# UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

**LARISA MARIANE UTZIG** 

# AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE, ECOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE CLORPIRIFÓS APÓS TRATAMENTO POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/ $H_2O_2$

**DISSERTAÇÃO** 

#### LARISA MARIANE UTZIG

# AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE, ECOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE CLORPIRIFÓS APÓS TRATAMENTO POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pósgraduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de concentração: Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz



# TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 64

# AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO E DA ECOTOXICIDADE DE CLORPIRIFÓS APÓS TRATAMENTO POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H2O2 por

#### LARISA MARIANE UTZIG

Dissertação apresentada às 13 horas do dia 10 de março de 2016, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, linha de pesquisa Controle e Monitoramento Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

#### Banca examinadora:

Danca examinadora.
Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Adriane Martins de Freitas (Orientadora) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz (Co-Orientador) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR
Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Carla Sirtori Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Wanessa Algarte Ramsdorf Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR
Visto da Coordenação:  Prof. Dr. Fernando Hermes Passig Coordenador do PPGCTA

<sup>&</sup>quot;A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa"

#### **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter zelado por mim em todos os momentos desta minha caminhada.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Freitas, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcus Liz, por muitas horas de dedicação e ensinamentos.

À banca avaliadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wanessa Ramsdorf e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Sirtori, por terem avaliado e contribuído com este trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Martins, por ter me ajudado em muitos momentos e por ter avaliado meu trabalho de qualificação.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Aos colegas do laboratório de Contaminantes Ambientais e Ecotoxicologia, por toda a ajuda e pelas risadas. Agradeço principalmente à Rubia, Mariana, Joyci e Monike, por terem tido a paciência de me ensinar, ajudar e desenvolver este trabalho.

Aos colegas de mestrado, Charyane, Aldria, Lucas e Marlon, que muitas vezes me ajudaram neste projeto ou me ajudaram emprestando seus ouvidos.

Aos amigos de longa data, Helena, Iarema, Tamara e Bruno, que sempre me animaram a persistir e não me abandonaram nestes dois anos de loucura.

À família, em especial ao meu irmão Rafael e à minha mãe Eliete, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Ao meu noivo, Jony, que de todas as formas possíveis me apoiou, incentivou, criticou, e compreendeu. E que com seu amor, não me permitiu abalar nos momentos mais difíceis destes dois anos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) e ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), por ceder a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, por incentivar a pesquisa e possibilitar o desenvolvimento do meu trabalho.

A todas as pessoas, que são muitas, que de alguma forma incentivaram e ajudaram a desenvolver este trabalho.

#### RESUMO

UTZIG, Larisa Mariane. Avaliação da Fitotoxicidade, Ecotoxicidade e Genotoxicidade de Clorpirifós após Tratamento por Radiação UVC e Processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 2016. 129 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

O agrotóxico organofosforado clorpirifós (CP) é considerado tóxico principalmente devido à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Devido à ineficiência de tratamentos biológicos convencionais na degradação do CP e de seus metabólitos, processos avançados de oxidação vêm sendo estudados para possibilitar sua efetiva degradação. Este trabalho avaliou a degradação do CP (200 µg L<sup>-1</sup>) em água (0,2% de ACN) através da radiação UVC e do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em escala de bancada, bem como a ecotoxicidade após os tratamentos aplicados. A partir das condições de pH e concentração de peróxido de hidrogênio adotados neste estudo (pH 5,2 e 12 mg L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) verificou-se que em ambos os tratamentos, mais de 97% do composto foi degradado após 20 minutos de tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e após 60 minutos de tratamento por radiação UVC. Através do estudo cinético, verificou-se que a degradação do CP segue uma reação de pseudo-primeira ordem, sendo o valor da constante k para o processo  $UV/H_2O_2$  calculada em 0,119 min<sup>-1</sup>, e 0,053 min<sup>-1</sup> para o tratamento UVC, demonstrando que o processo avançado de oxidação é mais rápido na degradação do CP do que apenas a fotólise direta. Embora o CP tenha sido praticamente degradado, ensaios ecotoxicológicos demonstraram que após o tratamento, as soluções tratadas pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram ecotoxicidade aguda maior do que as tratadas por radiação UVC. Em ensaios com Daphnia magna, a toxicidade se manteve em relação à toxicidade inicial da solução de CP para ambos os tratamentos, enquanto que em ensaios com Aedes aegypti, a ecotoxicidade reduziu 95% após tratamento por radiação UVC e 1,7% após tratamento por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lactuca sativa apresentou fitotoxicidade para as soluções tratadas por ambos os processos. Ensaios realizados com os três organismos com as amostras-controle das soluções (soluções dos reagentes, sem CP) demonstraram que a ecotoxicidade aguda e a fitotoxicidade das amostras tratadas pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são provenientes de subprodutos da degradação da acetonitrila formados durante o tratamento. Quanto aos ensaios realizados com Danio rerio, foi observada mortalidade de todos os peixes expostos à amostra tratada por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com e sem o agrotóxico. Solução de CP tratada por radiação UVC foi empregada em ensaio de genotoxicidade, porém não foi observado efeito genotóxico nos organismos expostos. Devido aos resultados obtidos, conclui-se que embora ambos os tratamentos tenham atingindo uma eficiência superior a 97% de degradação, a ecotoxicidade aguda e a fitotoxicidade do efluente tratado manteve-se após degradação por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devido à formação de subprodutos de degradação da acetonitrila, mesmo esta tendo sido aplicada em baixas concentrações (0,2% v/v).

Palavras-Chave: Organofosforado.  $UV/H_2O_2$ . Toxicidade aguda. Genotoxicidade. HPLC-DAD.

#### **ABSTRACT**

UTZIG, Larisa Mariane. Evaluation of phytotoxicity, genotoxicity and acute toxicity of chlorpyrifos after treatment by UVC radiation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. 2016. 129 f. Dissertação (Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

The organophosphate pesticide chlorpyrifos (CP) is considered toxic mostly due to inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and the genotoxic potential in living organisms, even at low concentrations. Due to the inefficiency of conventional biological treatments in the degradation of CP and its metabolites, advanced oxidation processes have been studied to enable their effective degradation. This study evaluated the degradation of CP (200 µg L<sup>-1</sup>) in aqueous solution (0,2% de ACN) by direct photolysis (UVC) and homogeneous process UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the ecotoxicity before and after the treatments are applied. From the conditions of pH and concentration of hydrogen peroxide used in this study (pH 5.2 and 12 mg L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) it was found that in both treatments, over 97% of the compound was deteriorated after 20 minutes of treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 60 minutes after UVC radiation. The kinetic study demonstrates that the degradation of CP following a pseudo-first reaction. The rate constants k was calculated in 0.119 min<sup>-1</sup> for the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process and 0,053 min<sup>-1</sup> for the UVC radiation. However, bioassays tests showed that after the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, the solutions was considered more toxic than the solutions treated by UVC radiation. In tests with *Daphnia magna*, the toxicity has remained relative to the initial toxicity of CP solution for both treatments, while in Aedes aegypti assays the toxicity reduced 95% after treatment with UVC and 1.7% after treatment process by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lactuca sativa indicates phytotoxicity for both treatments. Tests carried out with the components of the solutions without CP, showed that acute ecotoxicity of the samples treated by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process could be explain by the generation of acetonitrile byproducts during treatment, possibly cyanide ions. For the tests performed with zebrafish it was observed mortality of all the organisms exposed to the sample treated by the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>process and the blank sample. CP solutions without treatment and after UVC radiation degradation were used in genotoxicity assays, but were not observed genotoxic effects of these samples in the exposed organisms. Due to the results obtained, it was concluded that although both treatments have reached efficiency greater than 97% degradation, acute ecotoxicity of the treated effluent remained after degradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process due to formation of by-products of acetonitrile, even it has been applied in low concentrations (0.2% v/v).

Key-words: Organophosphate. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Acute toxicity. Genotoxicity. HPLC-DAD.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1– Estrutura química geral de organofosforados17	7
Figura 2 – Subprodutos de degradação do clorpirifós via processos biológicos e	
físico-químicos	1
Figura 3 – Daphnia magna (Straus, 1820)40	O
Figura 4 – Larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)4	1
Figura 5 – Danio rerio (Hamilton, 1822)	2
Figura 6 - Esquema e foto de reator fotoquímico de bancada equipado com	
radiação artificial5	1
Figura 7 - Curvas analíticas para os comprimentos de onda de 290nm, 0,01 à 0,6	
mgL <sup>-1</sup> (a) e 0,8 à 5 mgL <sup>-1</sup> (b) (Solução de clorpirifós em ACN)6	1
Figura 8 - Cromatogramas de amostras de CP (1 mg L <sup>-1</sup> ) em diferentes matrizes	
de água62	2
Figura 9 - Cromatogramas de CP (200 $\mu g \ L^{-1}$ ) em diferentes vazões do método 64	4
Figura 10 - Cromatograma de CP (200 µg L <sup>-1</sup> ) em diferentes proporções de fase	
móvel65	5
Figura 11- Cromatograma de CP (102 $\mu g L^{-1}$ ) em diferentes volumes de injeção66	ô
Figura 12- Curva de calibração do método analítico (n=7)67	7
Figura 13 – Concentração do CP <i>versus</i> tempo	1
Figura 14 - Cromatogramas ( $\lambda$ =290 nm) das amostras coletadas durante o	
tratamento (0 a 180 minutos) por radiação UVC73	3
Figura 15 - Cromatogramas ( $\lambda$ =290 nm) das amostras coletadas durante o	
tratamento (0 a 180 minutos) por processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 74	4
Figura 16 - Degradação do CP em função do tempo durante tratamento UVC e	
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4
Figura 17 – Gráfico de $In(C/C_0)$ versus tempo de tratamento via processo $UV/H_2O_2$	
(a) e UVC (b)	ô
Figura18 - Gráfico de Probitos para D. magna após 48h do ensaio	
ecotoxicológico definitivo	8
Figura19 - Imobilização (%) de <i>D. magna</i> e degradação de CP por UVC e por	
processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 8	1
Figura 20 – Fluxograma da preparação das soluções das amostras-controle83	3

Figura 21 – Gráfico de Probitos para A. aegypti após 24h do ensaio	
ecotoxicológico definitivo	37
Figura 22 - Imobilidade média (%) de larvas de <i>A. aegypti</i> e degradação de CP	
por UVC e por processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	39
Figura 23 - Média dos escores (colunas) e desvios padrão (barra de erro) dos	
danos celulares analisados no 1° ensaio cometa (p=0,5742)	94
Figura 24 – Hemorragia causada após exposição à amostra tratada por processo	
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (180 minutos)9	96
Figura 25 - Média dos escores (colunas) e desvios padrão (barra de erro) dos	
danos celulares analisados no 2° ensaio cometa (p=0,1545)	97
Figura 26 – Comparação das médias dos escores dos danos celulares analisados	
no 1° e 2° ensaio cometa9	98
Figura 27- Carta-controle apresentando o gráfico com resultados de CE <sub>50</sub> para a	
D. magna ao cloreto de potássio12	21

# **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Métodos de análise cromatográfica do composto clorpirifós	23
Quadro 2 – Determinação de precisão do método	27
Quadro 3 - Publicações referentes à processos de remoção e degradação o	do
clorpirifós em meio líquido (período entre 2007 e 2016).	30
Quadro 4 – Sistemas utilizados para geração de radicais hidroxila em AOP	33
Quadro 5 - Principais vantagens e desvantagens de processos avançados o	de
oxidação	34
Quadro 6 – Classificação dos danos causados em núcleos de células sanguínea	s. 57
Quadro 7 - Descrição das etapas de aclimatação e exposição das amostras no	os
ensaios de genotoxicidade com D. rerio.	93

# **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas do inseticida clorpirifós1	9
Tabela 2 - Potenciais redox de alguns agentes oxidantes	32
Tabela 3 – Colunas cromatográficas empregadas nos testes de solubilidade e na	
detecção/quantificação do CP4	7
Tabela 4 - Variação da área cromatográfica de amostras de CP (100 µg L <sup>-1</sup> ) em	
diferentes proporções de acetonitrila6	3
Tabela 5 - Método cromatográfico definido para quantificação e detecção de CP	
em meio aquoso em coluna Zorbax Eclipse Plus C186	<b>3</b> 7
Tabela 6 - Parâmetros de regressão da curva analítica e principais parâmetros de	
mérito6	8
Tabela 7 - Áreas cromatográficas das amostras dos controles de qualidade e	
cálculo de precisão e exatidão intra-dias6	9
Tabela 8 – Estabilidade do CP em meio aquoso (0,2% de ACN) a temperatura de	
4°C, sem presença de luz7	'0
Tabela 9 - Constante de velocidade de reação e tempo de meia vida do CP no	
processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e UVC7	'6
Tabela 10 - Imobilidade de <i>D. magna</i> em ensaio definitivo de ecotoxicidade	
aguda7	'8
Tabela 11 – Média dos resultados de imobilidade (%) de <i>D. magna</i> em amostras	
tratadas e não tratadas após processo UVC e UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 8	30
Tabela 12 - Imobilidade média (%) em <i>D. magna</i> após exposição às amostras-	
controle8	3
Tabela 13 - Imobilidade (%) de larvas de A. aegypti após exposição a diferentes	
concentrações de CP8	36
Tabela 14 - Imobilidade média (%) de larvas de A. aegypti após exposição a	
amostras tratadas por processo UVC e UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 8	8
Tabela 15 – Imobilidade média (%) de larvas de A. aegypti expostas as amostras-	
controle9	Ю
Tabela 16 - Parâmetros físico-químicos monitorados durantes as etapas de	
aclimatação e durante os testes de ecotoxicidade aguda com <i>D. rerio</i> 9	1

	Tabela 17 – Parâmetros físico-químicos monitorados durantes as etapas de
i	aclimatação e de testes com <i>D. rerio</i> no segundo ensaio95
-	Tabela 18 - Resultados do ensaio preliminar de fitotoxicidade do clorpirifós (CP
(	0,02 a 200 μg L <sup>-1</sup> em solução aquosa + 0,2% de ACN) em <i>L. sativa</i> 99
-	Tabela 19 - Resultados do ensaio de fitotoxicidade do clorpirifós (CP 200 μg L <sup>-1</sup>
(	em solução aquosa + 0,2% de ACN) após tratamento (180 min) por radiação UVC
(	e processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em <i>L. sativa</i> 101
-	Tabela 20 - Resultados do ensaio de fitotoxicidade de sementes de L. sativa
(	expostas as amostras-controle tratadas por 180 minutos102

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

AChE Enzima acetilcolinesterase

ACN Acetonitrila

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOP Processo Avançado de Oxidação (do inglês Advanced Oxidative Process)

CE<sub>50</sub> Concentração efetiva adversa para 50% dos organismos teste

CG Cromatografia a gás
CL Cromatografia a líquido

CL<sub>50</sub> Concentração letal para 50% dos organismos teste

CP Clorpirifós CPO Clorpirifós oxon

CQA Controle de qualidade de alta concentração CQB Controle de qualidade de baixa concentração CQM Controle de qualidade de média concentração

CT Controle

CV Coeficiente de variação

DAD Detector de arranjo de diodos (do inglês *Diode Array Detector*)

El Efeito inibitório

ENS Efeito não significativo

FAO Food and Agriculture Organization FDA U.S. Food and Drug Administration

FLT Faixa linear de trabalho

FM Fase móvel

HPLC Cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês High Performance Liquide

Chromatography)

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICR Índice de crescimento relativo

IG Índice de germinação

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO International Organization for Standardization

LD Limite de detecção

LMP Agarose de baixo ponto de fusão (do inglês Low melting point)

LQ Limite de quantificação

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NBR Norma Brasileira
OD Oxigênio dissolvido

OECD The Organization for Economic Co-Operation and Development
OMS Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization)

PAN Pesticide Action Network
PTFE Politetrafluoretileno

SPE Extração em fase sólida (do inglês Solid Phase Extraction)

TCP 3,5,6-tricloro-2-piridinol

USEPA United States Environmental Protection Agency

VMP Valor máximo permitido

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

 $\begin{array}{lll} ^{\circ}C & Graus \ C\'elcius \\ \mu S & Micro \ Siemens \\ ^{\circ}OH & Radical \ hidroxila \\ C_0 & Concentração \ inicial \\ \epsilon^0 & Potencial \ de \ oxidação \\ \end{array}$ 

Hv Radiação

K Constante de velocidade de reação

K<sub>d</sub> Coeficiente de adsorção Ln Logaritmo neperiano

mA mili Ampére

mUA Mili unidades de absorbância

mW Mili Watts nm Nanometro Pa Pascal

pKa Antilog da Constante de dissociação

r Coeficiente de correlação t½ Tempo de meia vida

t<sub>M</sub> Tempo morto

t<sub>R</sub> Tempo de retenção

W Watts

λ Comprimento de onda

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	INSETICIDA ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS	17
3.2	MÉTODOS DE ANÁLISE DO CLORPIRIFÓS	22
3.2.	1 Cromatografia a Líquido	22
3.2.2	2 Validação do Método	24
3.3	PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO APLICADOS AO ORGANOFOSFORA	.DO
CLC	ORPIRIFÓS	29
3.4	ECOTOXICIDADE APLICADA AO TRATAMENTO DE ÁGUA	Е
EFL	UENTES	36
3.4.	1 Ecotoxicidade do Clorpirifós	37
3.4.2	2 Ecotoxicidade com <i>Daphnia magna</i>	39
3.4.3	3 Ecotoxicidade com Aedes aegypti	41
3.4.4	4 Ecotoxicidade e Genotoxicidade com <i>Danio rerio</i>	42
3.4.	5 Fitotoxicidade com Lactuca sativa	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	SOLUÇÕES DE CLORPIRIFÓS	46
4.2	CONTROLE ANALÍTICO	46
4.2.	1 Análises Cromatográficas	46
4.2.2	2 Curva Analítica por Padrão Externo	48
4.2.3	3 Validação do Método Cromatográfico	48
4.2.4	4 Estabilidade do Clorpirifós em Solução Aquosa	50
4.2.	5 Peróxido de hidrogênio residual	50
4.3	DEGRADAÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE CLORPIRIFÓS P	OR
RAD	DIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50
4.4	BIOENSAIOS DE ECOTOXICIDADE	52
4.4.	1 Ecotoxicidade Aguda com Daphnia magna	52
4.4.2	2 Ecotoxicidade Aguda com Aedes aegypti	53

4.4.3 Ecotoxicidade Aguda com <i>Danio rerio</i> 55
4.4.4 Genotoxicidade com <i>Danio rerio</i> 56
4.4.5 Fitotoxicidade com Lactuca sativa58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO60
5.1 SOLUBILIDADE DE CLORPIRIFÓS EM ÁGUA60
5.2 CONTROLE ANALÍTICO64
5.2.1 Determinação Cromatográfica de Clorpirifós por HPLC-DAD64
5.2.2 Curva Analítica para Detecção em HPLC-DAD67
5.2.3 Análise de Precisão e Exatidão69
5.2.4 Estabilidade do Clorpirifós em Solução Aquosa70
5.3 ESTUDO CINÉTICO E DEGRADAÇÃO DE CLORPIRIFÓS POR RADIAÇÃO
UVC E PROCESSO UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 71
5.3.1 Estudos Cinéticos75
5.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE77
5.4.1 Ensaios de Ecotoxicidade Aguda de Clorpirifós com Daphnia magna77
5.4.5.1 Ecotoxicidade Aguda em D. magna de Amostras Tratadas de
Clorpirifós79
5.4.1.2 Ecotoxicidade das amostras-controle em D.magna82
5.4.2 Ensaios de Ecotoxicidade Aguda de Clorpirifós com Aedes aegypti86
5.4.2.1 Ecotoxicidade Aguda em A. aegypti de Amostras Tratadas de
Clorpirifós87
5.4.5.2 Ecotoxicidade das Amostras-controle em A. aegypti89
5.4.3 Ensaios de Ecotoxicidade Aguda de Clorpirifós com <i>Danio rerio</i> 91
5.4.4 Ensaios de Genotoxicidade de Clorpirifós com <i>Danio rerio</i> 92
5.4.5 Ensaios de Fitotoxicidade de Clorpirifós com Lactuca sativa99
5.4.5.1 Fitotoxicidade em L. sativa de Amostras Tratadas de Clorpirifós100
5.4.5.2 Ecotoxicidade das Amostras-controle em L. sativa
6 CONCLUSÕES103
REFERÊNCIAS105

# 1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são compostos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, pois causam efeitos tóxicos ao homem e aos demais seres vivos, exercem pressão seletiva nos organismos não alvos e alteram a dinâmica bioquímica natural dos ecossistemas (SPADOTTO et al., 2004).

Por esse motivo, muitos países estabelecem por vias normativas, níveis considerados seguros para ingestão e/ou contato humano. Em muitos casos, não se sabe ao certo o real nível tolerável para ingestão humana das substâncias ditas tóxicas devido à inexistência de estudos mais aprofundados (OMS, 2008), podendo este valor variar de mg L<sup>-1</sup> a ng L<sup>-1</sup>. Devido à toxicidade, muitas vezes desconhecida, a detecção de agrotóxicos em alimentos e água é alvo de preocupação, mesmo que em concentrações muito baixas.

