGUDA DOS HERBICIDAS AMETRINA, TEBUTHIURON E VELPAR K  
PARA ALEVINOS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

CAMILA DAMIANE **SOARES**<sup>1</sup>; MARINA DAL'BÓ **PELEGRINI**<sup>2</sup>; MÔNICA A. M. DE  
MOURA E **MELLO**<sup>3</sup>; VERÔNICA JONSSON DE **PAULA**<sup>4</sup>; CALUDIO M. **JONSSON**<sup>5</sup>.

**Nº 12415**

**RESUMO**

A mistura de herbicidas no tanque de pulverização é uma prática comum entre os produtores, ainda que seja proibida por lei. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade das misturas dos herbicidas tebuthiuron, ametrina e do produto comercial Velpar K (diuron e hexazinone), amplamente empregados na cultura canavieira, para a tilápia, através de estudos de exposição em curto prazo. Os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanque com água de clorada com capacidade 1000 L, com pH e temperatura controlados e aeração constante, sendo alimentados com ração comercial duas vezes ao dia. Na véspera da montagem dos ensaios os alevinos foram transferidos para aquários com volume útil de 10L, mantidos em sistema estático e permanecendo em jejum por um período de 24h antes da exposição. Os testes foram baseados no protocolo OECD Guidelines 203, para determinação da  $CL_{50(96h)}$  em testes de toxicidade aguda (OECD, 1992). Ao final dos ensaios, os animais foram sacrificados por anestesia em solução de benzocaína. Com os resultados obtidos para mortalidade foi determinada a  $CL_{50-96h}$  calculada com o auxílio do programa Statgraphics Plus Version 5.1 (MANUGISTICS, 2001). Este procedimento foi empregado em todos os ensaios aqui descritos. Em relação ao comportamento dos peixes observou-se em algumas concentrações expansão na região abdominal, aumento do batimento opercular, letargia e perda de equilíbrio.

---

<sup>1</sup> Bolsista Embrapa Meio Ambiente: Graduada em Eng. Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP, camila.damiane@hotmail.com.

<sup>2</sup> Bolsista Embrapa Meio Ambiente: Graduada, Biologia, UNICAMP, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisadora, Instituto Biológico/APTA, Campinas-SP.

<sup>4</sup> Bolsista FAPESP: Graduada, Biomedicina, METROCAMP, Campinas-SP.

<sup>5</sup> Orientador: Pesquisador, Laboratório Ecotoxicologia e Biossegurança/CNPMA, Jaguariúna-SP.



## ABSTRACT

The herbicide mixture in the spray tank is a common practice among farmers, although it is prohibited by law. Therefore, the aim of this study was to evaluate the toxicity of mixtures of herbicides tebuthiuron, ametryn and commercial product K Velpar (hexazinone and diuron), widely used in sugar cane, for tilapia, through studies of exposure in the short term. The fish were acclimated for seven days with dechlorinated tap water in a tank with capacity 1000 L, pH and temperature controlled and constant aeration and fed commercial feed twice daily. On the eve of the assembly of the tests the fingerlings were transferred to aquaria with a volume of 10L, maintained in static system and remained fasting for a period of 24 hours before exposure. The tests were based on the protocol OECD Guidelines 203 for determining the LD50 (96h) in acute toxicity test (OECD, 1992). At the end of testing, animals were sacrificed by anesthesia solution benzocaine. With the results for mortality was determined 96h-LC50 calculated with the aid of the Statgraphics Plus Version 5.1 (Manugistics, 2001). This procedure was used in all assays described herein. In relation to fish behavior was observed in some concentrations in the abdominal expansion, increased opercular beat, lethargy and loss of balance.

## INTRODUÇÃO

Utilizam-se substâncias químicas para repelir ou matar pragas assim como as plantas desenvolvem seus mecanismos de autodefesa com o decorrer da evolução das espécies. Assim desenvolveu-se uma variedade de pesticidas – substâncias químicas para matar ou controlar organismos considerados indesejáveis. Um dos tipos mais comuns é o herbicida, eliminador de ervas daninha. Biocida é um nome mais adequado para essas substâncias porque a maioria também mata outros organismos além de seus alvos (MILLER, 2007).

Os herbicidas são amplamente empregados em atividades agrícolas, conhecidas como fontes de poluição difusa de águas superficiais e subterrâneas. O impacto desta utilização sobre a qualidade das águas, entretanto, é pouco conhecido e tem sido alvo de vários estudos, sendo que já se observaram efeitos mutagênicos e genotóxicos em peixes e outros organismos de vida aquáticos expostos a herbicidas (SILVA e FAY, 2004).

A cultura agrícola predominante no estado de São Paulo, segundo a ABAG/RP (Associação Brasileira do Agronegócio da Região de Ribeirão Preto), é a cana-de-açúcar, compreendendo, aproximadamente, cinco milhões de hectares plantados e

uma produção anual de 328 milhões de toneladas. Estudos relacionados à cana de açúcar são de extrema importância para o Brasil que busca um desenvolvimento estratégico em recursos energéticos sustentáveis. Aliado a este aspecto esta a contaminação das águas, recurso em abundância no país que carece de medidas de proteção mais eficazes. Daí a importância de se avaliar o dano causado pela exposição a uma substância química, pois este depende da quantidade de exposição (dosagem), da frequência de exposição, da eficácia dos sistemas de desintoxicação dos corpos (bióticos e abióticos) e de sua composição.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Aclimação dos organismos testes**

Na primeira etapa do projeto foi realizado a compra e montagem dos equipamentos e materiais necessários ao projeto como salas ambientadas a  $26,0 \pm 1^\circ\text{C}$  e ciclo de fotoperíodo claro:escuro de 16: 08 horas. Como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe que se reproduz nas épocas mais quentes do ano, os alevinos foram obtidos em novembro de 2011, o que retardou o início dos testes agudos.

### **Bioensaios**

Foi determinada a toxicidade aguda dos herbicidas ametrina (produto comercial Gesapax 500®, 500 g L<sup>-1</sup> i.a.), tebuthiuron (produto comercial Combine 500®, 500 g L<sup>-1</sup> i.a.), e da mistura comercial de diuron + hexazinone (Velpar K®, 468g kg<sup>-1</sup> i.a. diuron e 132 g kg<sup>-1</sup> i.a. hexazinone).

Os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanque com água de clorada com capacidade 1000 L, com pH (7,5) e temperatura controlados (26° C) e aeração constante (oxigênio dissolvido 6 mgL<sup>-1</sup>), sendo alimentados com ração comercial duas vezes ao dia. Na véspera da montagem dos ensaios os alevinos (2,5–4,5 cm, 0,6–2,02g) foram transferidos para aquários com volume útil de 10L, mantidos em sistema estático e permanecendo em jejum por um período de 24h antes da exposição.

Os testes foram realizados segundo o protocolo OECD 203 (1992). Os ensaios tiveram duração de 96 horas, os peixes foram estocados em aquários com aeração forçada e a taxa de estocagem foi de 2 g L<sup>-1</sup>. Ao final dos ensaios, os animais foram sacrificados por anestesia em solução de benzocaína (0,8 mg ml<sup>-1</sup>).

Os parâmetros de qualidade da água foram registrados ao final dos ensaios com auxílio dos seguintes equipamentos: pHmetro portátil digital, modelo 330i, WTW; condutivímetro portátil digital, modelo Cond 330i, WTW e oxímetro portátil digital, modelo 3210 Cellox 325, WTW.

### Dados coletados

A  $CL_{50-96h}$  foi calculada com o auxílio do programa Statgraphics Plus Version 5.1 (MANUGISTICS, 2001).

A observação comportamental dos indivíduos foi realizada diariamente e tabelada conforme os seguintes parâmetros: mortalidade; comportamento normal; nado acima da linha do meio do aquário; nado no fundo do aquário, com perda de equilíbrio; nado errático e abdômen dilatado.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações das soluções teste empregadas em cada ensaio de toxicidade aguda podem ser observados na Tabela 1. Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos para mortalidade e comportamento da tilápia exposta a ametrina. A  $CL_{50-96h}$ , determinada em 4,41 (3,63 – 5,26)  $mg L^{-1}$  (Figura 1). Segundo a United States Environmental Protection Agency uma  $CL_{50-96h}$  entre 1 e 10  $mg L^{-1}$  é classificada como moderadamente tóxico.