Um dos principais veículos de contaminação humana por agrotóxicos é a água, através do contato com alimentos ou ingestão direta, sendo a atividade agrícola a principal via de contaminação das águas.

Estima-se que pelo menos 30% dos produtos aplicados nas lavouras sofra o processo de deriva (dispersão no meio ambiente) (LONDRES, 2011). No Brasil, apenas no período de 2009 a 2012, estima-se que em torno de 14.000 toneladas de agrotóxicos foram despejados no meio ambiente, considerando a quantidade de ingredientes ativos vendidos (IBAMA, 2012).

Além da perda pelos processos de deriva, outro problema a ser considerado é o uso de agrotóxicos proibidos. No Brasil, dos 84 ingredientes ativos vendidos em 2012 (IBAMA, 2012), 18 são proibidos pela regulação (EC) nº 1107/2009 da Comissão Europeia (EUROPEAN COMISSION, 2009), o que representa mais de 21% dos ingredientes ativos usados na agricultura.

Dentre esses agrotóxicos empregados em atividades agrícolas, os organofosforados têm sido amplamente utilizados em substituição aos organoclorados. Porém, além de serem considerados como compostos de médio risco de contaminação de águas superficiais, os mesmos apresentam efeitos tóxicos para a saúde humana e para a biota (ANDRADE *et al.*, 2011).

Clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-piridil-fosforo-tionato) (CP) é um composto organofosforado, considerado neurotóxico por ser inibidor da enzima

acetilcolinesterase (AChE) em animais (OMS, 2009; COLOVIC *et al.*, 2011) e por causar efeitos em biomarcadores enzimáticos e danos ao DNA (MULLER *et al.*, 2014). Devido à sua toxicidade, a Portaria do Ministério da Saúde n°2.914 de 2011 e a Resolução CONAMA n°396 de 2008 estabelecem um valor máximo permitido (VMP) para consumo humano de 30 μg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011), mesmo valor adotado em normativas europeias. Entretanto, nos Estados Unidos o VMP do CP em águas para consumo humano é de 0 μg L<sup>-1</sup> (PAN, 2014).

Os subprodutos originados da sua hidrólise e oxidação (3,5,6-tricloro-2-piridinol e o clorpirifós-oxon) também apresentam toxicidade, podendo ser mais persistentes no ambiente do que o CP, e podendo ser até mesmo encontrados após tratamento convencional em estações de tratamento de água e efluentes (USEPA, 2005). Neste contexto, o uso de tecnologias que proporcionem um tratamento efetivo destes compostos visando a mineralização completa, a redução da toxicidade e/ou o aumento da biodegradabilidade deve ser avaliada.

Processos Avançados de Oxidação, do inglês *Advanced Oxidativon Processes - AOPs*, têm sido estudados no tratamento de CP, atingindo eficiências elevadas (AFFAM; CHAUDHURI, 2014; SIVAGAMI; KRISHNA; SWAMINATHAN; 2014). Dentre eles, o estudo do processo baseado na reação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radiação UVC é um dos menos frequêntes.

Nos trabalhos já realizados, este processo tem apresentado grande eficiência no tratamento do CP (MURILLO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014) e na redução efetiva da toxicidade (FEMIA et al.; 2013). Contudo, há poucos registros de estudos de sua aplicação no tratamento de clorpirifós e, principalmente, relacionando o tratamento à redução da toxicidade do efluente gerado, uma vez que muitos trabalhos avaliam a eficiência de tratamento apenas quanto à redução da concentração do composto, não considerando a sua toxicidade final.

Desta forma, considerando a viabilidade do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o mesmo necessita ser estudado a fim de se obter maior eficiência de degradação associada à redução de toxicidade em diferentes níveis tróficos, e principalmente visando a mineralização de compostos não biodegradáveis possivelmente gerados durante o processo de degradação.

#### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a fitotoxicidade, ecotoxicidade aguda e genotoxicidade de clorpirifós em solução aquosa após tratamento por radiação UVC e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.20BJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar o método cromatográfico para detecção e quantificação de clorpirifós em solução aquosa;
- b) Avaliar e comparar a eficiência de degradação do clorpirifós por radiação
   UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em escala de bancada;
- c) Avaliar a ecotoxicidade aguda do clorpirifós para Daphnia magna (microcrustáceo), Aedes aegypti (larva de mosquito) e Danio rerio (peixezebra), a genotoxicidade para Danio rerio e a fitotoxicidade para Lactuva sativa (alface);
- d) Avaliar a ecotoxicidade aguda (*D. magna* e *A. aegypti*), a genotoxicidade (*D. rerio*) e a fitotoxicidade (*L. sativa*) de clorpirifós após tratamento por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 INSETICIDA ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS

Após a Segunda Guerra Mundial a principal classe de agrotóxicos empregada na agricultura e em meio urbano foi a dos organoclorados. Estes agrotóxicos são altamente estáveis, lipossolúveis e cronicamente tóxicos, permanecendo por vários anos no ambiente, onde ocorre a bioconcentração dos mesmos e, consequentemente, a bioacumulação em animais e biomagnificação em cadeias tróficas, causando danos irreversíveis a animais aquáticos (BAIRD; COLIN, 2011).

Os agrotóxicos organofosforados foram então sintetizados com o objetivo de serem menos tóxicos do que os organoclorados. Estes compostos são sintéticos, normalmente ésteres, amidas ou tióis derivados de ácido fosfórico, fosfônico, fosforotiamídicos ou fosforotióicos (IPCS-INCHEM, 2014), sendo considerado um dos maiores grupos de inseticidas usados atualmente (FLASKOS, 2011). Estes compostos são caracterizados pela presença de uma ligação P=O ou P=S, conforme Figura 1.

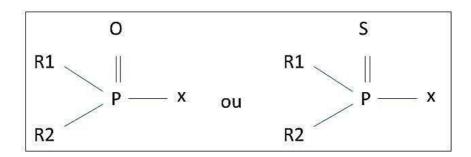


Figura 1- Estrutura química geral de organofosforados

Os grupos R1 e R2 são geralmente grupos alquila ou arila simples e X qualquer ramificação alifática, aromática ou grupos heterocíclicos ligados ao fósforo através de ligação altamente instável.

Organofosforados são menos persistentes no ambiente, porém apresentam toxicidade aguda a humanos e mamíferos, assim como os organoclorados (BAIRD; COLIN, 2011). Estes compostos são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), atacam o sistema nervoso e estão associados a estresse oxidativo, geração de radicais livres e oxidação de lipídeos podendo influenciar na má formação genética (COLOVIC *et al.*, 2011).

Mesmo sendo excretados rapidamente pelo organismo, a exposição contínua a pequenas doses destes compostos pode ocasionar efeitos danosos em animais e humanos, sendo dessa forma considerado um composto de risco para a saúde e para o meio ambiente (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Os organofosforados são facilmente absorvidos por via cutânea, respiratória e gastrointestinal (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). No organismo animal os organofosforados que contém a ligação P=S são ativados pelo citocromo P450, através de dessulforação oxidativa (oxidação da ligação P=S), formando compostos oxon (P=O) (QIN *et al.*, 2014).

Dentre os compostos organofosforados, o clorpirifós (CP) é um dos mais utilizados, sendo encontrado no meio ambiente juntamente com seus metabólitos. Embora o CP tenha sido banido nos EUA, o seu uso é frequente no Brasil e em outros países como Índia, Argentina, China e países da União Europeia. No Brasil, é empregado como ingrediente ativo em 19 produtos comerciais registrados para aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate, trigo e banana ou no controle de formigas (MAPA, 2014).

O último boletim anual sobre produção, importação, exportação e vendas de produtos agrotóxicos no Brasil elaborado pelo Ibama (2013) descreveu o clorpirifós como o 7° ingrediente ativo mais vendido naquele ano, representando cerca de 13 mil toneladas do composto.

A solubilidade do CP em água é baixa, conforme indicado na Tabela 1 (PAN, 2014), mas sua mobilidade é alta podendo ser encontrado a grandes distâncias do ponto de aplicação (DEVI; MURTHY; KUMAR, 2009).

Devido à baixa solubilidade e a outros parâmetros (tempo de meia vida e coeficiente de adsorção à matéria orgânica), o risco de contaminação de águas

superficiais é considerado médio, pelo método GOSS<sup>1</sup>. Contudo, alguns estudos têm identificado com frequência a presença de CP em água superficial, como no caso de estudo realizado por Leong, Tian e Mustafa (2007), onde foi detectada uma concentração de CP na faixa de 23,4 a 92,9 ng L<sup>-1</sup>, no rio Selangor na Malásia.

Segundo Andrade *et al.* (2011), com base no mesmo método, o CP não apresenta risco de contaminação para águas subterrâneas. Porém, de acordo com Juraro *et al.* (2012), concentrações de CP acima de 0,5 µg L<sup>-1</sup> em água subterrânea já foram detectadas. Seus metabólitos clorpirifós-etil e 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) também foram encontrados nas concentrações de 0,29 µg L<sup>-1</sup> e 15,00 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente (ESTÉVEZ *et al.*, 2012; POSTIGO; BARCELÓ, 2015). A Tabela 1 apresenta as características físicas e químicas do clorpirifós.

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do inseticida clorpirifós

Propriedades	Característica		
Nome químico	O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato		
Fórmula química	$C_9H_{11}CI_3NO_3PS$		
Estrutura	CH <sub>3</sub> O N CI		
Massa molecular	350,6 g mol <sup>-1</sup>		
Ponto de fusão	42 – 44 °C		
Ponto de ebulição	300 °C		
Pressão de vapor a 25°C	1.0 x 10 <sup>-3</sup> Pa		
Densidade a 21°C	1,51 g mL <sup>-1</sup>		
Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	1,05 a 20 °C e 0,39 a 19,5 °C		
Coeficiente de adsorção K <sub>d</sub>	9,930		
Meia vida em água (dias)	>2		
Meia vida em solo (dias)	>30		
Constante de dissociação (pka)	Não contém prótons ionizáveis		

Fonte: EUROPEAN COMMISSION (2005); OMS (2009); PAN (2014).

1

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Método GOSS: método que considera o coeficiente de adsorção à matéria orgânica (Koc), a meia vida no solo e a solubilidade do composto em água a 20°C. Este método estima a contaminação de águas superficiais.

Em meio líquido, o CP é menos persistente que em solo. Tiwari e Guha (2013) estudaram a degradação do agrotóxico em meios aeróbios e anaeróbios, tanto em solo quanto em água e os resultados indicaram meia vida (t½) de 6,1 a 38,1 dias em água e 17,9 a 128 dias em solo, respectivamente.

Outra característica do CP é sua toxicidade, sendo este classificado como moderadamente tóxico ( $CL_{50} = 332 \text{ mg kg}^{-1}$  para ingestão e  $CL_{50} = >3000 \text{ mg kg}^{-1}$  para contato dérmico em ratos), uma vez que o modo de ação inseticida ocorre através da inibição da enzima AChE, resultando no acúmulo de acetilcolina e interrupção de impulsos nervosos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os subprodutos deste composto, contudo, podem ser mais tóxicos do que a molécula inicial. Esses subprodutos são geralmente formados em condições de oxidação, hidrólise e biodegradação (COLOVIC *et al.*, 2011; FLASKOS, 2011; ROBLES-MOLINA *et al.*, 2012).

Um dos subprodutos da degradação (metabólitos) do CP é o clorpirifós oxon (CPO), resultante da oxidação da ligação P=S. A presença desta ligação confere maior potencial de inibição da enzima AChE, sendo este responsável pela maioria das fatalidades ocorridas com o clorpirifós (FLASKOS, 2011). Outro subproduto é o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), resultante da hidrólise direta do CP ou da hidrólise do CPO. Este composto não é neurotóxico, porém é considerado mais persistente que o clorpirifós, podendo ser limitante para a completa mineralização do mesmo devido à inibição da ação microbiana (ANWAR *et al.*, 2009; CHISHTI *et al.*, 2013).

Quando comparado ao clorpirifós, o TCP é mais solúvel em água (80,9 mgL<sup>-1</sup> a 25°C), causando a contaminação generalizada do solo e da água, devido à fácil dissolução (ANWAR *et al.*, 2009).

Em condições de fotodegradação indireta, estima-se que o CP é quase totalmente convertido em CPO logo no início do processo de degradação, e que a transformação deste composto em TCP ocorre após maior tempo de exposição à radiação, porém em menor quantidade, o que indica a formação de outros metabólitos durante o processo (KRALJ; FRANKO; TREBSE, 2006).

Em condições aeróbias, o CP pode gerar os subprodutos TCP e dietiltiofosfato (DEP) ou CPO, os quais por meio de metabolismo microbiológico podem gerar outros produtos (TIWARI; GUHA, 2013). Os principais metabólitos do CP bem como as vias de degradação biológica e físico-química são apresentados na Figura

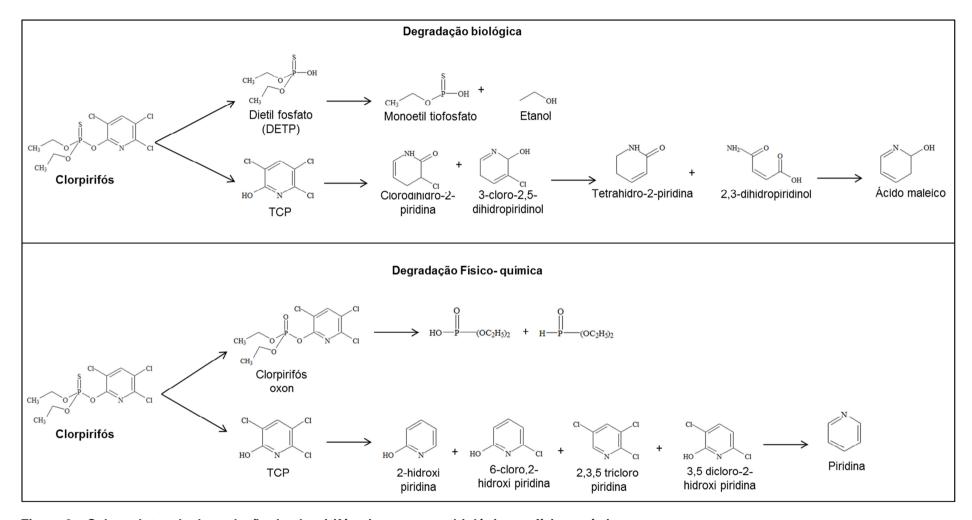


Figura 2 – Subprodutos de degradação do clorpirifós via processos biológicos e físico-químicos.

Fonte: Adaptado de LIU; MCCONNELL; TORRENTS, 2000; DEVI; MURTHY; KUMAR, 2009; ZHANG et al., 2011; KARPUZCU; SEDLAK; STRINGFELLOW, 2012.

# 3.2 MÉTODOS DE ANÁLISE DO CLORPIRIFÓS

#### 3.2.1 Cromatografia a Líquido

A determinação de agrotóxicos em amostras ambientais é complexa, principalmente devido às baixas concentrações em que estes compostos são encontrados no meio ambiente e pela complexidade das matrizes ambientais. Dessa forma, o método mais sensível e preciso para a detecção de agrotóxicos é por meio de métodos de cromatografia a gás (CG) ou a líquido (CL).

A cromatografia a gás é eficiente para análise de compostos voláteis tais como óleos essenciais e produtos petroquímicos, sendo sua manipulação fácil, possibilitando analisar misturas voláteis de alta complexidade. Contudo, compostos não suficientemente voláteis e termicamente instáveis não são analisados adequadamente por CG. Nestes casos, a cromatografia a líquido (principalmente de alta eficiência) é empregada, desde que o composto apresente solubilidade na fase móvel (CIOLA, 1998).

A cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquide Chromatography - HPLC*) é um método de separação possível devido a interações entre substâncias presentes em uma mistura/solução e uma fase estacionária e uma fase móvel (geralmente acetonitrila ou metanol em água) (MARTINS, 2008).

Dentre os principais mecanismos que devem ser considerados em um método de cromatografia a líquido, estão a forma de separação cromatográfica e o método de detecção das substâncias de interesse.

A separação cromatográfica pode ser realizada através de eluição isocrática ou por gradiente. Na eluição isocrática, a fase móvel é mantida constante durante o tempo de análise e o tempo é reduzido, porém, em casos onde a amostra é composta por substâncias com ampla faixa de retenção, a opção pela eluição por gradiente é a mais adequada, possibilitando melhor separação de substâncias (MARTINS, 2008).

A separação por gradiente ocorre através da modificação da fase móvel durante o tempo de análise, sendo o solvente orgânico aumentado gradativamente.

Em modo gradiente, a separação das substâncias torna-se mais adequada, facilitando a detecção dos analitos de interesse (MARTINS, 2008).

A detecção de determinado composto em cromatografia a líquido é realizada através de um detector cromatográfico, o qual converte uma propriedade química ou física de um analito em um sinal elétrico, relacionado à concentração deste analito (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

No caso de agrotóxicos, muitos estudos empregaram CL de alta eficiência com detector UV/visível, na região de 190 a 700 nm (CÁCERES *et al.,* 2007; WU; LINDEN, 2010; ROBLES-MOLINA *et al.,* 2012). De acordo com a literatura, para análises do CP e seus metabólitos, a detecção é realizada principalmente por arranjo de fotodiodos, detector de arranjo de diodos e detectores acoplados a espectrometria de massas, sendo geralmente empregados colunas C18, como apresentado no Quadro 1.

Detector	Fase móvel	Coluna	F.L.T	Matriz analisada	Autor(es)
Arranjo de diodos	Acetonitrila:água (gradiente 0- 100%)	C8 (4.6 x 150 mm, 5 mm)	-	AS + Padrão CP	Cáceres et al. (2007)
Arranjo de diodos	,		-	AS, ASB, AT, AD + Padrão CP	Muhamad (2010)
Arranjo de diodos	Acetonitrila:água (80:20)	C18 (7.5 x150 mm)	-	AU + CP Comercial	Wu; Linden (2010)
Analisador de massas (LC- QTOF)	massas (LC- Acetonitrila:água (gradiente)		-	Água residual	Robles- Molina et al. (2012)
Arranjo de fotodiodos (PDA)	fotodiodos Acetona:água		-	AU + Padrão CP	Hossain et al. (2013)
Arranjo de fotodiodos (PDA)	fotodiodos Acetonitrila:agua		-	Água* + CP Comercial	Sivagami et al. (2014)
Arranjo de diodos	Acetonitrila:água acidificada (75:25)	ODS (4,3 mm, 5 μm d.i)	10-200 ng L <sup>-1</sup> and 2.5-12.5 µg L <sup>-1</sup>	-	Gomathy <i>et al.</i> (2015)
Analisador de massas (LC- QTOF)	Metanol:água (gradiente)	C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm d.i)	2-200 μg L <sup>-1</sup>	Água* + CP Comercial	Alharbi <i>et al.</i> (2016)

Quadro 1 – Métodos de análise cromatográfica do composto clorpirifós.

Nota: F.L.T: Faixa linear de trabalho; AS: Água superficial; ASB: Água subterrânea; AT: Água de torneira; AD: Água destilada; AU: Água ultrapura; \*: Não especificado; (-): Não informado.

Dentre as facilidades dos detectores DAD pode-se citar a capacidade de análise em todos os comprimentos de onda, a obtenção de maior qualidade na verificação do composto e a possibilidade de verificação da pureza do pico (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009; CALDAS *et al.*, 2011). Já o acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas, proporciona além das vantagens supracitadas, a obtenção de informação estrutural do composto de interesse, massa molar e aumento da seletividade (VÉKEY, 2001).

Mesmo através do emprego de detectores com maior capacidade de análise, muitas vezes a concentração do analito de interesse em amostras reais (águas superficiais/subterrâneas, alimentos, etç) é muito baixa, impossibilitando a sua detecção. Nestes casos, torna-se necessária a aplicação de técnicas de extração, dentre elas as técnicas de extração em fase sólida, microextração em fase sólida, extração sortiva em barra magnética e microextração líquido-líquido dispersiva, muito empregadas para determinação de agrotóxicos (CALDAS et al., 2011).

#### 3.2.2 Validação do Método

Para que um método cromatográfico seja aceito para a determinação de agrotóxicos e outros compostos é necessária a comprovação da qualidade das medições químicas, através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade do método realizado. Para tanto, torna-se necessária a validação do método cromatográfico.

Existem diversos guias para validação de métodos cromatográficos, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação, em caráter de orientação. Dentre estes guias pode se citar o Manual de Garantia de Qualidade Analítica (MAPA, 2011), o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003), o guia *Validation of chromatography methods* (FDA, 1994), o documento de orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (INMETRO, 2011) e dois guias direcionados para validação de métodos analíticos para agrotóxicos: o Manual de resíduos de pesticidas em alimentos da GARP e a *Guidelines on good laboratory practice in pesticides residue analysis* (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

De acordo com o Guia Anvisa para Qualidade em Química Analítica (ANVISA, 2005), validação do método são verificações realizadas a fim de garantir que as características de desempenho de um método sejam atendidas e para demonstrar que o método é adequado à finalidade proposta.

Os principais parâmetros para validação do método são: seletividade, faixa de medição ou faixa linear de trabalho, exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 3.2.2.1 Seletividade

Segundo Ribani et al. (2004) a seletividade do método é a capacidade de avaliar a presença de um analito em meio a uma amostra complexa, sem que haja equívocos na sua determinação. Este parâmetro pode ser obtido através da comparação da matriz sem o analito de interesse e a matriz com o analito, sendo que no segundo caso não pode haver coeluição de outras substâncias juntamente com o analito.

Outra forma de obtenção deste parâmetro é pela detecção e comparação do pico do composto com o pico de um padrão. A terceira forma de obtenção é através da comparação de duas curvas, uma contendo o padrão e outra não. Neste caso, as duas curvas devem ser paralelas. Este último método é realizado quando não é possível obter uma matriz isenta do analito de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Quando não é possível avaliar interferentes, sugere-se que seja feita a avaliação de diferentes métodos de medição do analito ou avaliada variações nas condições instrumentais (INMETRO, 2011).

#### 3.2.2.2 Limite de detecção (LD)

É a menor concentração de um determinado analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2011). Sua determinação é realizada principalmente através de dados da curva analítica, dado pela equação  $LD = 3.3 \times s/S$ , onde **s** é a

estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta e **S** é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 3.2.2.3 Limite de quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito que pode ser quantificada com um nível de incerteza aceitável (ANVISA, 2005). Sua determinação pode ser realizada utilizando os mesmos critérios para determinação do LD, porém assumindo o limite como sendo 10 desvios padrão (RIBANI *et al.*, 2004) ou pelo método visual pela relação sinal-ruído. Porém, para métodos cromatográficos onde o LQ e o LD podem ser afetados pelo método, a melhor forma de determinar o LQ é através dos parâmetros da curva analítica.

#### 3.2.2.4 Faixa Linear de Trabalho

A faixa linear de trabalho (FLT) é a faixa de concentrações de um analito no qual o método pode ser aplicado, dentro de uma faixa admissível de incerteza (ANVISA, 2005; INMETRO, 2011). Sua determinação é realizada através da plotagem de uma curva de calibração calculada através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, com mínimo de 5 níveis de concentração diferentes (ANVISA, 2005).

O limite inferior da FLT é definido de acordo com o limite de quantificação definido para o respectivo método e o limite superior depende do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2011).

#### 3.2.2.5 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método em fornecer resultados condizentes com a concentração de um analito, dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004). A linearidade pode ser avaliada através dos coeficientes de regressão linear **a** e **b** e pelo coeficiente de correlação **r**, obtidos da equação da regressão linear (com mínimo de 5 níveis de concentração) (ANVISA, 2003).

O critério para aceitação da linearidade varia de acordo com o guia de validação. Sugere-se que seja avaliada a existência de *outliers* (dados discrepantes) antes da verificação da linearidade. Após esta verificação, é definido o r (coeficiente de correlação) da reta, a partir dos mínimos quadrados. O valor de r aceito deve ser maior que 0,99 de acordo com a ANVISA (2003) e acima de 0,995 conforme orientado no Manual de garantia de qualidade analítica (MAPA, 2011).

#### 3.2.2.6 Precisão

É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes em condições definidas (MAPA, 2011). A precisão pode ser expressa através de ensaios de repetitividade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, sendo geralmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (CV %) (FDA, 1994; INMETRO, 2011), calculados conforme apresentado no Quadro 2.

Cálculo	Descrição		
	$ar{x}$ é a média aritmética do número de medições		
$\sum_{x} (x - \bar{x})^2$	$\mathit{x}_i$ é o valor individual de uma medição		
$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	n é o número de medições		
\ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \	S é a estimativa do desvio padrão		
	$ar{x}$ é a média aritmética do número de medições		
$CV = \frac{s}{v} \times 100$	s é o desvio padrão da amostra		
X	CV é o coeficiente de variação		

Quadro 2 – Determinação de precisão do método Fonte: Adaptado de RIBANI et al. (2004).

A repetitividade pode ser avaliada através da análise de amostras em várias concentrações dentro da FLT, sendo o número de replicatas para cada nível de concentração definido de acordo com a rotina laboratorial (INMETRO, 2011). A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob condições onde há variação de analista, equipamentos ou tempos e a reprodutibilidade é avaliada através de comparações inter-laboratoriais.

A ANVISA (2003) sugere a avaliação de várias medidas efetuadas em três níveis de concentração, em triplicata, dentro do intervalo linear definido para o método analítico, sendo elas de baixa, média e alta concentração. Em condições de repetitividade, o CV deve ser <15% de acordo com a ANVISA (2003) e <20% de acordo com Ribani *et al.* (2004) e MAPA (2011) para análises de amostras em baixas concentrações.

#### 3.2.2.7 Exatidão

É o grau de concordância entre o resultado medido e um valor considerado verdadeiro. A exatidão será expressa através da relação entre a concentração média determinada pela análise das concentrações e a concentração teórica e pode ser avaliada através de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com a ANVISA (2003), a exatidão deve ser determinada através da análise de três concentrações, em triplicata, dentro do intervalo linear definido para o método analítico. A exatidão será expressa através da relação entre a concentração média determinada pela análise das concentrações e a concentração teórica. O mesmo procedimento é descrito no Manual de garantia de qualidade analítica (MAPA, 2011) e no documento de Orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2011).

Os valores obtidos de exatidão devem estar entre o intervalo de 70 a 120% (RIBANI *et al.*, 2004) desde que a precisão não ultrapasse 20%. Já pela norma da Anvisa (ANVISA, 2003), a exatidão não deve exceder 15%, exceto pelo limite de quantificação que pode exceder 20%.

#### **3.2.2.8** Robustez

É determinada variando-se procedimentos/parâmetros que podem ter ou não influência sobre o desempenho do método (ANVISA, 2005), como exemplo a variação do solvente orgânico, da temperatura, do tempo de extração, vazão, etc. Considera-se que um método é robusto quando as variações do método não afetam o mesmo (RIBANI *et al.*, 2004).

# 3.3 PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO APLICADOS AO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS

Os agrotóxicos são, em geral, compostos recalcitrantes, e em sua maioria são dificilmente degradados em sistemas biológicos convencionais de tratamento (reatores aeróbios e anaeróbios, lodos ativados, entre outros), devido a sua toxicidade.

Esses compostos podem ser encontrados no ambiente em concentrações muito baixas, tais como os organofosforados metolaclor, clorfenvinfós e clorpirifós, detectados em concentrações de 9 a 312 ng L<sup>-1</sup> na água do rio Ebro (Espanha) (GÓMEZ *et al.*, 2012).

Os compostos organofosforados são considerados menos persistentes que os organoclorados, contudo há formação de subprodutos mais tóxicos que o composto inicial durante a sua degradação, os quais inibem os processos convencionais de tratamento (USEPA, 2005). Sendo assim, os principais processos estudados na degradação de agrotóxicos organofosforados verificados em trabalhos recentes, incluindo o CP, são os processos biológicos enzimáticos e os processos avançados de oxidação (do inglês *Advanced Oxidation Processes - AOPs*).

Em relação ao tratamento enzimático, sabe-se que a degradação dos organofosforados ocorre por meio de oxidação e hidrólise, sendo as principais enzimas envolvidas as fosfotriesterases e carboxilesterases (SILVA, 2013).

Os *AOP* assistidos por radiação UV têm sido estudados para o tratamento de organofosforados, pois possibilitam a formação de radicais hidroxila com alto potencial de oxidação no meio reacional (WU; LINDEN, 2010).

Alguns trabalhos publicados entre 2007 e 2016 são apresentados no Quadro 3, referente ao tratamento de CP via processos enzimáticos e *AOP* em meio líquido.

Tratamento	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Resultado	Tempo de reação	Avaliação toxicidade	Autor (es)
Degradação microbiana (Sphingomonas sp.)	20	Degradação total de 100 mg L <sup>-1</sup>	2 dias	-	Li; He; Li (2007)
Radiação ultrasônica	2	Degradação de até 85%	60 minutos	-	Zhang <i>et al.</i> (2011)
UV/ TiO <sub>2</sub>		Eficiência de degradação até 80%		-	
Vis/TiO <sub>2</sub>	5	Eficiência de degradação acima de 50%	120 minutos	-	Muhamad (2010)
solar/ TiO <sub>2</sub>		Eficiência de degradação acima de 50%		-	
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15	Eficiência superior a 90%	50 minutos	Vibrio fischeri	Femia et al. (2013)
Radiação solar	20	Eficiência de 39,5% e 51,95% em água destilada e água de lagoa, respectivamente	12 dias	ı	
	5	Degradação total do composto	-	-	Hossain <i>et al.</i> (2013)
Radiação gama	10	Degradação de aproximadamente 70%	-	-	
	20	Degradação de aproximadamente 65%	-	-	
Biodegradação (Sphingobacteriumsp. JAS3)	300	Degradação total	12 horas	-	Abraham; Silambarasan (2013)
Radiação gama	0,2 a 1	Degradação superior a 80%	ı	-	Ismail <i>et al.</i> (2013)
Solar/ TiO <sub>2</sub>	10	Degradação superior a 80%	5horas	-	Sivagami; Krishna; Swaminathan (2014)
UV/ TiO <sub>2</sub>	10	Degradação superior a 95%	60 minutos	-	Amalraj; Pius (2015)
Degradação microbiana Pseudomonas kilonensis	150	Degradação total	4 dias	-	Khalid; Hashmi; Khan (2016)

Quadro 3 - Publicações referentes à processos de remoção e degradação do clorpirifós em meio líquido (período entre 2007 e 2016).

Nota: Conc.: Concentração; (-): dado não informado/não realizado.

Os processos de degradação e remoção de CP em meio líquido, pelos processos enzimáticos ou *AOP*s, apresentaram considerável eficiência de tratamento (>50%). Contudo, ressalta-se que apenas a avaliação da concentração após o tratamento não garante uma correta avaliação da eficiência do processo, uma vez que após o tratamento, pode haver aumento da ecotoxicidade devido à geração de subprodutos de degradação mais tóxicos.

Na literatura, poucos trabalhos avaliaram a ecotoxicidade do CP após algum tipo de tratamento, sendo que os mais recentes avaliaram a toxicidade através de testes com biomarcador enzimático e com a bactéria *Vibrio qinghaiensis sp* (KRALJ; FRANKO; TREBSE, 2007; ZHANG *et al.*, 2011) após degradação por radiação UVC e por ultrasson.

De acordo com os trabalhos relacionados no Quadro 3, apenas um avaliou a ecotoxicidade após o processo de tratamento do CP, sendo este trabalho realizado com apenas um organismo teste, a bactéria *Vibrio fischeri*.

#### 3.3.1 Processos Avançados de Oxidação

Os Processos Avançados de Oxidação baseiam-se na geração *in situ* de espécies extremamente reativas, com destaque aos radicais hidroxilas (\*OH). Estes processos têm atraído interesse pela potencialidade nos mesmos na degradação de compostos refratários e compostos orgânicos persistentes, como os agrotóxicos, devido à oxidação e possível mineralização da matéria orgânica (BADAWY; GHALY; GAD-ALLAH, 2005).

A geração de radicais hidroxila pode ser obtida através de reações eletroquímicas, fotoquímicas e por catálise homogênea e heterogênea (KLAMERTH et al., 2010) e seu poder de oxidação é grande ( $\varepsilon^0 = 2.8 \text{ V}$ ), quando comparado com outros oxidantes (Tabela 2). Dentre as reações que geram estes radicais, a mais comum é a reação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) sobre radiação ultravioleta (LOURES et al., 2013), na qual são formadas duas moléculas de radicais hidroxila.

Tabela 2 - Potenciais redox de alguns agentes oxidantes

Agonto ovidente	Potencial de oxidação ε <sup>0</sup> , V,	
Agente oxidante	25 °C	
Flúor	3,03	
Radical hidroxila	2,80	
Oxigênio atômico	2,42	
Ozônio	2,07	
Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1,78	
Radical perhidroxil (HO <sub>2</sub> )	1,70	
Dióxido de cloro	1,57	
Ácido hipocloroso	1,49	
Cloro	1,36	
Bromo	1,09	
lodo	0,54	

Fonte: LOURES et al.(2013).

Três mecanismos principais podem degradar os compostos de interesse através da formação de radicais hidroxila: abstração de hidrogênio (Equação 1), transferência de elétrons (Equação 2) ou adição radicalar (Equação 3) (LOURES *et al.*, 2013). Dessa forma, há formação de espécies instáveis que tendem a se fragmentar até a sua completa mineralização.

$$R + HO \rightarrow R' + H_2O$$
 (1)

$$R + HO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + OH^{-}$$
 (2)

Os processos avançados de oxidação podem ocorrer em dois principais meios: homogêneo e heterogêneo. Em meio homogêneo há o uso de geradores de radicais livres, tais como peróxido de hidrogênio, ozônio, sulfato ferroso, etc. Em meio heterogêneo há a predominância do uso de semicondutores como o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>).

Os processos podem ainda ser assistidos por radiação ultravioleta ou visível, artificial ou solar, conforme apresentado no Quadro 4.

Sistema	Com radiação	Sem radiação
	O <sub>3</sub> /UV	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> /UV	
	Feixe de elétrons	
	Ultrassom	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Homogêneo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ultrassom	O <sub>3</sub> /°OH
	UV/ultrassom	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> (Fenton)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> /UV (Foto-fenton)	
	Foto-elétro-fenton	
	V-UV (λ<190 nm)	
	γ-radiólise	
	Sc/O <sub>3</sub> /UV	
	Sc/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	
Heterogêneo	Sc/UV	Eletro-Fenton
	Fotoeletroquímico	
	Ferro suportado/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (foto-Fenton)	

Quadro 4 – Sistemas utilizados para geração de radicais hidroxila em AOP.

Fonte: Adaptado de HUANG; DONG; TANG (1993); LOURES et al.(2013);

ANTONOPOULOU et al. (2014).

Nota: Sc: semicondutor.

A radiação ultravioleta empregada nos processos avançados de oxidação é dividida em UV-A (de 320-400 nm), UV-B (de 280-320 nm) e UV-C (de 200-280 nm). A radiação pode ser obtida por diversos tipos de lâmpadas (MISRA, 2015).

Embora os *AOP* tenham sido classificados como tratamentos caros, o custo poderia ser minimizado e otimizado através de metodologias para reciclagem do catalisador, aplicação de processos de tratamento integrados e a utilização de energias renováveis, tal como a radiação solar (SHAWAQFEH; MOMANI, 2010). O Quadro 5 apresenta as vantagens e desvantagens dos *AOP*.

Vantagens	Desvantagens	
Podem proporcionar a completa	Alguns processos ainda não são aplicáveis a	
mineralização dos poluentes;	escalas comerciais e industriais;	
Utilizados para a destruição de	Há restrições quando em grandes	
compostos refratários resistentes a outros	concentrações de contaminante;	
tratamentos, tais como biológico;	Pode ser necessário o controle da concentração	
Permite a conversão de compostos	do composto oxidante e do pH, durante e pós-	
recalcitrantes e refratários em compostos	tratamento e destino final do resíduo gerado.	
biodegradáveis;		
Possui forte poder oxidante;		
A formação de subprodutos pode ser		
minimizado se quantidades otimizadas de		
reagentes são empregados.		

Quadro 5 – Principais vantagens e desvantagens de processos avançados de oxidação. Fonte: LOURES *et al.* (2013).

# 4.2.5 Processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Estudos recentes têm sido desenvolvidos para aplicação do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento de contaminantes emergentes, tais como agrotóxicos e fármacos (DE LA CRUZ *et al.*, 2013; FEMIA *et al.*, 2013; ANTONIOU; ANDERSEN, 2014).

Este processo torna-se vantajoso em relação a outros processos, pois o  $H_2O_2$  é um oxidante facilmente encontrado no mercado, de fácil manuseio e completamente miscível em água.

O mecanismo caracteriza-se pela clivagem homolítica de uma molécula de peróxido de hidrogênio, formando dois radicais hidroxila, conforme equação 4. Devido ao alto poder de oxidação do radical hidroxila gerado, a matéria orgânica é oxidada gerando mais radicais orgânicos (Equação 5), os quais podem formar novamente radicais hidroxila (Equação 6) ou prosseguir com as reações até que haja a mineralização da matéria orgânica em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e íons inorgânicos (MARTINS, 2013).

$$H_2O_2 \stackrel{hv}{\rightarrow} 2 HO^{\bullet}$$
 (4)

$$RH + HO^{\bullet} \rightarrow H_2O + R^{\bullet}$$
 (5)

$$R^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow ROH + HO^{\bullet}$$
 (6)

A eficiência da reação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ser avaliada quanto à radiação incidente, pois a fotólise completa do peróxido de hidrogênio ocorre em comprimentos de onda inferiores a 280 nm (UVC), principalmente em 254 nm. Dessa forma, em comprimentos de onda superiores, não ocorre formação significativa de radicais hidroxila, comprometendo o processo de tratamento (MOMANI; SANS; ESPUGLAS, 2003).

Além da incidência de radiação UV deve-se considerar o excesso de peróxido de hidrogênio no meio reacional, pois elevadas concentrações de  $H_2O_2$  podem ocasionar uma reação de recombinação entre as moléculas de peróxido e de radical hidroxila formado no meio, conforme apresentado na equação 7 (GUIMARÃES et al., 2008).

$$H_2O_2 + HO^{\bullet} \rightarrow H_2O + HO_2^{\bullet} \tag{7}$$

Para o fornecimento de radiação nos comprimentos de onda especificados, podem ser utilizadas lâmpadas de xenônio, as quais emitem radiação num intervalo de 210-240 nm. Porém, devido ao custo elevado, são usualmente empregadas lâmpadas de mercúrio, que apresentam intensidade máxima em 254 nm (DE LA CRUZ et al., 2013).

O processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi inicialmente proposto para degradação de agrotóxicos em meados dos anos 2000. Um dos primeiros trabalhos publicados foi realizado por CHU (2000) para degradação do composto 2,4-D. Através deste estudo, foi possível verificar a dependência da taxa de degradação em relação ao pH, sendo verificadas maiores eficiências em pH extremos, não próximos a neutralidade. Valores de pH muito baixos possibilitaram maior decomposição do peróxido de hidrogênio, reduzindo a eficiência do processo de degradação.

O experimento realizado por Chu obteve ainda resultados melhores com o aumento da proporção de peróxido em relação à concentração do analito, em pH

neutro, sendo uma relação  $H_2O_2/2,4$ -D igual à 12,5 a que apresentou o melhor resultado de degradação (CHU, 2000).

Em relação ao CP, maior eficiência na degradação deste agrotóxico também foi verificada quando maiores proporções de peróxido (relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CP maior que 8) foram utilizadas, em pH natural, em trabalho realizado por Femia *et al.* (2013).

# 3.4 ECOTOXICIDADE APLICADA AO TRATAMENTO DE ÁGUA E EFLUENTES

A ecotoxicologia é uma vertente da toxicologia e diferencia-se desta no sentido de que integra os conceitos de ecologia aos estudos de toxicidade, ou seja, é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias naturais ou sintéticas e efluentes industriais sobre os organismos vivos, quando liberadas no meio ambiente (AZEVEDO; CHASIN, 2003; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

De acordo com Knie e Lopes (2004), a análise ecotoxicológica tem a finalidade de verificar se as substâncias químicas são nocivas e em qual grandeza, como e onde se manifestam seus efeitos.

O estudo toxicológico de efluentes, pré e pós-tratamento, é uma ferramenta para a determinação de efeitos deletérios de agentes químicos sobre o meio ambiente, possibilitando a verificação das características ecotoxicológicas de substâncias químicas, mecanismos de ação sobre organismos vivos, definição de diretrizes para controle da qualidade de efluentes e avaliação da eficiência de processos de tratamento (KNIE; LOPES, 2004; AREZON; NETO; GERBER, 2011; RIZZO, 2011).

A toxicidade de agentes químicos em organismos vivos é definida por ensaios ecotoxicológicos, a fim de avaliar o impacto dos poluentes nos organismos de interesse. Em ensaios laboratoriais, os organismos testes são expostos a várias concentrações da amostra teste (substância química ou efluente) por determinados períodos de tempo. Dessa forma, é possível averiguar parâmetros biológicos como mortalidade, crescimento, comportamento e reprodução.

Os ensaios de toxicidade podem ser realizados com organismos testes em diferentes níveis tróficos: organismos produtores (ex: algas), consumidores primários

(ex: microcrustáceos), consumidores secundários (ex: peixes) e decompositores (ex: bactérias) (AREZON; PEREIRA NETO; GERBER, 2011).

Devido à possibilidade de formação de compostos mais tóxicos durante os processos de tratamento, é indicado que a eficiência de processos de tratamento, dentre eles os *AOP*, seja avaliada através de testes de ecotoxicidade (KRALJ; TREBSE; FRANKO, 2007; RIZZO, 2011).