**Tabela 1.** Concentrações das soluções teste de cada ensaio de toxicidade aguda com alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

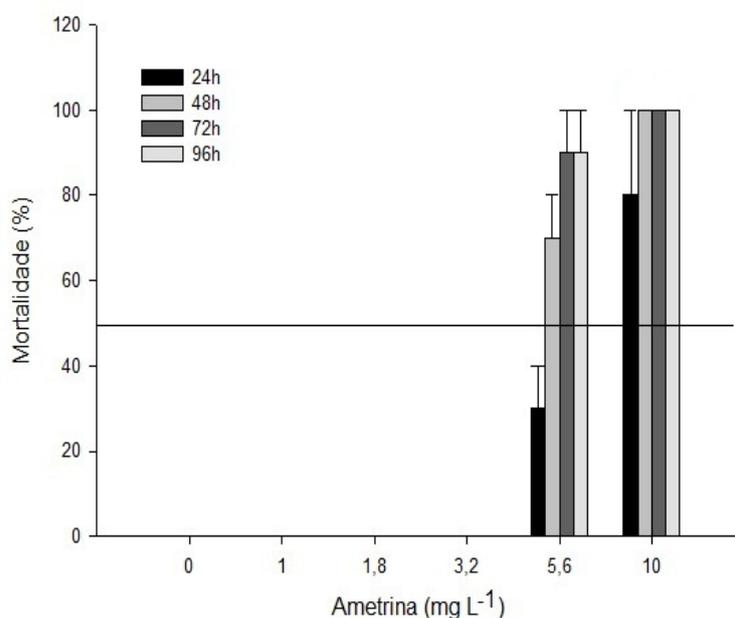
Herbicidas	Concentrações ( $mgL^{-1}$ )
Ametrina	0, 1, 1,8, 3,2, 5,6 e 10
Tebuthiuron	0, 100, 126, 158, 199 e 250
Velpar K	0, 3, 5, 9, 17 e 30

Em relação ao comportamento dos peixes, observou-se que os expostos a concentrações  $\geq 5,6 mg L^{-1}$  apresentaram uma expansão na região abdominal (provavelmente um aumento do volume da bexiga natatória), que promoveu perda de equilíbrio e fez com que os peixes permanecessem boiando na superfície da água. Também foi observado aumento do batimento opercular, porém a frequência não foi quantificada.

**Tabela 2.** Mortalidade e comportamento de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostos ao herbicida ametrina, em teste de toxicidade aguda.

Concen. (mg L <sup>-1</sup> )	Réplica	n	24h		48h		72h		96h	
			Mort <sup>1</sup>	Comp <sup>2</sup>						
0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
1,8	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1 F+E
1,8	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3,2	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3,2	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
5,6	1	5	1	F+A	3	1 F+A	1	-	-	-
5,6	2	5	2	F+E	1	1 F+A	1	0	0	0
10	1	5	3	F+A	2	-	-	-	-	-
10	2	5	5	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Mortalidade; <sup>2</sup>Comportamento; 0 = comportamento normal, nadando acima da linha do meio do aquário; F+E = nadando no fundo do aquário, com perda de equilíbrio; F+A = nadando acima da linha do meio do aquário, peixes tinham o abdômen bastante dilatado e não conseguiam nadar para o fundo.



**Figura 1.** Mortalidade média (%) da tilápia (*O. niloticus*) por exposição à ametrina.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos para mortalidade e comportamento da tilápia exposta ao tebuthiuron. A CL<sub>50-96h</sub>, determinada em 246,33