## 3.4.1 Ecotoxicidade do Clorpirifós

Compostos organofosforados são inibidores da enzima AChE. O modo de inibição enzimática é considerado irreversível, uma vez que a enzima acetilcolinesterase se torna fosforilada após a reação com organofosforados, impedindo a transmissão de impulsos nervosos em algumas fibras do sistema nervoso, a transmissão neuro-humoral do nervo motor estriado e na transmissão de algumas sinapses interneurais do sistema nervoso central (AZEVEDO; CHASIN, 2003; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

A interferência na atividade da acetilcolinesterase foi comprovada para o CP através de testes em diferentes organismos, tais como *Acanthochromis polyacanthus* (peixe), *Daphnia carinata* (crustáceo), *Biomphalaria glabrata* (molusco), *Lumbriculus variegatus* (anelídeo), *Paratya australiensis* (artrópode) e *Vibrio qinghaiensis sp* (bactéria) (ZHANG et al., 2011; BOTTÉ et al., 2012; RIVADENEIRA et al., 2013).

Além da interferência na acetilcolinesterase, muitos estudos comprovaram a toxicicidade aguda do CP em organismos de diferentes níveis tróficos. De acordo com artigo de revisão realizado por John e Shaike (2015), o CP pode causar efeito inibitório na germinação de *Pinus halepensis*, *Lolium multiflorum*, leguminosas, cereais e outras plantas, bem como a interferência no crescimento e na biomassa das raízes.

Estudos empregando microcrustáceos têm sido desenvolvidos principalmente com *Daphnia sp.* Cáceres *et al.* (2007) estudaram a toxicidade aguda do CP em *D. carinata*, obtendo uma CE<sub>50</sub> de 0,24 μg L<sup>-1</sup>. Outras CE<sub>50</sub> obtidas foram de 0,50 μg L<sup>-1</sup> para *D. carinata* (ZALIZNIAK; NUGEGODA, 2005), 0,19 μg L<sup>-1</sup> para *D.* 

magna (KIKUCHIC; SASAKI; WAKABAYASHI, 2000) e 0,16 μg L<sup>-1</sup> para *D. magna* (OMS, 2009).

A toxicidade crônica de CP frente à *D. carinata* também foi avaliada por Zalizniak e Nugegoda (2005). Os resultados indicaram que a exposição prolongada a 0,005 µg L<sup>-1</sup> de CP interferiu negativamente na reprodução dos organismos até a terceira geração.

Em outros organismos aquáticos, foi constatada ação estrogênica de CP em peixes, com o desenvolvimento de características femininas, alterações no desenvolvimento embrionário e apoptose celular (YU et al., 2015). Danos ao DNA, especificamente em células sanguíneas de peixe (Channa punctatus) e de girinos (Bufo bufo gargarizans) foram relatados por Ali et al. (2009) e Yin et al. (2009), respectivamente.

Em mamíferos, como ratos e até mesmo humanos, o CP pode causar efeitos de inibição da mitose, indução da apoptose e alteração de atividades neurológicas, podendo causar efeitos genotóxicos e mutagênicos (JOHN; SHAIKE, 2015). Alterações enzimáticas e cânceres (no sangue, no cérebro, no reto e no pulmão) também foram relatados (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; MULLER *et al.*, 2014).

Os efeitos causados pela exposição de organismos aos metabólitos do CP também foram observados (CÁCERES *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011). O metabólito CPO é reconhecidamente mais tóxico que o CP. Em estudo realizado com o vertebrado *Rana boylii* (rã), foi avaliada a mortalidade dos organismos expostos a diferentes concentrações de CP e de CPO.

Para CP foram testadas concentrações variando de 0,5 a 5,5 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que para CPO foram testadas concentrações de 0,005 a 0,04 mg L<sup>-1</sup>. Para o CP foi observada mortalidade em todas as concentrações acima de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, contudo, para seu metabólito a concentração de 0,005 mg L<sup>-1</sup> causou mortalidade em 100% dos organismos, comprovando o maior efeito tóxico do mesmo (SPARLING; FELLERS, 2006).

A toxicidade do CP e de seus metabólitos pode variar ainda em relação à concentração de íons inorgânicos e matéria orgânica, conforme demonstrado no estudo de Cáceres *et al.* (2007) com microcrustáceos. Amostras líquidas com maior e menor concentração de íons inorgânicos e matéria orgânica (água natural de rio e água de cultivo, respectivamente) foram contaminadas com CP e com TCP para testes com *D. carinata*. Os resultados indicaram menor toxicidade em água natural

de rio (0,30 μg L<sup>-1</sup> para 0,24 μg L<sup>-1</sup> em água de cultivo), sendo que o composto TCP não apresentou toxicidade até concentrações de 2 μg L<sup>-1</sup>.

Todos estes estudos foram realizados com amostras de agrotóxico e seus metabólitos puros (padrão de agrotóxico ou composto comercial), a fim de verificar a ecotoxicidade individual dos compostos. Porém, pouco se discute a respeito da ecotoxicidade do CP e seus metabólitos durante e após o tratamento. Pelo que se tem conhecimento até o presente estudo, apenas um trabalho avaliou a toxicidade após o tratamento por *AOP*, sendo utilizado como organismo teste *Vibrio fischeri* (FEMIA et al. 2013).

Embora muitos trabalhos de tratamento do CP por processos de oxidação ou processos biológicos indiquem os possíveis subprodutos gerados durante o tratamento, não se sabe ao certo, quais outros compostos tóxicos além do CPO e do TCP podem ser gerados pelos *AOP*.

Femia *et al.* (2013) comprovou que a toxicidade do CP pode variar durante o processo de degradação. Após tratamento por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificou-se o aumento da toxicidade do CP para *V. fischeri* após 40 minutos de tratamento, decrescendo rapidamente até 180 minutos. Ao final do tratamento, observou-se redução de aproximadamente 90% da toxicidade do composto.

Dessa forma, percebe-se que, embora muitos tratamentos aplicados ao CP indiquem a formação de subprodutos mais tóxicos, processos avançados de oxidação podem reduzir efetivamente a sua toxicidade.

Embora estudos ecotoxicológicos com o CP tenham sido desenvolvidos principalmente com algas, microcrustáceos e vertebrados, outros organismos devem ser empregados, a fim de possibilitar uma avaliação mais ampla dos seus efeitos, principalmente após o tratamento por *AOP*.

### 3.4.2 Ecotoxicidade com Daphnia magna

Daphnia sp. é um microcrustáceo de água doce, pertencente a ordem Cladocera. As espécies do gênero Daphnia são encontradas facilmente em regiões tropicais e até mesmo árticas, existindo em torno de 50 espécies (FAO, 1996).

Em condições favoráveis de temperatura e alimentação, estes organismos se reproduzem por partenogênese, gerando organismos fêmeas geneticamente idênticas, tornando-se ideais para ensaios ecotoxicológicos devido à baixa variabilidade genética (FREAR; BOYD, 1967).

Testes com *Daphnia* sp. são normalizados e padronizados internacionalmente pela OECD (Teste n° 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilization Test, 2004) e pela ISO (ISO 6341:2012 - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test) e no Brasil pela NBR 12.713 (ABNT, 2009). Dentre as espécies do gênero, *D. magna* (Straus, 1820) é a mais empregada em ensaios ecotoxicológicos para uma variada gama de compostos (Figura 3).



Figura 3 – *Daphnia magna* (Straus, 1820) Fonte: http://www.aquarium-kosmos.de/inhalt/57 (2015).

Nota: Aumento de 400x.

Alguns estudos empregaram *Daphnia magna* como organismo teste em ensaios com soluções de CP. Dentre eles, Zalizniak e Nugegoda (2006) expuseram três gerações de *Daphnia magna* em soluções de CP (Pestanal, >96% de pureza). Os resultados indicaram que, mesmo em concentrações muito baixas de CP (0,01 µg L<sup>-1</sup>), a exposição contínua ao contaminante resultou em efeitos negativos na reprodução dos organismos, afetando o número de filhotes e o tempo de eclosão em todas as gerações analisadas.

# 3.4.3 Ecotoxicidade com Aedes aegypti

Aedes aegypti, pertencente à família Culicidade, é um inseto originário da África e atualmente encontrado nas áreas dos trópicos em todo o mundo (BOSIRE et al., 2014). Este inseto é conhecido principalmente por ser o vetor da dengue, febre Chikungunya e vírus Zika.

O ciclo de vida do *A. aegypti* é caracterizado pelas fases de larva (Figura 4), pulpa e inseto. No ciclo larval, a larva passa por quatro estádios (fase intermediária ou intervalo entre duas mudas da larva), seguida da pulpa, ambos em meio aquático (BAR; ANDREW, 2013).

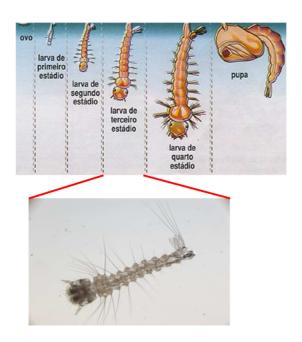


Figura 4 – Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Fonte: Adaptado de http://chc.cienciahoje.uol. com.br/dengue-a-batalha-contra-os-pernilongos/ (2016)

Nota: Aumento de 400x.

Estudos da atividade larvicida de diferentes compostos em *A. aegypti* têm sido realizados, sendo eles produtos naturais (óleos e extratos) (PORTO *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ-MORALES *et al.*, 2015) ou agrotóxicos (GARZÓN *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2015).

Até o momento, não foram relatados trabalhos que empregaram larvas deste organismo com a finalidade de avaliação de efeitos ecotoxicológicos, nem mesmo existem protocolos que normalizem ensaios com larvas para este fim.

Contudo, a OMS apresenta um protocolo com instruções para determinação da suscetibilidade ou resistência da larva do mosquito a inseticidas (OMS, 1981), sendo este documento referência para ensaios com larvas de mosquitos. Como medida de segurança, estudos com larvas de *A. aegypti* são realizados com ovos não contaminados com o vírus da dengue, cultivados somente em laboratórios, não atingindo a fase adulta.

#### 3.4.4 Ecotoxicidade e Genotoxicidade com *Danio rerio*

Danio rerio, conhecido no Brasil como paulistinha, é um peixe tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae e ordem Teleostei. Este peixe (Figura 5) é um dos modelos mais utilizados em ensaios biológicos com vertebrados (ISO, 2007) e internacionalmente recomendado como organismo teste pela OECD (2016).



Figura 5 – *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Fonte: Fishbase (2015).

O seu uso como organismo teste é justificado pelo fácil manuseio, tamanho pequeno da larva e do organismo adulto proporcionando redução dos custos dos experimentos, facilidade em se trabalhar com a fase embrionária, grande potencial de reprodução e similaridade genética com seres humanos (mais de 80%), o que

permite a correlação dos dados obtidos (OLIVER *et al.*, 2011; KRISHNARAJ; HARPER; YUN, 2016).

Inúmeros trabalhos de ecotoxicologia têm sido desenvolvidos com *D. rerio*, tanto com organismos no estágio larval e embrionário quanto no estágio adulto. Trabalhos nesta área têm avaliado desde diferentes compostos químicos até nanopartículas (KRISHNARAJ; HARPER; YUN, 2016), agrotóxicos (JIN *et al.*, 2011), aromáticos (LACHNER; OLIVEIRA; MARTINEZ, 2015), metais (ADEYEMI; MARTINS-JUNIOR; BARBOSA JUNIOR, 2015) e drogas medicinais (KOVÁCS *et al.*, 2014).

Diferentes parâmetros podem ser avaliados através de ensaios ecotoxicológicos com *D. rerio*: genotoxicidade (com amostras de sangue, fígado, gônadas, brânquias), toxicidade aguda e crônica, alterações morfológicas, bioquímicas e outros (DOMINGUES *et al.*, 2010; CHENG; EKKER; CHAN, 2015; ROCCO *et al.*, 2015).

A genotoxicidade em peixes é um dos parâmetros que tem sido mais estudado atualmente, a fim de verificar o potencial genotóxico de compostos químicos sobre os genes de animais aquáticos em concentrações sub-letais (ARALDI et al., 2015).

Dentre os testes mais empregados para a avaliação do efeito genotóxico *in vivo*, o ensaio cometa tem sido muito aplicado devido à possibilidade de detectar rupturas do DNA com maior sensibilidade do que outros métodos (KIM *et al.*, 2013) e por ser um teste robusto (ARALDI *et al.*, 2015). O ensaio cometa geralmente é realizado em condições controladas de laboratório após ensaios de toxicidade aguda (BONY *et al.*, 2008).

### 3.4.4.1 Ensaio cometa

Dentre todos os testes de genotoxicidade existentes, o ensaio cometa é reconhecidamente o de maior sensibilidade e confiabilidade estatística para se avaliar danos ao DNA. Este ensaio permite detectar quebras no DNA devido à migração de seus segmentos, resultando em imagens similares aos cometas (ARALDI et al.,2015).

Este ensaio possibilita a avaliação da genotoxicidade em tecidos que entram em contato direto com o contaminante/substância ou que possam tê-lo absorvido, distribuído, metabolizado ou excretado. Muitas técnicas foram desenvolvidas para a realização do ensaio cometa, sendo elas o método ácido, o alcalino e o neutro, baseados no pH da solução de eletroforese (ARALDI *et al.*, 2015).

O método alcalino permite avaliar a quebra do DNA de cadeias simples, bem como pares alcalinos instáveis do DNA e efeito de *cross linking* (quando um agente exógeno ou endógeno reage com unidades do DNA) (JHA, 2008).

Esta técnica permite avaliar danos em diferentes tipos de células (hemócitos, células do intestino, neuroblastos, espermatócitos, entre outros) de diferentes organismos vivos (JHA, 2008; AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016).

Outra facilidade do ensaio cometa é a possibilidade de avaliar efeitos individuais ou sinérgicos entre mais de uma substância e a capacidade de depuração do organismo vivo. Ali *et al.* (2009) realizaram ensaio cometa com amostras de sangue de *Channa punctatus* para avaliação do efeito genotóxico do clorpirifós. Os resultados dos ensaios demonstraram um aumento gradativo do dano genético até o 5° dia de exposição e a redução do dano a partir do 7° dia, em ambas as concentrações testadas (203, 102 e 68 µg L<sup>-1</sup>).

A redução do dano pode ser explicada pela capacidade de recuperação de células viáveis nos organismos, conforme proposto em trabalho similar realizado por Bücker, Carvalho e Alves-Gomes (2006).

# 3.4.5 Fitotoxicidade com Lactuca sativa

Espécies vegetais para cultivo apresentam rápida germinação e crescimento das sementes, o que facilita a verificação dos efeitos de determinado contaminante, em um tempo reduzido (GVOZDENAC; INDIC; VUKOVIC, 2013). Por este motivo, em geral, testes de fitotoxicidade são realizados com espécies vegetais terrestres. Em ensaios onde é necessário rápido desenvolvimento da planta para avaliação dos efeitos de contaminantes na germinação das sementes, a alface (*Lactuca sativa*, da família das Dicotiledoneas) é a espécie vegetal mais empregada (BAGUR-GONZÁLEZ *et al.*, 2011) e é uma das espécies recomendadas para ensaios com

plantas pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) no Guidelines for the testing of chemicals (OECD, 2006).

L. sativa tem sido muito empregada em ensaios de fitotoxicidade com metais (BAGUR-GONZÁLEZ et al., 2011; SACRISTÁN; RECATALÁ; ROSSEL, 2015; DOOLETTE et al., 2015), devido à rápida absorção destes compostos. Contudo, ensaios com L. sativa para o CP e seus metabólitos ainda não foram descritos na literatura.

# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

# 4.1 SOLUÇÕES DE CLORPIRIFÓS

Padrão analítico do clorpirifós (CP) Pestanal (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich) foi usado para construção de curvas analíticas, preparo das soluções para fins de tratamento, desenvolvimento das técnicas analíticas de medição e nos ensaios ecotoxicológicos. Para tanto, uma solução estoque de CP foi preparada em acetonitrila (ACN), grau HPLC, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. A mesma foi armazenada a 4°C na ausência de luz (vidro âmbar).

A partir desta solução foram preparadas diariamente as soluções de trabalho através de diluição em água de osmose (sistema de osmose reversa Quimis) ou água ultrapura (sistema MegaPurity), de modo a conter uma porcentagem de 0,2% de ACN (v/v), a fim de favorecer a solubilidade do CP.

Acetonitrila e metanol grau HPLC (J.T.Baker) foram usados para o preparo das soluções.

Todas as soluções preparadas para os bioensaios e para fins de tratamento, bem como as soluções estoque de CP, foram armazenadas para posterior descarte de resíduos.

## 4.2 CONTROLE ANALÍTICO

### 4.2.1 Análises Cromatográficas

Acetonitrila (ACN) grau HPLC (J.T Backer), utilizada como solvente cromatográfico, foi filtrada a vácuo em membrana PTFE de 0,45 µm de porosidade (*Sartorius Stedim Biotech* GmbH) e sonicada em ultrasson (Eco-Sonics) por 15 minutos. A água ultrapura utilizada na composição da fase móvel foi obtida em um sistema MegaPurity.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido marca Agilent (modelo 1260 Infinity), equipado com os módulos: detector DAD (*Diode Array Detector*) G4212B, injetor automático G1329B e bomba quaternária G1311B. Os cromatogramas foram registrados pelo *software* Chemistation.

Neste trabalho foram utilizadas duas colunas C18, sendo uma empregada em testes de solubilidade do CP em água e a outra, adquirida após estes testes, utilizada nas etapas de otimização e validação cromatográfica, ensaio de estabilidade e para a detecção e quantificação do CP em amostras tratadas. A descrição das colunas cromatográficas e alguns parâmetros de análise são descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Colunas cromatográficas empregadas nos testes de solubilidade e na detecção/quantificação do CP.

Etapa	Testes de solubilidade em	Otimização e validação cromatográfica,		
	água	ensaio de estabilidade e análise de		
		amostras tratadas		
Coluna	Zorbax Eclipse Plus C18	Derech all 120 FC C19 (Agilent)		
	(Agilent)	Poroshell 120 EC-C18 (Agilent)		
Tamanho	4,6 x 250mm; 5 µm d.i	4,6 x 150mm; 2,7 µm d.i		
Coluna guarda	Zorbax Eclipse Plus	Poroshell SB-C18		
Coluna guarda	4,6 x 12,5mm; 5 μm d.i	2,1 x 5mm; 2,7 μm d.i		
Fase móvel	ACN:H <sub>2</sub> O (90:10)	ACN:H <sub>2</sub> O (90:10)		
Vazão	1,2 ml min <sup>-1</sup>	0,4 ml min <sup>-1</sup>		
Volume de injeção	50 μL	50 μL		
Eluição	Isocrática	Isocrática		

Para os testes de solubilidade em água, o método cromatográfico foi determinado em trabalho anterior realizado por Lima (2015). As soluções de CP foram preparadas em 100% de água, sendo testadas diferentes matrizes: água de osmose, água de rio (córrego interno à área da UTFPR), água mineral e água de torneira.

Para otimização e validação das análises cromatográficas, ensaio de estabilidade e análise de amostras tratadas, as condições cromatográficas iniciais de trabalho foram definidas baseadas em dados da literatura e em trabalho realizado

por Lima (2015). Os cromatogramas foram registrados em varredura de 190 a 400 nm, em intervalos de 2nm, sendo o cromatograma do CP obtido em 290 nm.

### 4.2.2 Curva Analítica por Padrão Externo

As soluções de calibração foram preparadas em água de osmose com adição de 0,2% de ACN, em heptaplicata, a partir da solução estoque de CP (100 mg L<sup>-1</sup>), de forma independente. As concentrações da curva foram: 15; 20; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 µg L<sup>-1</sup>.

Previamente à construção da curva analítica, verificou-se a ausência de valores de área discrepantes para cada nível de concentração, através do teste de Grubbs (INMETRO, 2011), realizada neste trabalho através do site Graphpad (www.graphpad.com/quickcalcs). A curva de calibração foi obtida por regressão linear, considerando a relação entre as áreas dos picos obtidos e as concentrações das amostras.

# 4.2.3 Validação do Método Cromatográfico

Os parâmetros de validação cromatográfica foram avaliados utilizando as amostras aquosas (0,2% de ACN) de CP, preparadas conforme descrito nos itens anteriores.

A partir dos dados da curva analítica foi avaliada a linearidade considerando o coeficiente de correlação (r) da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

A exatidão e a precisão do método foram determinadas após o estabelecimento da linearidade e do intervalo linear, sendo verificadas a partir da determinação de três concentrações diferentes das utilizadas para construção da curva analítica: 44,8 μg L<sup>-1</sup> (CQB), 102,0 μg L<sup>-1</sup> (CQM) e 160,0 μg L<sup>-1</sup> (CQA). Cada concentração foi avaliada em triplicata. Para definir as concentrações das amostras

foi utilizada como referência a Resolução Anvisa RE 899 (ANVISA, 2003), conforme apresentado:

- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): menor ou igual a 3 x LQ;
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA;
- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva.

A precisão foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo, representado pelo coeficiente de variação (CV) entre as concentrações obtidas para as triplicatas dos controles de qualidade (Equação 8). A exatidão foi determinada pelo desvio da concentração média experimental em relação à concentração teórica (Equação 9).

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média}} \times 100$$
 (8)

Exatidão (%) = 
$$\frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$
 (9)

O limite de detecção (LD) foi avaliado pela análise das sete curvas de calibração através de parâmetros da curva analítica, obtida por regressão linear, conforme equação 10. O limite de quantificação (LQ) foi avaliado analogamente ao LD conforme a equação 11, sendo S o coeficiente angular e s a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica, ambos obtidos pela regressão linear.

$$LD = 3.3 \times \frac{s}{S}$$
 (10)

$$LQ = 10 \times \frac{s}{s}$$
 (11)

# 4.2.4 Estabilidade do Clorpirifós em Solução Aquosa

Testes de estabilidade de CP em água de osmose (0,2% de ACN), nas condições de armazenamento, foram realizados durante um período de 30 dias. Uma solução de CP foi preparada (concentração teórica de 200 µg L<sup>-1</sup>), em simplificata, sendo a mesma analisada por HPLC-DAD durante o período de análise. Esta amostra foi condicionada em geladeira (a 4°C), sem incidência de luz.

Através da regressão linear dos resultados das áreas obtidas para o pico referente ao CP *versus* tempo (dias), foi obtida a equação da reta e através desta equação calculado o tempo de meia vida (t½).

.

# 4.2.5 Peróxido de hidrogênio residual

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) residual foi avaliado através de espectrofotometria, conforme adaptação da metodologia descrita por Schick, Strasser e Atabel (1997), onde há formação do complexo peroxotitanio (titânio IV) a partir da reação entre oxalato de titânio e ácido sulfúrico, o qual absorve em comprimento de onda de 395nm. Para as análises e construção da curva de calibração foi utilizado reagente Allper® (Peróxidos Brasil).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Varian – Cary 50 Bio), utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As curvas de calibração foram elaboradas a partir de soluções de peróxido de hidrogênio em duas faixas de concentração: de 0,10 a 10 mg L<sup>-1</sup> e de 10 a 50 mg L<sup>-1</sup>.

# 4.3 DEGRADAÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE CLORPIRIFÓS POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Foi empregado peróxido de hidrogênio (35% m/m) (Peróxidos do Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e ácido clorídrico (HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) para

correção do pH. Para abatimento do peróxido de hidrogênio residual foi utilizada catalase bovina (Sigma-Aldrich, 4% m/v). O ajuste do pH foi realizado com auxílio de medidor de pH de bancada (Hanna Instruments).

Os experimentos de degradação foram conduzidos em reator de vidro borossilicato, com capacidade para 250 mL, equipado com sistema de refrigeração por água e agitação magnética. A radiação artificial UVC foi proporcionada por lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio (125W), protegida por um bulbo de quartzo (Figura 6). A lâmpada ficou suspensa a 10 cm da solução, a fim de possibilitar o monitoramento da degradação do CP. A radiação incidente foi medida através de radiômetro (Instruterm MRUR-203).

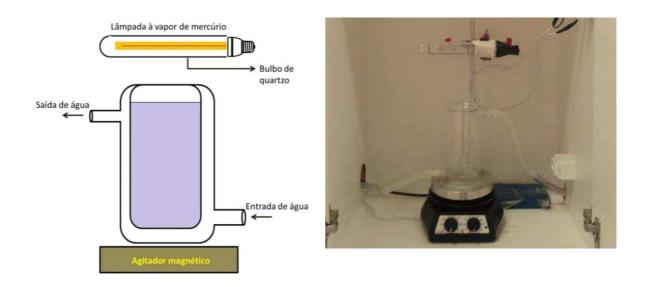


Figura 6 – Esquema e foto de reator fotoquímico de bancada equipado com radiação artificial

Para os experimentos de degradação foram preparadas soluções aquosas de CP em água de osmose (0,2% de ACN), na concentração inicial de 200 μg L<sup>-1</sup>. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o pH da solução foram definidos com base na literatura (FEMIA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014), sendo a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> calculada através da relação estequiométrica entre carbono e peróxido de hidrogênio (LOURES *et al.*, 2013). Neste estudo foi utilizada uma concentração de peróxido de hidrogênio 26,6 vezes maior que a relação estequiométrica, equivalente a uma concentração de 12 mg L<sup>-1</sup>.

A eficiência dos tratamentos foi avaliada através da relação entre a concentração inicial de CP ( $C_0$ ) e concentração final (C), dado pela equação 12.

Eficiência = 
$$100 \times \left(1 - \frac{C}{C_0}\right)$$
 (12)

### 4.4 BIOENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

Com o objetivo de avaliar os efeitos ecotoxicológicos do CP antes e após o tratamento por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram selecionados quatro organismos de diferentes níveis tróficos. Os organismos escolhidos para a realização dos ensaios de ecotoxicidade aguda foram *Lactuca sativa* (semente de alface), *Daphnia magna* (microcrustáceo) e *Aedes aegypti* (larva de inseto) e para ensaios de genotoxicidade foi empregado *Danio rerio* (peixe). Com estes organismos foi possível avaliar a toxicidade do CP para organismos fotossintetizantes (produtor primário), consumidor primário e consumidor secundário.

As soluções utilizadas nos ensaios de ecotoxicidade foram preparadas a partir de uma solução estoque de CP em ACN, de forma a não ultrapassar 0,2% de solvente nas amostras. Em todos os ensaios foram analisados os efeitos dos reagentes (amostras-controle) utilizados nos ensaios após tratamento por radiação UVC e pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a amostra-controle dos reagentes do UVC composto por água de osmose e 0,2% de ACN e a amostra-controle dos reagentes do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> composto por água de osmose, ACN 0,2%, peróxido de hidrogênio (12 mg L<sup>-1</sup>) e catalase.

# 4.4.1 Ecotoxicidade Aguda com Daphnia magna

Os ensaios foram realizados de acordo com NBR 12713 (ABNT, 2009) As soluções foram preparadas em balões volumétricos previamente descontaminados

em banho de ácido nítrico 10%, e enxaguadas em água deionizada. As diluições foram feitas em água de diluição (ABNT, 2009, APÊNDICE A).

Os organismos neonatos (de 2 a 24h) foram transferidos para 20 mL das soluções-teste e da solução controle, em béqueres de 50 mL. Após, foram incubados por 48h a 20°C (± 2°C), sem luz, sem renovação da solução e sem alimentação. Ao final deste período, o número de organismos imóveis nas amostras e no controle foi registrado. Os ensaios foram considerados válidos quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não ultrapassou 10% após 48h. Os ensaios foram realizados em triplicata, com 10 indivíduos cada.

O controle foi preparado com meio de diluição de *D. magna*. As soluções de ACN e metanol foram preparadas em água de osmose, onde foi adicionada a proporção de solvente com auxílio de micropipeta de 1 mL. As soluções de CP foram feitas a partir da diluição da solução estoque de CP em água de osmose.

A ecotoxicidade aguda do CP, antes e após os tratamentos  $UV/H_2O_2$  e radiação UVC também foi avaliada. Para estes ensaios, organismos foram expostos às amostras coletadas no tempo inicial (0 min), intermediário (45, 60 e 120 min) e final (180 min). O pH das amostras foi ajustado para 7,0-8,0. As amostras foram utilizadas sem diluição.

Os resultados do ensaio definitivo com soluções de CP foram expressos em função da concentração efetiva a 50% dos organismos testados (CE<sub>50</sub>), calculada pelo método estatístico de Probitos (regressão linear) com auxílio do *software* BioStat®.

A sensibilidade dos lotes de *D. magna* utilizados nos experimentos foi controlada através de ensaios utilizando a substância de referência KCI (na faixa de concentração de 570 a 840 mg L<sup>-1</sup>). A carta-controle dos testes de sensibilidade pode ser encontrada no APÊNDICE B.

### 4.4.2 Ecotoxicidade Aguda com Aedes aegypti

As soluções dos ensaios com *A. aegypti* foram preparadas em balão volumétrico previamente descontaminados. A água utilizada para o preparo das soluções e para os controles foi água de osmose.

A ecotoxicidade aguda do CP foi avaliada em *A. aegypti* segundo a metodologia para determinação da suscetibilidade ou resistência da larva de mosquito a inseticidas, determinado pela OMS (1981), com modificações.

Foram realizados ensaios em três etapas simultâneas: ensaio com solvente orgânico ACN e metanol; ensaio preliminar e definitivo com CP e ensaio de ecotoxicidade com amostras tratadas.

Ovos sadios de *A. aegypti* da linhagem Rockfeller (utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticidas para a espécie em estudo) foram fornecidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, da Fundação Oswaldo Cruz – RJ.

A eclosão dos ovos foi realizada em béquer com 500 mL de água mineral, a 28°C com fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro (incubadora tipo BOD, Solab). A alimentação das larvas durante o período de eclosão foi feita com ração de peixe (Alcon Basic – MEP 200 Complex).

Os estádios de desenvolvimento larval foram acompanhados através de microscópio óptico (Zeiss Primo Star). Para os ensaios foram selecionadas larvas entre o 3° e 4° estádio (aproximadamente 96h de vida) (OMS, 1981). A definição do 3°/4° estádios foi realizada com base no desenvolvimento da papila anal, do sifão respiratório, do tórax e da cabeça, de acordo com Christophers (1960) e Bar e Andrew (2013).

Os ensaios foram realizados em béqueres, em triplicata, utilizando 25 mL de solução e 20-25 organismos por réplica. A temperatura durante os ensaios foi mantida em 23°C, sem fotoperíodo. Água de osmose foi utilizada como controle durante os ensaios. Após 24 horas de exposição, foi verificada a imobilidade dos organismos. Para viabilizar o ensaio, foi considerada uma imobilidade <20% para o controle (OMS, 1981).

As larvas que não foram utilizadas nos ensaios e aquelas que sobreviveram, foram mortas em banho de hipoclorito (10% v/v).

### 4.4.3 Ecotoxicidade Aguda com *Danio rerio*

Os ensaios com *D. rerio* foram realizados de acordo com NBR 15088 (ABNT, 2011) e iniciaram após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UTFPR (ANEXO A). Alíquotas da solução estoque de CP (100 mg L<sup>-1</sup> em ACN) foram transferidas diretamente para béqueres de 2 litros contendo água de diluição (APÊNDICE C) com auxílio de micropipeta de 1 mL ou 10 mL.

Os peixes foram adquiridos de produtor especializado no comércio local e aclimatados no laboratório por 15 dias, em água de diluição, com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas escuro) e temperatura controlada por termostato (26°C). Os peixes foram mantidos em aquários de vidro (capacidade de 25 L), permanentemente aerados.

Durante a aclimatação, os peixes foram alimentados com ração em flocos (Alcon Basic – MEP 200 Complex), uma vez ao dia. A água de diluição utilizada nos ensaios foi aerada por 24 horas a fim de estabilizar o pH. Além do pH e da temperatura foram analisados a dureza (método de titulação por complexação com Indicador de Negro de eriocromo –T) e o oxigênio dissolvido da água de diluição com auxílio de oxímetro de campo (YSI, 550A). A amônia dissolvida foi analisada com auxílio de analisador Kjeldajl automático (Velp Scientifica, UDK 159).

Os ensaios preliminares foram realizados através da exposição de peixes adultos e sadios às soluções de CP, preparadas em água de diluição (0,2% de ACN) nas concentrações 0,2; 2; 20 e 200 µg L<sup>-1</sup>, por um período de 96 horas, em béqueres com 2 L cada e cinco peixes por béquer. O ensaio preliminar foi realizado em temperatura de 23 ± 1 °C, com iluminação de 16 horas, sem aeração, sem alimentação e com renovação total da solução e da água do controle a cada 24 horas. Ao fim do ensaio preliminar, registrou-se o número de indivíduos mortos em cada solução-teste.

### 4.4.4 Genotoxicidade com *Danio rerio*

A fim de avaliar a genotoxicidade do CP, antes e após tratamento, foi realizado ensaio cometa, segundo metodologia descrita por Speit e Hartmann (1999) com alterações de Ramsdorf (2007).

Dois ensaios foram realizados em meses diferentes, sendo o primeiro para verificar possíveis efeitos genotóxicos do CP sem tratamento em diferentes concentrações, e o segundo a fim de confirmar os resultados obtidos no primeiro ensaio e de forma a avaliar efeitos de amostras tratadas de CP.

Neste primeiro ensaio, os organismos foram expostos às soluções de CP preparadas em água de diluição (0,2% de ACN) nas concentrações de 0,2; 2; 20 e 200 µg L<sup>-1</sup>, por 96 horas. Após a exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína e sacrificados. Foram coletadas amostras de sangue (aproximadamente 5µL) da seção medular, as quais foram submetidas ao ensaio cometa.

Antes da coleta do material sanguíneo, lâminas foram cobertas com agarose normal (1,5%). Após a preparação das lâminas, o sangue foi coletado com auxílio de micropipeta de 200 µL, misturado a 200 µL de soro bovino fetal em ependorf e condicionado ao abrigo da luz.

A montagem da lâmina procedeu-se da seguinte forma: em um ependorf limpo, misturou-se 20 µL da suspensão celular em 120 µL de agarose (0,5%) de baixo ponto de fusão (LMP) previamente aquecida.

Na sequência, 120 µL da mistura foram depositados nas lâminas, sendo cobertas com lamínulas e mantidas em geladeira por 10 minutos. Após este período, são retiradas as lamínulas cuidadosamente e as lâminas são mantidas em solução de lise por aproximadamente 24 horas. Os protocolos para preparação da agarose e da solução de lise encontram-se descritos nos APÊNDICES D e E.

Após o período de 24 horas, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese. Foi adicionada à cuba, uma solução alcalina de eletroforese (APÊNDICE F) até a cobertura total das lâminas e o DNA foi desnaturado por 30 minutos. Em seguida foi realizada a eletroforese com a cuba mergulhada em gelo e no escuro, durante 25 minutos. A corrida eletroforética ocorreu em 25 V e 300 mA.

Após a corrida, as lâminas foram retiradas da cuba, neutralizadas com tampão de neutralização (APÊNDICE G) (pH 7,5) por 5 minutos, três vezes, fixadas em etanol 96% por 5 minutos e secados na vertical.

Após a secagem das lâminas, as mesmas foram coradas com 20 µL de brometo de etídio, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio de epifluorescência (marca Leica) com aumento de 400x.

Em cada lâmina foram analisados 100 núcleóides, que foram classificados visualmente de acordo com o dano causado ao DNA, conforme apresentado no Quadro 6.

Tipo de danos	Sem dano	Sem dano aparente	Pequeno	Médio	Máximo
Escore	0	1	2	3	4
Representação gráfica	0	1	2	3	4

Quadro 6 – Classificação dos danos causados em núcleos de células sanguíneas. Fonte: RAMSDORF (2007); ARALDI *et al.* (2015).

Após a classificação dos núcleóides, foi determinado um escore final para cada amostra e controle, variando de 0 (100% dos cometas com dano 0) a 400 (100% dos cometas com dano 4) (Equação 13).

Escore = 
$$(0 \times n_1) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$
 (13)

Onde, n<sub>1</sub>-n<sub>4</sub> é o número de cometas em cada uma das classes 0 a 4. A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do *software* BioEstat®, através do teste de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos.

No segundo ensaio, os organismos foram aclimatados por um período maior, de 30 dias. A aclimatação foi realizada em água de torneira filtrada e declorada, aerada constantemente e a alimentação realizada uma vez ao dia com filhotes de *D. magna* e complementadas com ração própria para peixes, quando necessário.

Foram analisados os parâmetros pH, temperatura, dureza, oxigênio dissolvido e amônia dissolvida. Neste segundo ensaio foram preparadas soluções de CP 200 μg L<sup>-1</sup> (preparada em água filtrada e declorada + 0,2% de ACN), CP (200 μg L<sup>-1</sup>) tratado por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CP (200 μg L<sup>-1</sup>) tratado por irradiação UVC, amostra tratada dos reagentes do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, controle (água de torneira filtrada e declorada), controle com 0,2% de ACN e controle da aclimatação (peixes retirados diretamente do aquário de aclimatação). Os mesmos procedimentos de montagem da lâmina foram realizados.

### 4.4.5 Fitotoxicidade com Lactuca sativa

Para os ensaios com *L. sativa*, as soluções foram preparadas em balões volumétricos previamente descontaminados em banho de ácido nítrico 10%, e enxaguados em água deionizada. As soluções foram preparadas com água de osmose (3,47 µS, 25°C).

Os ensaios foram realizados conforme metodologia adaptada de Sobrero e Ronco (2004) e Young *et al.* (2012). Foram utilizadas amostras comerciais de sementes de alface variedade Boston branca (Isla Pak), sem defensivos agrícolas. A taxa de germinação do lote foi de 87%.

Primeiramente, foram realizados ensaios para avaliar a ecotoxicidade do solvente acetonitrila na faixa de concentração de 0,05 a 1,0% (v/v). Em seguida, ensaios para avaliar a ecotoxicidade de CP foram realizados com soluções de CP na faixa de concentração de 0,02 a 200 µg L<sup>-1</sup>, preparadas com água de osmose, a partir de soluções de trabalho em acetonitrila, de forma a não exceder 0,2% de ACN em cada amostra.

Controles negativo (água de osmose) e positivo (solução de glifosato 6%) foram utilizados. Para os ensaios foram utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Em cada placa foi colocado um papel filtro qualitativo (marca Unifil, 80 g/m²) e nele foram adicionados 4 mL de amostra. Em seguida, 17 sementes de alface foram distribuídas sobre o papel filtro de forma homogênea. O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram então cobertas com filme plástico, a fim de

manter a umidade, e incubadas no escuro (câmara de germinação tipo BOD, marca SOLAB) a uma temperatura constante de 22 ± 2 °C durante 120 horas.

Após o período de incubação verificou-se o número de sementes germinadas em cada placa bem como a medição do comprimento das radículas (cm). Com estes resultados, calculou-se o índice de germinação (IG, Equação 14) e o índice de crescimento relativo (ICR, Equação 15) para cada amostra (GARCIA *et al.*, 2009).

$$IG = \frac{MCR / MG}{MCC / MC} \times 100$$
 (14)

$$ICR = \frac{\text{Média do comprimento das raízes da amostra}}{\text{Média do comprimento das raízes do controle}}$$
 (15)

Onde, MCR é a média do comprimento das raízes da amostra, MG é a média de sementes germinadas da amostra, MCC é a média do comprimento das raízes do controle e MC é a média de sementes germinadas do controle.

Os valores de ICR foram divididos em 3 categorias de acordo com os efeitos tóxicos observados: (a) inibição do crescimento da raíz (EI): 0 <ICR< 0,8; (b) efeito não significativo (ENS):0,8 ≤ICR≤ 1,2 e (c) efeito significativo de estimulação do crescimento da raíz (ES): ICR> 1,2 (YOUNG *et al*, 2012). Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett (p< 0,05), com o auxílio do *software* livre BioEstat®.

# **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

# 5.1 SOLUBILIDADE DE CLORPIRIFÓS EM ÁGUA

Um dos objetivos iniciais deste trabalho foi avaliar a degradação do padrão puro de CP (99,9% de pureza) em água, a fim de simular o tratamento deste inseticida em concentrações próximas às encontradas no meio ambiente e avaliar o comportamento de degradação do composto puro pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dessa forma, inicialmente, foram realizados testes de solubilidade do CP em diferentes matrizes de água: água de osmose, água mineral, água de torneira e água superficial (proveniente de um córrego existente na área da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Sede Ecoville).

De acordo com dados da literatura, a solubilidade do CP em água varia de  $0,39 \text{ mg L}^{-1}$  ( $19,5^{\circ}$ C) (OMS, 2009) a  $1,05 \text{ mg L}^{-1}$  ( $20^{\circ}$ C) (EUROPEAN COMMISSION, 2005). Com o intuito de avaliar a solubilidade do CP nas condições de trabalho adotadas neste estudo, foram realizados testes em condições de temperatura ambiente ( $20 \pm 2^{\circ}$ C) e pH natural da solução (pH 5,2).

Para a detecção e quantificação do CP através do método cromatográfico desenvolvido por Lima (2015), foram utilizadas duas curvas analíticas, preparadas em acetonitrila, para as faixas lineares de 0,01 a 0,6 mg L<sup>-1</sup> e de 0,8 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. A curva analítica para cada uma das faixas é apresentada na Figura 7 (a) e (b). Os valores de LD e LQ foram determinados em 1,01 μg L<sup>-1</sup> e 3,35 μg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

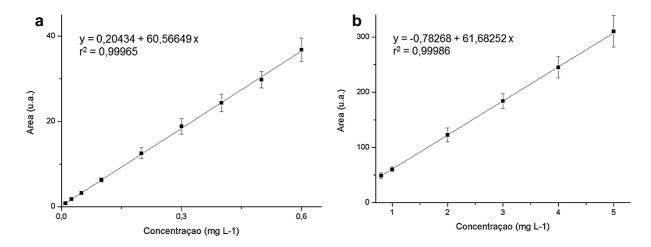


Figura 7 - Curvas analíticas para os comprimentos de onda de 290nm, 0,01 à 0,6 mgL<sup>-1</sup> (a) e 0,8 à 5 mgL<sup>-1</sup> (b) (Solução de clorpirifós em ACN). Fonte: LIMA (2015).