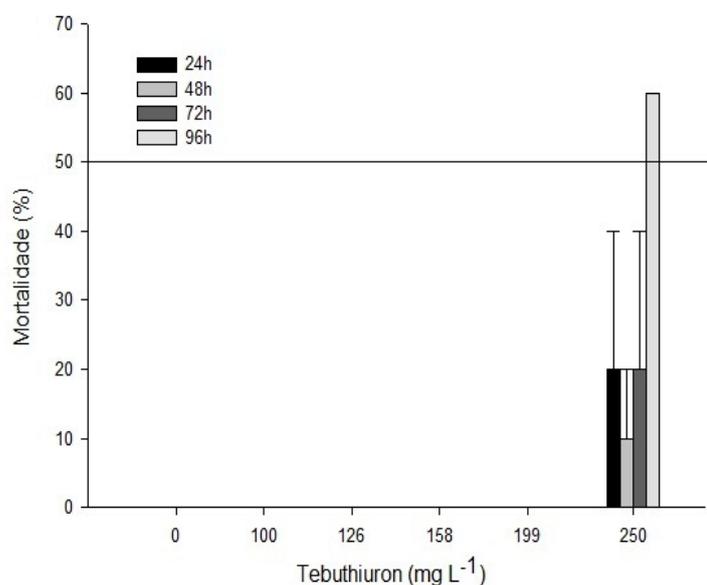
(199 – 250 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 3). Segundo a United States Environmental Protection Agency uma CL<sub>50-96h</sub> maior que 100 mg L<sup>-1</sup> é classificada como praticamente não tóxico.

Em relação ao comportamento dos peixes, em todos os tratamentos os peixes posicionaram-se no fundo dos aquários, apresentando letargia e perda de equilíbrio. Alguns exemplares expostos a concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> apresentaram perda de equilíbrio, com expansão na região abdominal, permanecendo na superfície da água, assim como aconteceu com no teste com ametrina.

**Tabela 3.** Mortalidade e comportamento de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostos ao herbicida tebuthiuron, em teste de toxicidade aguda.

Concentr. (mg L <sup>-1</sup> )	Réplica	n	24h		48h		72h		96h	
			Mort <sup>1</sup>	Comp <sup>2</sup>						
0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1	5	0	0	0	0	0	1 F+S	0	2 F+S
100	2	5	0	0	0	0	0	0	0	3 F
126	1	5	0	0	0	0	0	0	0	2 F+S
126	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
158	1	5	0	0	0	3 F+S	0	4 F+S	0	2 F+S
158	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
199	1	5	0	F+S	0	3 F+S	0	2 F+S	0	3 F+S
199	2	5	0	F+S	0	3 F+S	0	1 F+S	0	2 F+S
250	1	4	0	F	1	1 F+E	1	1 F+A 2 F+S	1	1 F+S
250	2	5	2	0	0	2 F+S 1 F+E	0	1 F+A 2 F+S	1	1 F+E 1 F+S

<sup>1</sup>Mortalidade; <sup>2</sup>Comportamento; 0 = comportamento normal, peixes nadando acima da linha do meio do aquário; F+A = nadando acima da linha do meio do aquário, peixes tinham o abdômen bastante dilatado e não conseguiam nada para o fundo; F+E = nadando no fundo do aquário, com perda de equilíbrio; F+S = nadando no fundo do aquário com movimentos lentos.



**Figura 3.** Mortalidade média (%) da tilápia (*O. niloticus*) por exposição ao tebuthiuron.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos para mortalidade e comportamento da tilápia exposta ao Velpar K.. A  $CL_{50-96h}$ , determinada em 18,62 (14,79 – 24,45) mg L<sup>-1</sup> (Figura 4). Sendo classificado como ligeiramente tóxico, com  $CL_{50-96h}$  entre 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>.

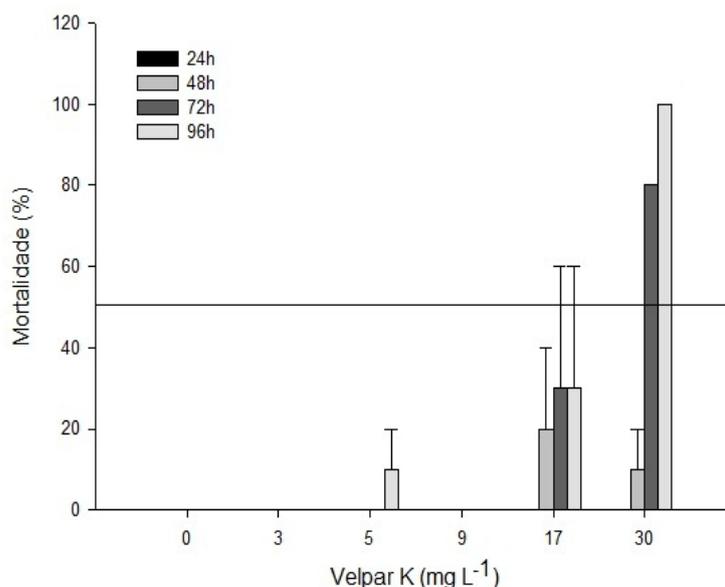
Em relação ao comportamento dos peixes, observou-se que os expostos a concentrações  $\geq 9$  mg L<sup>-1</sup> apresentaram letargia, perda de equilíbrio e, em alguns casos, paralisia, apresentando apenas batimento opercular.