Inicialmente foram conduzidos testes de solubilidade do CP em água de osmose, na concentração de 400 µg L<sup>-1</sup>, em triplicata. Durante o preparo das soluções, em temperatura ambiente, foi verificado que o soluto (padrão sólido de CP) não foi completamente dissolvido, ficando sobrenadante na solução. Mesmo após agitação magnética durante 30 minutos, ainda foi verificada presença do CP não dissolvido. A não solubilização do composto foi confirmada pelas análises cromatográficas, onde não foi possível detectá-lo.

Este resultado contrapõe dados da literatura, indicando que, mesmo em baixas concentrações, na ordem de µg L<sup>-1</sup>, o agrotóxico não é completamente solúvel em água. Até o presente estudo, não foram encontrados trabalhos que tenham comparado e avaliado a solubilidade do composto puro em água.

Dessa forma, com o objetivo de verificar se a presença de sais ou compostos orgânicos dissolvidos em água pudessem auxiliar na solubilização do CP, prosseguiu-se com testes de solubilidade em água mineral, água de torneira e água superficial, sendo que nestes testes avaliou-se a solubilidade de CP na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, concentração esta dentro do limite de solubilidade do composto, de acordo com a European Comission (2005).

Em água de torneira não foi possível identificar visualmente o pico correspondente ao CP ( $t_R$ =5,2 min, em coluna Eclipse Plus C18). Em água mineral, o pico do CP apresentou uma área de 1,5 (correspondente a 0,027

mg L<sup>-1</sup>) e em água superficial de 1,7 (correspondente à 0,03 mg L<sup>-1</sup>). Os cromatogramas das respectivas amostras são apresentados na Figura 8.

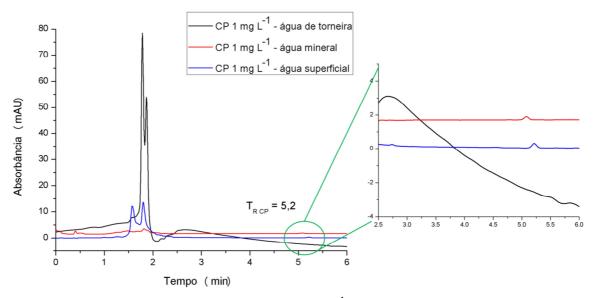


Figura 8 - Cromatogramas de amostras de CP (1 mg L<sup>-1</sup>) em diferentes matrizes de água Nota: Condições cromatográficas: λ: 290 nm; FM: ACN:H<sub>2</sub>O (90:10); Volume de injeção: 50 μL; Vazão da FM: 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

Esses resultados indicam que o CP não se mostrou solúvel nos meios água de osmose, água mineral, água de torneira e água superficial, e que a presença de sais e/ou matéria orgânica não auxilia no aumento da solubilidade do composto, nas condições de temperatura e pH adotados (temperatura de 20 ± 2°C e pH 5,2).

Porém, sua solubilidade em solvente orgânico é alta, acima de 400 g L<sup>-1</sup>, dependendo do solvente utilizado (EUROPEAN COMISSION, 2005; CHISHTI *et al.*, 2013). Alguns trabalhos realizados com o clorpirifós utilizaram solventes orgânicos para aumentar a solubilidade do composto, sendo que Lazarevic-Pastil *et al.* (2012) utilizaram etanol a 2% em solução e Ismail *et al.* (2013) utilizaram 0,1% de acetonitrila em solução. Outros trabalhos que utilizaram padrão de CP em estudos de degradação e toxicidade também empregaram solventes orgânicos no preparo das soluções estoque (CÁCERES *et al.*,2007; HOSSAIN *et al.*, 2013).

Dessa forma, devido à baixa solubilidade do composto em água, foram conduzidos testes de solubilidade do CP em meio aquoso variando-se a proporção de solvente orgânico em solução. O objetivo foi verificar a mínima quantidade de

solvente orgânico necessária para a solubilização do composto, de forma a não interferir nos resultados de ecotoxicidade.

Para a realização destes testes optou-se por utilizar o solvente acetonitrila, uma vez que a fase móvel empregada nas análises cromatográficas foi ACN:H<sub>2</sub>O. As soluções de CP foram preparadas em concentração de 100 μg L<sup>-1</sup>, em seis diferentes proporções de acetonitrila: 0,2%; 0,5%; 1%; 2%; 5% e 100%. Amostra apenas em água de osmose não foi analisada, uma vez que ao preparar uma solução de CP em 100% de água, visivelmente o CP não solubilizou completamente, sendo observado um sobrenadante na água. A Tabela 4 apresenta os resultados de área obtidos para as amostras analisadas.

Tabela 4 - Variação da área cromatográfica de amostras de CP (100 μg L<sup>-1</sup>) em diferentes proporções de acetonitrila.

Proporção ACN	100%	5%	2%	1%	0,5%	0,2%
Área do pico	3,7	2,8	2,7	3,1	2,7	2,7

Pelos resultados de área obtidos, foi possível verificar que a intensidade de resposta do pico cromatográfico foi diferente para as amostras preparadas em água e para a amostra preparada em 100% de ACN, contudo, não houve diferença considerável entre as amostras de 0,2 a 5% de ACN em solução aquosa.

A partir de 0,2% de ACN não foi visualizado sobrenadante branco na superfície da solução. Embora a intensidade do sinal tenha sido menor, foi verificado que com esta proporção mínima de ACN é possível solubilizar o CP, a fim de preparar concentrações na ordem de µg L<sup>-1</sup>, e de forma a se obter valores de concentrações reprodutíveis na análise de diferentes soluções. Devido aos resultados obtidos nos testes de solubilidade, foi adotado acetonitrila como solvente orgânico constituinte da fase móvel e para o preparo das soluções.

Considerando a proporção de 0,2% de ACN em água, testes ecotoxicológicos foram realizados com ACN a fim de verificar a interferência do solvente orgânico nos resultados dos ensaios de toxicidade aguda. Os resultados destes ensaios serão apresentados no subitem 5.4.

# 5.2 CONTROLE ANALÍTICO

# 5.2.1 Determinação Cromatográfica de Clorpirifós por HPLC-DAD

Após os testes de solubilidade, houve aquisição de uma nova coluna cromatográfica para o desenvolvimento do trabalho. A coluna nova, Poroshell 120 EC-C18, foi empregada para análise das amostras do ensaio de estabilidade, otimização e validação cromatográfica e análise de amostras tratadas.

As condições cromatográficas iniciais de trabalho foram definidas baseadas em dados de detecção de clorpirifós disponíveis na literatura envolvendo HPLC-DAD, utilizando coluna C18 e envolvendo os solventes acetonitrila e água (ROBLES-MOLINA et al., 2012; FEMIA et al., 2013; HOSSAIN et al., 2013) e em trabalho realizado por Lima (2015).

Para a otimização do método cromatográfico com a coluna Poroshell, foram testadas diferentes vazões da fase móvel (ACN:H<sub>2</sub>O) na retenção e resolução do pico cromatográfico. Foram avaliadas vazões de 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mL min<sup>-1</sup> e avaliados o t<sub>R.</sub> Os cromatogramas referentes às variações de vazão da fase móvel são apresentados na Figura 9.

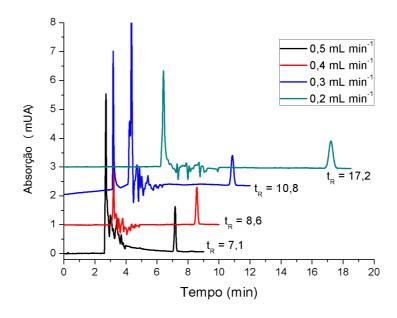


Figura 9 - Cromatogramas de CP (200 μg L<sup>-1</sup>) em diferentes vazões do método. Nota: Condições cromatográficas: λ: 290 nm; FM: ACN:H₂O (90:10); Volume de injeção: 50 μL.

Geralmente busca-se eluir o composto de interesse no menor tempo possível, entretanto, na vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup> o pico ficou muito próximo do sinal atribuído para o solvente. Nos tratamentos em presença do radical hidroxila, a tendência esperada é de produção de subprodutos mais polares, devido à hidroxilação da molécula. Desta forma, se considerou prudente utilizar a vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, onde também ocorreu uma redução da pressão interna do sistema em relação à vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

Uma vez definida a vazão, foi analisado a interferência da fase móvel, variando-se a proporção do solvente (A) acetonitrila e do solvente (B) água ultrapura em 90:10; 80:20; 70:30 e 100% de (A), com o objetivo de averiguar a interferência da composição da fase móvel na separação cromatográfica. Os cromatogramas referentes às análises são apresentados na Figura 10.

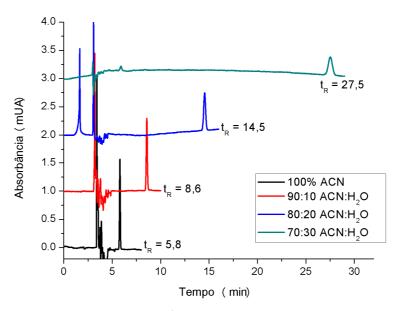


Figura 10 - Cromatograma de CP (200 μg L<sup>-1</sup>) em diferentes proporções de fase móvel. Nota: Condições cromatográficas: λ: 290 nm; Volume de injeção: 50 μL; Vazão da FM: 0,4 mL min<sup>-1</sup>.

Em relação à FM, à medida que se aumentou a proporção de água, houve o deslocamento do tempo de retenção e o alargamento de base do pico. Na condição 90:10 (ACN:H<sub>2</sub>O) o pico ficou bem separado do t<sub>M</sub>, enquanto que ao se utilizar 100% de ACN, houve um deslocamento do pico para muito próximo do t<sub>M</sub>. Dessa forma,

manteve-se a mesma fase móvel definida em método determinado por Lima (2015), que foi de 90:10 (ACM:H<sub>2</sub>O).

A fim de se obter uma maior resposta cromatográfica, em relação à intensidade do pico, foram verificados diferentes volumes de injeção, variando de 10 μL a 50 μL. Através de regressão linear (relação entre volume de injeção x área cromatográfica), foi obtida a curva analítica e verificada a linearidade da mesma. O coeficiente de correlação (r) foi de 0,999, demonstrando que independentemente do volume injetado, a área obtida é proporcional ao volume.

De acordo com informações contidas no manual do HPLC (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010), a reprodutibilidade instrumental das análises é garantida na faixa de volumes testada.

Em nenhum dos volumes de injeção testados foi verificado o espalhamento ou o alargamento do pico, conforme observado na Figura 11, dessa forma foi optado pelo volume de 50 µL, garantindo uma maior sensibilidade para o método de análise.

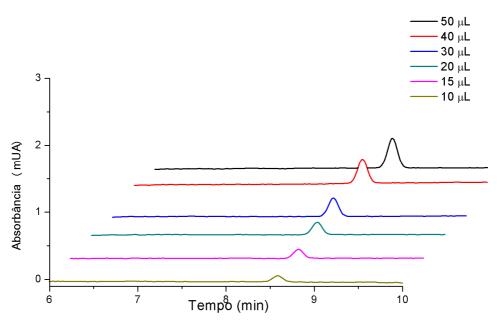


Figura 11- Cromatograma de CP (102 μg L<sup>-1</sup>) em diferentes volumes de injeção. Nota: Condições cromatográficas: λ: 290 nm; FM: ACN:H<sub>2</sub>O (90:10); Vazão da FM: 0,4 mL min<sup>-1</sup>.

Após as análises variando fase móvel, vazão e volume de injeção, o método cromatográfico foi definido conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Método cromatográfico definido para quantificação e detecção de CP em meio aquoso em coluna Zorbax Eclipse Plus C18.

Fase móvel	ACN:H₂O		
Proporção FM	90:10		
Volume de injeção	50 μL		
Vazão	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
Eluição	Isocrática		
Detecção	290 nm		

# 5.2.2 Curva Analítica para Detecção em HPLC-DAD

A curva analítica (n=7) foi elaborada na faixa de concentração de 15 a 200 μg L<sup>-1</sup> (em água de osmose + 0,2% de ACN), a fim de quantificar o CP em concentrações próximas àquelas detectadas em água no meio ambiente (LEONG; TIAN; MUSTAFA, 2007).

A curva obtida apresentou boa linearidade, com coeficiente de correlação (r) superior a 0,995, estando acima do valor preconizado pela Anvisa (2003) e pelo Manual de garantia de qualidade analítica (MAPA, 2011). A Figura 12 mostra os resultados da curva de analítica.

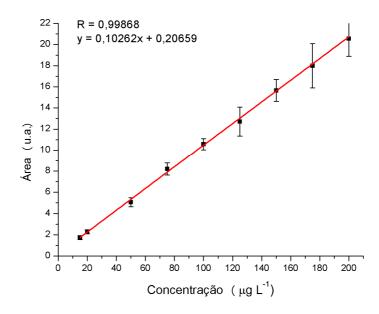


Figura 12- Curva de calibração do método analítico (n=7). Nota: Condições cromatográficas: coluna Poroshell EC120-C18; λ: 290 nm; FM: ACN:H<sub>2</sub>O (90:10); Volume de injeção: 50 μL; Vazão da FM: 0,4 mL min<sup>-1</sup>.

Antes de realizar a regressão linear pelo método de mínimos quadrados, foi realizado o teste estatístico de Grubbs para verificar preliminarmente a existência de um valor anômalo (*outlier*) em cada extremidade de um conjunto de amostras. Este teste é calculado a partir da razão entre o desvio de cada ponto amostral em relação à média e o desvio padrão da amostra. Para não ser considerado um *outlier*, o valor calculado deve ser menor que o valor crítico G (para n=7, G=2,02). Nenhum resultado foi considerado como *outlier*, num intervalo de confiança de 95%.

Segundo a Anvisa (2003), o limite de quantificação (LQ) pode ser considerado como 10 vezes a razão entre o desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva analítica de regressão (coeficiente angular), enquanto que o limite de detecção (LD) pode ser considerado como 3,3 vezes a mesma razão (RIBANI *et al.,* 2004). A partir destas considerações, os valores de LQ e LD calculados a partir dos parâmetros da curva (Tabela 6) foram 15,48 μg L<sup>-1</sup> e 5,11 μg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 6 - Parâmetros de regressão da curva analítica e principais parâmetros de mérito

Parâmetro	Valor
Coeficiente linear	0,20659
Desvio do coef. linear	0,15893
Coeficiente angular	0,10262
Desvio do coef. angular	0,00381
Coeficiente de correlação (r)	0,99868
LQ (µg L <sup>-1</sup> )	15,48
LD (µg L <sup>-1</sup> )	5,11

Para a aceitação da curva analítica, a Anvisa (2003) relata que desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração devem ser verificadas.

O coeficiente de variação (CV) para a menor concentração da curva (15 μg L<sup>-1</sup>) foi de 10,15%, enquanto para as demais concentrações foi de no máximo 11,66%, considerando desta forma a curva válida. Devido à boa reprodutibilidade

das amostras em heptaplicata, o LQ foi definido como 15 μg L<sup>-1</sup>, resultado este de acordo com dados encontrado em literatura para cromatografia a líquido (HE *et al.*, 2009; ISMAIL *et al.*, 2013).

### 5.2.3 Análise de Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas pela análise de amostras preparadas em três diferentes concentrações (denominados de controles de qualidade), sendo uma de baixa concentração (44,8 μg L<sup>-1</sup>), uma de média concentração (102 μg L<sup>-1</sup>) e outra de alta concentração (160 μg L<sup>-1</sup>), em triplicata, de soluções independentes.

A precisão foi determinada pelo cálculo de desvio padrão relativo, apresentado através do coeficiente de variação entre as áreas obtidas para cada concentração em triplicata. A exatidão foi determinada pelo desvio da concentração média da triplicata em relação à concentração teórica. Para estas análises são aceitos desvios de até 20% para precisão (RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011) e variação de 70 a 120% na exatidão (RIBANI *et al.*, 2004).

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos das áreas cromatográficas das três amostras em triplicatas e os valores de precisão e exatidão calculados. Os valores obtidos para os coeficientes de variação variaram de 2,59 a 7,96 e exatidão acima de 91%.

Tabela 7 – Áreas cromatográficas das amostras dos controles de qualidade e cálculo de precisão e exatidão intra-dias.

Controles de Qualidade	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	CV (%)	Exatidão (%)
CQB (44,8 µg L <sup>-1</sup> )	4,593	4,831	4,332	3,03	95,22
CQM (102,0 µg L <sup>-1</sup> )	10,425	8,913	9,999	7,96	91,45
CQA (160,0 μg L <sup>-1</sup> )	16,243	16,889	16,087	2,59	98,65

Nota: CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; CV: coeficiente de variação.

### 5.2.4 Estabilidade do Clorpirifós em Solução Aquosa

Testes de estabilidade de amostra contendo CP em meio aquoso (0,2% de ACN), na concentração nominal de 200µg L<sup>-1</sup>, foram realizados em diferentes dias, no período máximo de 30 dias. A amostra de CP foi condicionada em geladeira, a temperatura de aproximadamente 4°C, sem incidência de luz. A concentração do composto foi analisada em HPLC-DAD, após a definição do método cromatográfico. As áreas obtidas nos respectivos dias de análise são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Estabilidade do CP em meio aquoso (0,2% de ACN) a temperatura de 4°C, sem presença de luz.

Dia	Concentração (µg L <sup>-1</sup> )	Dia	Concentração (µg L <sup>-1</sup> )
1°	181,05	12°	145,87
3°	154,00	15°	129,60
5°	143,71	20°	82,56
8°	156,66	25°	86,35
10°	124,57	30°	74,16

Nota: Concentração nominal de CP igual a 200 µg L<sup>-1</sup>.

Embora alguns resultados tenham indicado aumento da concentração em relação à análise anterior, foi verificado um decaimento linear da concentração, conforme pode ser observado através da Figura 13. Estes resultados confirmam a baixa estabilidade do composto em água, devido a provável hidrólise do CP a partir do momento em que ele se encontra em água. Desta forma, constatou-se a necessidade de se preparar uma nova solução a cada ensaio ecotoxicológico ou experimento de degradação.

Foi plotado um gráfico de tempo *versus* concentração das amostras analisadas em cada respectivo dia (Figura 13). Através da regressão linear (y = -3,50255x + 173,03595) foi possível calcular o tempo de meia vida (onde a metade da concentração foi considerada igual a 90,5 µg L<sup>-1</sup>) do CP nas condições analisadas, sendo o valor de t½ calculado de 23,1 dias.

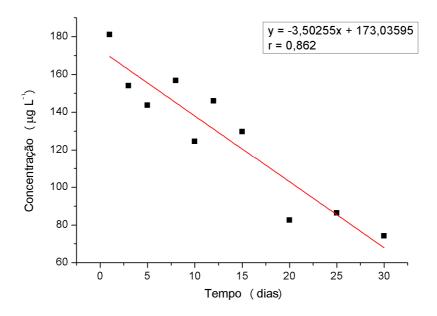


Figura 13 – Concentração do CP *versus* tempo. Nota: solução armazenada em temperatura de 4°C, sem presença de luz.

O t½ calculado é condizente com dados apresentados por Tiwari e Guha (2013) que varia de 6,1 a 38,1 dias. Embora este valor seja considerado baixo em relação a outros agrotóxicos, considerando um aporte contínuo de CP no meio ambiente e, por consequência, a presença contínua de seus subprodutos, podem ser observados efeitos tóxicos crônicos em organismos vivos.

Efeitos crônicos puderam ser comprovados para *D. carinata* após exposição prolongada de 0,005 μg L<sup>-1</sup> de CP, sendo observados efeitos negativos na reprodução dos organismos até a terceira geração (ZALIZNIAK; NUGEGODA, 2005).

# 5.3 ESTUDO CINÉTICO E DEGRADAÇÃO DE CLORPIRIFÓS POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Após a avaliação da estabilidade da solução de CP e da definição do método cromatográfico, foram conduzidos experimentos de degradação do CP, em condições brandas (com a lâmpada suspensa a 10 cm da solução), a fim de

possibilitar o monitoramento da concentração do agrotóxico ao longo do tempo de tratamento, devido à baixa concentração de CP utilizada neste trabalho (200 µg L<sup>-1</sup>).

A aplicação do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento de soluções contendo CP é escassa na literatura. Apenas dois trabalhos foram relatados até o momento, sendo eles de Femia *et al.* (2013) e Oliveira *et al.* (2014). Esses trabalhos foram utilizados como referência para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio e do pH inicial da solução.

A concentração inicial de CP tratada no trabalho de Femia *et al.* (2013) foi de 15 mg L<sup>-1</sup>, a faixa de concentração de peróxido empregada variou de 450 a 910 mg L<sup>-1</sup> e o pH da solução definido para o tratamento foi pH 6 (pH natural da solução), enquanto que no trabalho de Oliveira *et al.* (2014), a concentração inicial de CP foi definida em 150 mg L<sup>-1</sup>, a concentração de peróxido e o pH otimizados foram de 1500 mg L<sup>-1</sup> e pH 8.

Para possibilitar a mineralização completa do CP foi equacionada uma reação de combustão total do composto orgânico, a qual foi utilizada para a determinação da proporção estequiométrica de  $H_2O_2$  a ser adicionada à solução de CP. A equação 16 apresenta a formação de  $H_2O_2$  e a equação 17 apresenta o consumo de  $O_2$  para a combustão total de CP (em relação ao C e H).

$$23.5 H_2O + 11.75 O_2 \rightarrow 23.5 H_2O_2$$
 (16)

$$1 C_9 H_{11} + 11,75 O2 \rightarrow 9 CO_2 + 5,5 H_2 O$$
 (17)

A partir destas equações, calculou-se que para 200 μg L<sup>-1</sup> de CP são necessários 0,45 mg L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. Em seu trabalho Femia *et al.* (2013) utilizaram um proporção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 26,6 vezes maior que a razão estequiométrica enquanto que Oliveira *et al.* (2014) empregaram uma relação 4,38 vezes superior ao cálculo estequiométrico da reação. Neste trabalho optou-se por seguir a proporção testada por Femia *et al.* (2013), possibilitando uma comparação posterior dos resultados obtidos. Através deste cálculo estabeleceu-se para a concentração inicial de CP de 200 μg L<sup>-1</sup> uma concentração de 12 mg L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio, o que é equivalente à 26,6 vezes a relação estequiométrica.

Conforme descrito no trabalho de Femia *et al.* (2013), o pH mais próximo a neutralidade (pH 6) favoreceu os processos de tratamento, além disso, valores de pH muito baixos possibilitam a maior degradação do peróxido de hidrogênio,

reduzindo a eficiência do tratamento (CHU, 2000). Considerando principalmente as condições expostas por Femia *et al.* (2013) decidiu-se trabalhar com o pH natural da amostra, neste caso pH 5,2.

Uma vez definidas as concentrações dos reagentes e o pH foram realizados dois estudos cinéticos em escala de bancada. Um primeiro estudo foi realizado sem a adição de peróxido de hidrogênio a fim de avaliar a degradação do CP apenas sobre efeito da radiação UVC. O segundo estudo foi realizado com adição de peróxido de hidrogênio (processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

A radiação UVC, medida a 10 cm de distância do reator, foi de 0,75 mW cm<sup>-2</sup>. O tempo máximo de tratamento foi estipulado em 180 minutos. As Figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas das análises das amostras coletadas em cada um dos tratamentos.

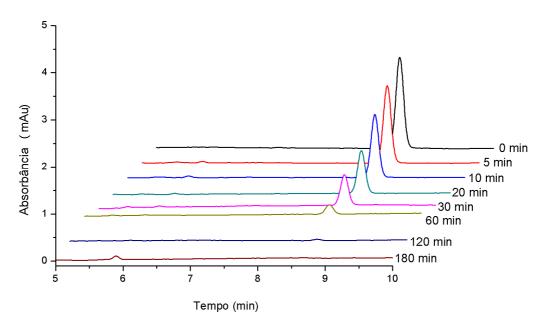


Figura 14 – Cromatogramas (λ=290 nm) das amostras coletadas durante o tratamento (0 a 180 minutos) por radiação UVC.

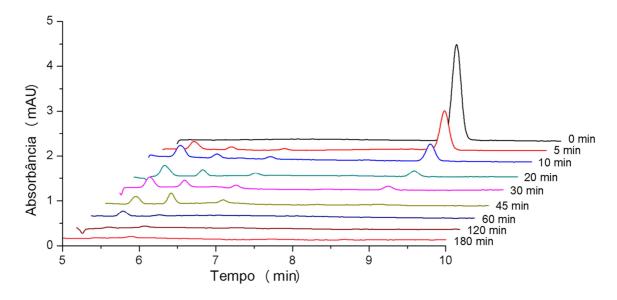


Figura 15 – Cromatogramas ( $\lambda$ =290 nm) das amostras coletadas durante o tratamento (0 a 180 minutos) por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Através da análise das amostras foi possível verificar que o tratamento via processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais efetivo na degradação do CP, resultado este de acordo com a literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os resultados da degradação do CP e do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são apresentados na Figura 16.

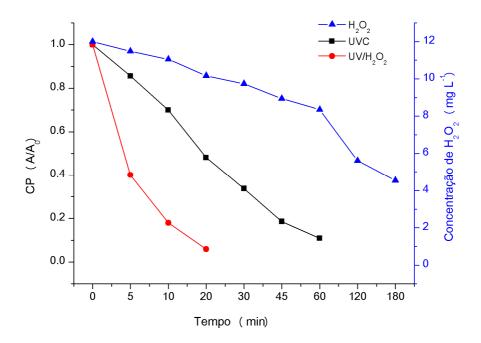


Figura 16 – Degradação do CP em função do tempo durante tratamento UVC e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Foi possível quantificar o CP tratado por radiação UVC até 60 minutos (Conc.=15,18 μg L<sup>-1</sup>) e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> até 10 minutos (Conc. =30,05 μg L<sup>-1</sup>). Já a detecção do composto foi possível até 60 e 20 minutos de tratamento, para a radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. Isto indica mais de 97% de degradação ao final dos tratamentos.

Contudo, através do método analítico desenvolvido não é possível afirmar a real degradação do composto, uma vez que não foi possível analisar a concentração do CP abaixo do limite de quantificação do método e o HPLC-DAD não possibilita a identificação de compostos possivelmente gerados em níveis traços, como seria o caso de um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS).

Neste sentido, com o intuito de averiguar a presença ou não de níveis traços de CP ou de possíveis metabólitos gerados durante os tratamentos, foram conduzidos ensaios ecotoxicológicos com *D. magna* e *A. aegypti* (organismos que apresentaram resposta aos ensaios ecotoxicológicos para o CP).

Inicialmente, os testes foram realizados com *D. magna* com amostras tratadas nos tempos 45, 60, 120 e 180 minutos, uma vez que este organismo apresentou maior sensibilidade ao contaminante. A partir dos resultados obtidos, ensaios com *A. aegypti* foram realizados apenas para os tempos 120 e 180 minutos. Os resultados destes ensaios são apresentados no subitem 5.4.1 e 5.4.2.

#### 5.3.1 Estudos Cinéticos

De acordo com dados da literatura para estudos de degradação de CP por *AOP* ou por fotólise direta (MUHAMAD, 2010; FEMIA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2015), a degradação do CP segue uma reação de *pseudo*-primeira ordem.

Dessa forma, um método gráfico foi aplicado para confirmar a ordem da reação de degradação. O gráfico de  $ln(C/C_0)$  (onde C representa a concentração final e  $C_0$  a concentração inicial) *versus* o tempo de tratamento, demonstra um comportamento linear (Figura 17 a e b), sugerindo uma cinética de *pseudo*-primeira ordem para o decaimento da concentração de CP com a aplicação do processo  $UV/H_2O_2$ . Para radiação UVC, a reação é de primeira ordem.

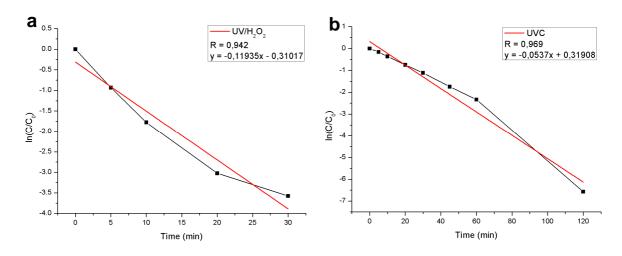


Figura 17 – Gráfico de In(C/C<sub>0</sub>) versus tempo de tratamento via processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) e UVC (b).

A constante de velocidade da reação (k) foi obtida através do valor da inclinação da curva de regressão linear (ZHAO *et al.*, 2004). Na Tabela 9 são apresentados os valores de k e tempo de meia vida ( $t\frac{1}{2}$ ) do CP em cada um dos processos aplicados. O  $t\frac{1}{2}$  foi calculado pela fórmula  $t\frac{1}{2} = 0.693/k$ .

Tabela 9 – Constante de velocidade de reação e tempo de meia vida do CP no processo  $UV/H_2O_2$  e UVC.

Processo de tratamento	Constante de velocidade da reação ( <i>k</i> ) (min <sup>-1</sup> )	Tempo de meia vida t½ (min)
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,119	5,8
UVC	0,053	12,9

Neste estudo, o valor da constante k para o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi de 0,119 min<sup>-1</sup>, valor próximo ao encontrado por Femia *et al.* (2013) para o mesmo processo ( $k = 0,127 \text{ min}^{-1}$ ). Para o tratamento com radiação UVC a constante foi igual a 0,053 min<sup>-1</sup>, demonstrando que o processo com adição de peróxido de hidrogênio é mais rápido na degradação do CP do que apenas a fotólise direta.

#### 5.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

Uma vez considerado o valor de 0,2% de ACN nas soluções de CP, definido através dos testes de solubilidade, foram conduzidos ensaios de ecotoxicidade da ACN com *L. sativa* (fitotoxicidade), *D. magna* e *A. aegypti*, a fim de verificar se há contribuição do solvente nos resultados dos ensaios ecotoxicológicos. Os resultados destes ensaios preliminares com ACN serão apresentados nos próximos itens.

Os resultados obtidos não indicaram efeito no crescimento das radículas das sementes de alface, nem causaram imobilidade para *D. magna* e *A. aegypti*. Desta forma, a proporção de 0,2% de ACN foi mantida para a preparação das soluções de trabalho de CP. Ressalta-se que estes ensaios com a ACN foram realizados antes de se iniciarem os experimentos de degradação do CP e antes da definição e validação do método cromatográfico para detecção e quantificação do agrotóxico.

Ressalta-se que a larva do *A. aegypti* foi empregada neste trabalho devido à susceptibilidade deste organismo aos inseticidas, no caso o organofosforado clorpirifós.

## 5.4.1 Ensaios de Ecotoxicidade Aguda de Clorpirifós com Daphnia magna

Primeiramente, foram testadas concentrações de ACN de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0%. Após 48h, nenhum organismo imóvel foi observado nos grupos expostos à ACN e ao controle negativo. O mesmo ensaio foi realizado uma segunda vez, para confirmação dos resultados, e novamente nenhuma imobilidade após 48h foi observada.

Como a ACN não influenciou na imobilidade dos organismos, foram conduzidos os ensaios preliminar e definitivo com amostras aquosas de CP (0,2% de ACN), a fim de determinar a  $CE_{50}$ .

Os testes preliminares foram conduzidos em triplicata com 10 organismos em cada béquer e 20 mL de amostra (ABNT, 2009). Foram definidas as seguintes concentrações de CP: 0,2; 2; 20 e 200 µg L<sup>-1</sup>.

Ensaios preliminares indicaram que a  $CE_{50}$  encontra-se entre as concentrações de 0,02 e 0,2  $\mu$ g  $L^{-1}$ . Dessa forma, o ensaio definitivo foi realizado em duplicata com 10 organismos, na faixa de concentração de 0,05 a 0,3  $\mu$ g  $L^{-1}$ , conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Imobilidade de D. magna em ensaio definitivo de ecotoxicidade aguda.

Replicata	СТ	Concentrações de CP (µg L <sup>-1</sup> )					
Керпсата	Ci	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05
1 (n=10)	0	9	6	7	1	3	0
2 (n=10)	1	10	6	7	5	2	0
Média	0,5	9,5	6,0	7,0	3,0	2,5	0
Imóveis (%)	5	95	60	70	30	25	0

Nota: CT: controle negativo.

A Figura 18 apresenta o gráfico da curva da concentração-resposta após 48 horas, resultante do teste estatístico de Probitos, na qual foi possível calcular a  $CE_{50}$  do CP.

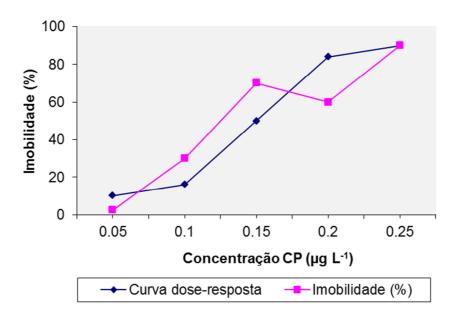


Figura 18 - Gráfico de Probitos para D. magna após 48h do ensaio ecotoxicológico definitivo

Através destes resultados foi possível calcular a  $CE_{50}$  48h de 0,15  $\mu$ g  $L^{-1}$ , resultado este similar ao encontrado na literatura de 0,16  $\mu$ g  $L^{-1}$  (OMS, 2009) e 0,19  $\mu$ g  $L^{-1}$  (KIKUCHI, SASAKI, WAKABAYASHI, 2000). Com a definição da  $CE_{50}$ , organismos foram expostos às amostras tratadas e não tratadas pelo processo  $UV/H_2O_2$  e UVC.

Durante a condução de todos os ensaios, foram realizados semanalmente ensaios de sensibilidade e com os resultados obtidos foi confeccionada a cartacontrole do cultivo. A carta-controle foi elaborada através do método de Probitos com auxílio de software BioStat® a partir do resultado de 20 ensaios de sensibilidade. Foram calculados o valor médio, o desvio padrão e o coeficiente de variação da sensibilidade dos organismos com relação a substância de referência (KCI). Os ensaios preliminar, definitivo e com amostras tratadas somente foram realizados quando o valor obtido no ensaio de sensibilidade dos lotes de *D. magna* ficaram compreendidos num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos na carta-controle.

# 5.4.5.1 Ecotoxicidade Aguda em D. magna de Amostras Tratadas de Clorpirifós

Os ensaios foram conduzidos em duplicata, com 10 organismos em cada béquer, sendo avaliada a porcentagem de imobilização dos organismos em cada amostra. Foram coletadas alíquotas das soluções de CP antes e durante o tratamento nos tempos 0, 45, 60, 120 e 180 minutos. Os resultados dos ensaios são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Média dos resultados de imobilidade (%) de *D. magna* em amostras tratadas e não tratadas após processo UVC e UV/H₂O₂.

Replicata	СТ	Tei	mpo de tra	tamento (	UVC (min)	
Rophodia	0.	0	45	60	120	180
1 (n=10)	0	10	10	10	10	10
2 (n=10)	0	10	10	10	10	10
Média	0	10	10	10	10	10
Imobilização (%)	0	100	100	100	100	100
Replicata	СТ	Tempo de tratamento UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (min)				
Rophodia	0.	0	45	60	120	180
1 (n=10)	0	10	10	10	10	10
2 (n=10)	0	10	10	10	10	10
Média	0	10	10	10	10	10

Nota: CT: controle negativo.

0

Imobilização (%)

Foi verificado a não redução da ecotoxicidade aguda da solução de CP durante o tratamento, mesmo após 180 minutos, ou seja, a toxicidade se manteve em 100%.

100

100

100

100

100

Alíquotas das soluções foram coletadas durante o processo de tratamento em diferentes tempos até 180 minutos e analisadas em HPLC-DAD, sendo possível detectar visualmente o pico do CP até 60 minutos, em amostras tratadas por radiação UVC, e até 30 minutos, em amostras tratadas pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Figura 19 apresenta a comparação entre os resultados de imobilização das amostras tratadas nos tempo 0, 45, 60, 120 e 180 minutos e a relação  $C/C_0$ , onde C é a concentração final de CP e  $C_0$  é a concentração inicial.

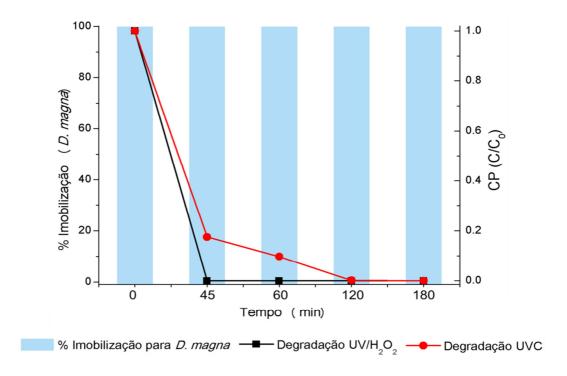


Figura19 - Imobilização (%) de D. magna e degradação de CP por UVC e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Não foram encontrados na literatura trabalhos realizados em condições similares às definidas para este estudo. Desta forma, levantaram-se quatro possíveis justificativas para este resultado:

- Primeira hipótese: o tratamento realizado de forma branda (com a lâmpada suspensa a 10 cm de distância da solução), não possibilitou a total degradação do CP, de forma que ao fim do tratamento ainda havia uma concentração de CP maior que a CE<sub>50</sub> calculada em ensaios de ecotoxicidade para *D. magna* (CE<sub>50</sub>=0,15 μg L<sup>-1</sup>) e abaixo do LD do método cromatográfico (LD=5 μg L<sup>-1</sup>), uma vez que não foi possível detectar o composto via HPLC-DAD a partir de 45 minutos para o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e 60 minutos para o processo UVC;
- Segunda hipótese: considerando os resultados das análises cromatográficas, possíveis subprodutos, mais tóxicos do que o CP, podem ter sido gerados durante os tratamentos, causando 100% da imobilidade dos organismos. Contudo, através do HPLC-DAD não é possível realizar a detecção e identificação de subprodutos;

- Terceira hipótese: considera a possível formação de subprodutos da ACN, mesmo esta estando a 0,2% em solução. De acordo com Augugliaro et al. (2004), o principal subproduto de degradação da ACN após oxidação fotocatalítica por TiO<sub>2</sub>, é o íon cianeto, o qual é considerado altamente tóxico;
- Quarta hipótese: no caso do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, onde é adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  e catalase à solução, um possível efeito sinérgico, aditivo ou de
  potencialização entre os constituintes da amostra pode estar causando a
  elevada toxicidade.

Considerando as quatro hipóteses levantadas, foram conduzidos ensaios de ecotoxicidade aguda com amostras dos constituintes da solução de tratamento, denominados amostras-controle, e ensaios com metanol, a fim de verificar se os resultados obtidos são provenientes de subprodutos de degradação da ACN e da interação dos demais compostos adicionados à solução.

### 5.4.1.2 Ecotoxicidade das amostras-controle em D. magna

Os ensaios foram conduzidos em triplicata, com 10 organismos em cada béquer, sendo avaliada a porcentagem de imobilização dos organismos em cada amostra.

Foram preparadas soluções das amostras-controle com os solventes ACN e metanol, tratados por 180 minutos, solução de catalase e solução de metanol 0,2%, conforme ilustrado na Figura 20. As soluções das amostras-controle dos tratamentos foram tratados por 180 minutos e ajustado o pH para 7-8 com NaOH e HCl.

O metanol e a ACN utilizados no preparo das soluções foi de grau HPLC. A catalase usada para o abatimento de peróxido e para a preparação da amostracontrole 5 (água e catalase 4%) foi preparada com no máximo três dias de antecedência da realização dos testes.

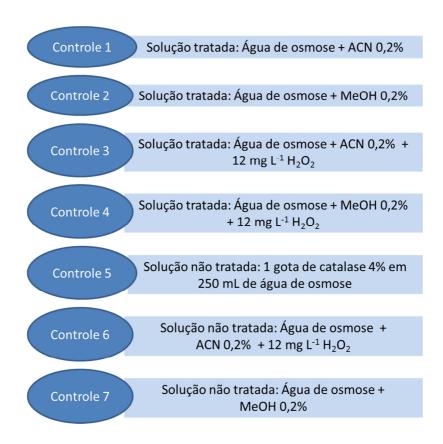


Figura 20 – Fluxograma da preparação das soluções das amostras-controle.

A Tabela 12 apresenta os resultados dos ensaios em relação à imobilidade dos organismos.

Tabela 12 – Imobilidade média (%) em D. magna após exposição às amostras-controle.

Amostras	Média de organismos imóveis (n=30)	(Continua) Imobilização (%)
Controle 1 (H <sub>2</sub> O osmose + 0,2% de ACN - tratada)	10	100
Controle 2 (H₂O osmose + 0,2% MeOH - tratada)	10	100
Controle 3 ( $H_2O$ osmose + 0,2% de ACN + 12 mg $L^{-1}$ $H_2O_2$ - tratada)	10	100

Tabela 15 - Imobilidade média (%) em D. magna após exposição às amostras-controle.