**Tabela 4.** Mortalidade e comportamento de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostos ao herbicida Velpar K, em teste de toxicidade aguda.

Concentr. (mg L <sup>-1</sup> )	Réplic a	n	24h		48h		72h		96h	
			Mort <sup>1</sup>	Comp <sup>2</sup>						
0	1	5	0	0	0	0	0	0	1	0
0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	5	0	L	0	0	0	0	0	L
9	2	5	0	L	0	0	0	P	0	P
17	1	5	0	E	0	0	0	3 E; 2 P	0	P

17	2	5	0	E	0	0	2	0	1	P
30	1	5	0	P	0	P	4	P	1	-
30	2	5	0	P	0	P	1	0	4	-

<sup>1</sup>Mortalidade; <sup>2</sup>Comportamento; 0 = comportamento normal, peixes nadando acima da linha do meio do aquário; E = perda de equilíbrio; L = letargia; P = paralisia, apenas respirando.



**Figura 4.** Mortalidade média (%) da tilápia (*O. niloticus*) por exposição ao Velpar K.

## CONCLUSÃO

Qualquer substância química sintética ou natural pode ser prejudicial se ingerida em quantidade grande o suficiente, mas de maneiras diferentes para indivíduos diferentes. A relação concentração resposta (dos três herbicidas em estudo) para a tilápia (*O. niloticus*) indica a alta relação entre o aumento da concentração de exposição e mortalidade dos animais durante o teste. Daí a importância de estudos ecotoxicológicos já que tais substâncias são altamente persistentes no meio ambiente o que pode ocasionar um efeito de bioacumulação.

Quando comparado com o herbicida Diquat com CL<sub>50-96h</sub> determinada em 37,28 mg L<sup>-1</sup> (HENARES *et al.*, 2010), Gesapax (ametrina) e Velpar K (diuron+hexazinone) apresentaram uma toxicidade maior para tilápia. Quando comparado com o Paraquat, também para tilápia, com CL<sub>50-96h</sub> de 11,84 mg.L<sup>-1</sup> (BABATUNDE *et al.*, 2001), o Gesapax ainda se mostra mais tóxico. Já o Combine (tebuthiuron) comparado aos quatro herbicidas citados anteriormente apresentou-se menos tóxico.



É possível constatar também que quanto maior a concentração e o tempo de exposição os efeitos colaterais aumentam, sendo comum aos três herbicidas avaliados a dilatação do abdômen, letargia e perda de equilíbrio.

Em ordem decrescente a toxicidade referente à  $CL_{50-96h}$  foi ametrina, Velpar K e tebuthiuron.

### **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do projeto;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna, SP por sediar o projeto e concessão da bolsa estágio;

A todas as pessoas que dedicaram seu tempo e esforço para este projeto.

### **REFERÊNCIAS**

BABATUNDE, M.M. *et al.* Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewavas). **Water. Air. Soil. Pollut.**, Dordrecht, v. 131, p. 1-10, 2001.

HENARES, M.N.P.; CRUZ, C.; PITELLI, R.A.; MACHADO, M.R.F.. **Toxicidade aguda do herbicida Diquat para três espécies de peixes.** XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas 19 a 23 de julho de 2010 - Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP.

MANUGISTICS Statgraphics Plus. Version 5.1 for Windows. Rockville: Manugistics Group, 2001.

MILLER, G. TYLER. **Ciência ambiental**; tradução All Tasks; revisão técnica Wellington Braz Carvalho Delitti. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development. 1992. Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf> Acesso em 22 de abril de 2010.

SILVA, Célia Maria Maganhoto de Souza; FAY, Elisabeth Francisconi. **Agrotóxicos e ambiente.** Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS. **Acute toxicity test for estuarine and marine organisms (estuarine fish 96-hour acute toxicity test)**. Standard Evaluation Procedures Project Manager Stephen L. Johnson, 1985.