<u> </u>	Média de organismos	(conclusão) Imobilização
Amostras	imóveis (n=30)	(%)
Controle 4	10	
$(H_2O \text{ osmose} + 0.2\% \text{ MeOH} + 12 \text{ mg L}^{-1} H_2O_2 -$		100
tratada)		
Controle 5	10	100
(catalase 4% + H <sub>2</sub> O osmose - sem tratamento)	10	100
Controle 6	1,3	
$(H_2O \text{ osmose} + 0.2\% \text{ de ACN} + 12 \text{ mg L}^{-1} H_2O_2 -$		13,3
sem tratamento)		
Controle 7	0	0
H <sub>2</sub> O osmose + 0,2% MeOH - sem tratamento)	0	0

Com exceção da amostra de metanol 0,2%, referente ao controle 7, todas as amostras testadas apresentaram imobilidade acima de 10%. Com esses resultados foi possível verificar que os solventes orgânicos ACN e metanol não apresentam ecotoxicidade aguda à *D. magna* na proporção mínima de 0,2%, porém, após o tratamento, seja por radiação UVC ou por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, efeitos agudos foram observados, resultando em 100% de imobilidade dos organismos.

No caso dos tratamentos com ACN em solução, acredita-se que este resultado possa ser devido a formação de pequena quantidade de cianeto, o qual é considerado tóxico, principalmente para organismos aquáticos. A formação de cianeto, em presença de radicais hidroxila, bem como os demais subprodutos de degradação da acetonitrila pode ser explicada pelas equações 18 a 21, descritas em trabalho realizado por Addamo *et al.* (2005).

$$CH_3CN + HO^{\bullet} = CH_3OH + CN^{\bullet}$$
 (18)

$$CN + 2 OH^{T} + H^{+} = CNO^{T} + H_{2}O$$
 (19)

$$CN^{\bullet} + OH^{-} = CN^{-} + HO^{\bullet}$$
 (20)

$$CNO^{-} + 10 OH^{-} + 8 h^{+} = CO_{3}^{2-} + NO^{3-} + 5 H_{2}O$$
 (21)

Addamo *et al.* (2005) estudaram a degradação fotocatalítica da ACN em suspensão de TiO<sub>2</sub>, onde foi observada a formação de íons cianato e carbonato, e dos íons cianeto, nitrito, nitrato e metanoato, em menor quantidade. Estes compostos também foram observados em trabalho de Augugliaro *et al.* (2004).

Em relação ao tratamento da solução contendo metanol, a toxicidade elevada pode ser explicada pela formação de metanal (HCOH), o qual é tóxico para organismos aquáticos, até mesmo para vertebrados superiores (CETESB, 2016), sendo rapidamente absorvido no trato respiratório e gastrointestinal.

Também de acordo com Addamo *et al.* (2005), a oxidação do metanol dissolvido em água por TiO<sub>2</sub>, em presença de radicais hidroxila, pode seguir as seguintes rotas, de acordo com as equações 22 a 24:

$$CH_3OH + 2 HO^{\bullet} = HCOH + 2 H_2O$$
 (22)

$$HCOH + 3 OH^{-} + 2 h^{+} = HCOO^{-} + 2 H_{2}O$$
 (23)

$$HCOO^{-} + 3OH^{-} + 2h^{+} = CO_{3}^{2-} + 2H_{2}O$$
 (24)

Essas rotas de degradação da ACN e do metanol das equações 18 a 24 foram propostas para a degradação dos solventes em presença de radical hidroxila, porém a toxicidade de amostras tratadas apenas por radiação UVC também apresentaram ecotoxicidade elevada, o que sugere também a formação de subprodutos tóxicos.

A amostra contendo apenas catalase 4% também apresentou efeito tóxico para *D. magna*, imobilizando 100% dos organismos. Contudo, em artigo publicado por Olmez-Hanci, Arslan-Alaton e Dursun (2014), não foi observado efeito tóxico de soluções de catalase (2500 U  $L^{-1}$ ) e de soluções de peróxido de hidrogênio abatido com catalase, ambos em pH 7,0  $\pm$  0,2.

Dessa forma, uma das hipóteses que justifique a ecotoxicidade aguda da solução é uma possível contaminação da catalase por fungos, uma vez que a solução preparada era utilizada até uma semana após o preparo. Ressalta-se que foi observada contaminação (pontos pretos na solução) em soluções estocadas por mais de duas semanas.

#### 5.4.2 Ensaios de Ecotoxicidade Aguda de Clorpirifós com Aedes aegypti

Devido aos resultados de ecotoxicidade aguda com *D. magna* nos ensaios com diferentes proporções de ACN, foi inicialmente conduzido um ensaio com 0,2% de ACN em solução (v/v), objetivando verificar possíveis efeitos agudos da ACN para *A. aegypti*.

O ensaio foi realizado com um total de 60 larvas no terceiro/quarto estádio, expostas à solução de ACN a 0,2% por 24 horas. Após esse período, não foi verificada imobilidade de nenhuma larva, tanto daquelas expostas à solução quanto as do controle (água de osmose).

Como a ACN não influenciou na imobilidade dos organismos, foram conduzidos os ensaios preliminar e definitivo com amostras aquosas de CP (0,2% de ACN), a fim de determinar a CE<sub>50</sub>. Os ensaios com *A. aegypti* não apresentaram imobilidade maior que 20% nos controles, validando os resultados obtidos.

Os testes preliminares de ecotoxicidade foram conduzidos em triplicata com 20 organismos em cada béquer, conforme modificação da metodologia da OMS (1981). Para o teste preliminar foram preparadas soluções aquosas de CP (0,2% de ACN) nas seguintes concentrações: 0,2; 2; 20 e 200 µg L<sup>-1</sup>.

Após a exposição, houve 6,7% de imobilidade para a concentração de 0,2 μg L<sup>-1</sup>. Nas demais concentrações a imobilidade atingiu 100%. Dessa forma, um ensaio definitivo foi realizado com cinco concentrações variando de 0,2 a 2 μg L<sup>-1</sup>. Os resultados deste ensaio são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Imobilidade (%) de larvas de *A. aegypti* após exposição a diferentes concentrações de CP.

Replicata	СТ	0,2 μg L <sup>-1</sup>	0,5µg L <sup>-1</sup>	0,8 μg L <sup>-1</sup>	1,0 µg L <sup>-1</sup>	2,0 μg L <sup>-1</sup>
1 (n=20)	1	2	7	6	16	17
2 (n=20)	0	3	7	11	15	18
3 (n=20)	0	1	7	11	15	20
Média	0,3	2	7	9,3	15,3	18,3
Imobilidade (%)	1,7	10	35	46,7	76,7	91,7

Nota: CT: controle negativo.

A partir destes resultados, foi calculada a CE<sub>50</sub> do CP de 0,84 μg L<sup>-1</sup>. A Figura 21 apresenta o gráfico da curva da concentração-resposta após 24 horas, resultante do teste estatístico de Probitos.

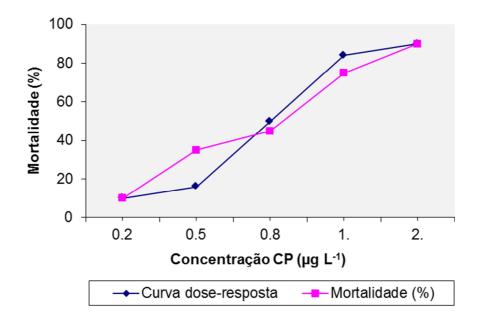


Figura 21 – Gráfico de Probitos para *A. aegypti* após 24h do ensaio ecotoxicológico definitivo.

Embora a CE<sub>50</sub> calculada para o *A. aegypti* tenha sido maior do que para a *D. magna*, o organismo em estágio larval se mostrou mais sensível para as baixas concentrações de CP avaliadas neste trabalho.

# 5.4.2.1 Ecotoxicidade Aguda em A. aegypti de Amostras Tratadas de Clorpirifós

Soluções aquosas de CP (CP=200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> + 0,2% de ACN) tratadas por radiação UVC e pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram avaliadas quanto à ecotoxicidade após os processos de degradação.

Os ensaios foram realizados em triplicata com 20 organismos cada réplica. Para estes ensaios foram coletadas alíquotas das soluções tratadas nos tempos 120 e 180 minutos. Os resultados dos ensaios são apresentados na Tabela 14, para tratamento UVC e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabela 14 – Imobilidade média (%) de larvas de *A. aegypti* após exposição a amostras tratadas por processo UVC e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Replicata	СТ	Tempo d	Tempo de tratamento UVC (m		
Replicata	01 _	0	120	180	
1 (n=20)	0	20	20	1	
2 (n=20)	0	20	17	2	
3 (n=20)	1	20	18	0	
Média	0,3	20	18,3	1	
Imobilização (%)	1,7	100	91,7	5	

Replicata	СТ	Tempo de tr	ratamento UV	ento UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (min)	
rtophoutu	0.	0	120	180	
1 (n=20)	0	20	14	20	
2 (n=20)	0	20	17	20	
3 (n=20)	1	20	18	19	
Média	0,3	20	16,3	19,7	
Imobilização (%)	1,7	100	81,7	98,3	

Nota: CT: controle negativo.

Nos ensaios com larvas de *A. aegypti* foi verificado que, embora em 120 e 180 minutos não tenha sido detectado CP nas amostras analisadas através de HPLC-DAD, após o final do tratamento por UVC a amostra não foi considerada tóxica, uma vez que a redução da imobilidade em relação ao tempo zero foi de 95%. Em contrapartida, a amostra tratada por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou imobilidade muito próxima de 100% ao final de 180 minutos de tratamento, resultando numa redução da toxicidade de apenas 1,7%, conforme possível verificar na Figura 22.

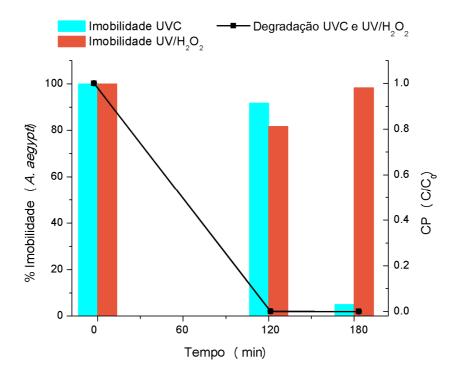


Figura 22 – Imobilidade média (%) de larvas de *A. aegypti* e degradação de CP por UVC e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Da mesma forma como ocorrido nos ensaios com *D. magna*, levantou-se a hipótese da formação de subprodutos mais tóxicos durante o processo de tratamento por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo esses subprodutos originados a partir da degradação do CP ou dos compostos presentes na solução, tal como a acetonitrila.

Dessa forma, ensaios com as amostras-controle dos tratamentos foram conduzidos, conforme realizado com *D. magna*.

### 5.4.5.2 Ecotoxicidade das Amostras-controle em A. aegypti

Os ensaios foram conduzidos em triplicata, com 20 organismos em cada béquer, sendo avaliada a imobilidade dos organismos em cada amostra. Foram preparadas amostras-controle dos tratamentos, solução de catalase e solução de metanol 0,2%. As soluções das amostras-controle dos tratamentos foram tratados por 180 minutos e ajustado o pH para 7-8 com NaOH e HCl. A Tabela 15 apresenta os resultados dos ensaios.

Tabela 15 – Imobilidade média (%) de larvas de *A. aegypti* expostas as amostras-controle.

Amostras	Média imóveis (n=60)	Imobilidade (%)
Controle 1 (H₂O osmose + 0,2% de ACN - tratada)	0,7	2,7
Controle 2 (H₂O osmose + 0,2% MeOH - tratada)	3,7	18,3
Controle 3 (H₂O osmose + 0,2% de ACN + 12 mg L <sup>-1</sup> H₂O₂ - tratada)	20	100
Controle 4 (H <sub>2</sub> O osmose + 0,2% MeOH + 12 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - tratada)	2,3	11,7
Controle 5 (catalase 4% + H <sub>2</sub> O osmose - sem tratamento)	0,3	1,7
Controle 7 H <sub>2</sub> O osmose + 0,2% MeOH - sem tratamento)	1,7	8,3

De todas as amostras testadas, apenas a referente ao controle do tratamento pelo processo  $UV/H_2O_2$  com ACN (água de osmose + 12 mg  $L^{-1}$   $H_2O_2$  + 0,2% de ACN), referente ao controle 3, apresentou elevada imobilidade, neste caso de 100%.

Este resultado pode ser explicado pela formação de pequena quantidade de cianeto, o qual é considerado tóxico, principalmente para organismos aquáticos, conforme já explicado anteriormente, com base no trabalho de Addamo *et al.* (2005).

Embora não tenha sido possível identificar subprodutos de degradação pelo método cromatográfico desenvolvido (HPLC-DAD), os ensaios de ecotoxicidade aguda com *D. magna* e *A. aegypti* confirmaram que a toxicidade aguda da amostra tratada pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi ocasionada, em grande parte, pela formação de subprodutos da ACN. Não se sabe se houve ou não contribuição destes possíveis subprodutos gerados na ecotoxicidade aguda das soluções tratadas em ambos os processos de tratamento.

### 5.4.3 Ensaios de Ecotoxicidade Aguda de Clorpirifós com *Danio rerio*

Os peixes foram aclimatados durante 15 dias, conforme NBR 15088 (ABNT, 2011), e neste período parâmetros físico-químicos foram monitorados a fim de manter a qualidade da água. Os parâmetros monitorados foram: temperatura, oxigênio dissolvido (OD), dureza e pH. Os mesmos parâmetros também foram monitorados durante os ensaios de ecotoxicidade. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 16 e comparados com os valores determinados pela NBR 15088 (ABNT, 2011).

Tabela 16 – Parâmetros físico-químicos monitorados durantes as etapas de aclimatação e durante os testes de ecotoxicidade aguda com *D. rerio*.

Parâmetros	Aclimatação	NBR 15088/11
Temperatura (°C) *	22,97± 1,24	23 - 27
рН	7,81± 0,11	7,0 - 7,6
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	45.37± 4,08	40 – 48
OD (mg O L <sup>-1</sup> )	5,7± 0,4	>5

Nota: (\*): temperatura controlada com auxílio de termostato.

Durante o período de aclimatação, as concentrações de amônia foram superiores a 2,0 mg L<sup>-1</sup> [NH3-N], sendo este valor considerado muito elevado. Cavas (2011) reportou uma concentração de 0.001 mg L<sup>-1</sup> [NH<sub>3</sub>-N] durante a aclimatação do peixe *Carassius auratus*.

Para a realização do teste de ecotoxicidade aguda do CP foi definida a faixa de concentração de 0,2 a 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (solução aquosa + 0,2% de ACN). Após 96h de exposição ao CP, com renovação diária da solução, nenhum organismo morreu, não sendo possível calcular a CL<sub>50</sub>, na faixa de concentração definida de 0,2 a 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup>.

Embora não tenha havido mortalidade de nenhum peixe, este resultado pode ser comparado com o resultado obtido por Rodríguez-Fuentes *et al.* (2015), onde foram expostos indivíduos neonatos de *D. rerio* ao CP na concentração de 200 e

400 μg L<sup>-1</sup>. Os resultados indicaram que em 200 μg L<sup>-1</sup> houve mortalidade de apenas 4,17% dos organismos. Desta forma, a máxima concentração de CP testada não foi suficiente para se observar a toxicidade aguda em *D. rerio*.

Durante o período de exposição (em 24 e 72 horas), foram coletadas amostras das soluções de CP de 200 e 20 µg L<sup>-1</sup> para serem analisadas em HPLC-DAD. As concentrações de 2 e 0,2 µg L<sup>-1</sup> não foram analisadas, pois encontraram-se abaixo do LQ do método cromatográfico.

Os resultados das análises indicaram que em ambas as amostras a concentração de CP encontrava-se abaixo do LD do método analítico, mesmo sendo realizada a reposição das soluções a cada 24 horas, sugerindo a absorção do composto pelos organismos-teste.

# 5.4.4 Ensaios de Genotoxicidade de Clorpirifós com Danio rerio

O método para avaliação da ecotoxicidade aguda de amostras líquidas para *D. rerio* é determinado pela NBR 15088 (ABNT, 2011). Porém, para ensaios de genotoxicidade de amostras líquidas com peixes, não há nenhum protocolo nacional ou internacional que oriente e descreva uma metodologia para condução dos ensaios.

Desta forma, neste trabalho foram realizados dois diferentes ensaios para avaliação dos efeitos genotóxicos do CP em *D. rerio*. O primeiro foi realizado seguindo a metodologia descrita na NBR 15088 e o segundo, baseado em metodologias descritas em artigos (JIN *et al.*, 2011; ADEYEMI; MARTINS-JUNIOR; BARBOSA JR, 2015; ROCCO *et al.*, 2015). O Quadro 7 descreve a etapa de aclimatação e testes nos dois ensaios realizados.

Parâmetros	1° Ensaio	2° Ensaio
Tempo de aclimatação	15 dias	30 dias
Água de aclimatação	Água de diluição (NBR 15088)	Água filtrada e declorada
Alimentação	Ração em flocos para peixe	Filhotes de D. magna
Tempo de exposição	96 horas	96 horas
Água para realização dos testes	Água de diluição (NBR 15088)	Água filtrada e declorada

Quadro 7 – Descrição das etapas de aclimatação e exposição das amostras nos ensaios de genotoxicidade com *D. rerio*.

No primeiro ensaio, foram empregados os mesmos organismos expostos ao ensaio de ecotoxicidade aguda. Ao final de 96h de exposição ao CP, os organismos foram anestesiados e sacrificados, tendo sido coletadas amostras de sangue para a realização do ensaio cometa, segundo metodologia descrita por Speit e Hartmann (1999) com alterações de Ramsdorf (2007). O ensaio cometa foi realizado em quintuplicata, considerando cada um dos peixes como uma réplica.

Durante o manuseio dos peixes foi verificado que alguns organismos expostos às concentrações de CP apresentaram descamamento, contudo, não se pode afirmar que este seja um efeito gerado pela exposição ao contaminante. Nenhum comportamento anormal ou efeito morfológico foi verificado nos organismos expostos.

As lâminas preparadas com amostras de sangue de cada réplica (n=5), após corrida eletroforética e coloração com brometo de etídio, foram analisadas em microscópio de epifluorescência com aumento de 400 vezes. Foram analisados 100 nucleóides e estes classificados visualmente de acordo com o dano ao DNA nuclear (0 a 4). Foram calculados os escores de cada organismo, conforme apresentado na Figura 23, e os resultados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas.

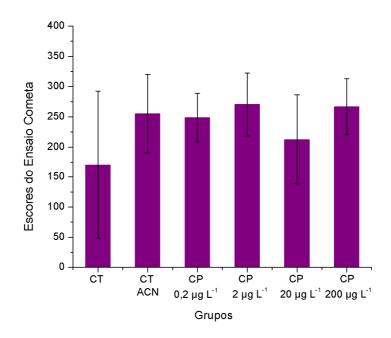


Figura 23 - Média dos escores (colunas) e desvios padrão (barra de erro) dos danos celulares analisados no 1° ensaio cometa (p=0,5742).

Nota: CT: água de diluição; CT ACN: água de diluição + 0,2% de acetonitrila.

Ao analisar a média dos escores calculados para cada grupo amostral, percebe-se que todas as amostras de CP apresentaram danos maiores em relação ao controle (CT). Contudo, de acordo com o teste estatístico não houve diferença significativa entre as amostras contendo CP, o controle negativo e do solvente (p>0,05). Observou-se também uma grande variação entre os resultados dos escores das réplicas do CT.

Possivelmente, não foi possível observar diferença estatística entre as amostras devido ao alto valor do escore (>200) observado para o controle (água de diluição). Valor alto do escore do controle também foi observado por Domingues et al. (2010) em ensaio de genotoxicidade com D. rerio, onde os escores obtidos nas amostras do controle encontravam-se próximos a 100.

Devido ao resultado obtido, levantou-se a hipótese de que o tempo de aclimatação dos organismos não tenha sido suficiente para a depuração dos danos do material genético dos peixes, uma vez que reações químicas no seu organismo podem ser desencadeadas pelo estresse sofrido em condições de não adaptação a um novo ambiente (FRANÇA, 2007). Desta forma, um segundo ensaio foi realizado com novos organismos, aclimatados por 30 dias.

Neste segundo ensaio, optou-se por realizar a aclimatação com água filtrada e declorada e a alimentação foi realizada com filhotes de *D. magna* a fim de reduzir a acumulação de matéria orgânica proveniente da ração de peixe, e consequentemente reduzindo a concentração de amônia proveniente do material degradado.

Para este segundo ensaio foram preparadas soluções aquosas de CP (0,2% de ACN) (200 μg L<sup>-1</sup>) antes e após tratamento por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sete organismos foram expostos em cada uma das amostras que continham 2 L de solução, com exceção das amostras tratadas, devido ao menor volume gerado (1 L). Nestas, foram expostos quatro organismos.

Durante a aclimatação dos peixes, foram monitorados temperatura, oxigênio dissolvido (OD), dureza e pH. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 17 e comparados com os valores determinados pela NBR 15088 (ABNT, 2011).

Tabela 17 – Parâmetros físico-químicos monitorados durantes as etapas de aclimatação e de testes com *D. rerio* no segundo ensaio.

Parâmetros	Aclimatação	NBR 15088/11
Temperatura (°C) *	24,9 ± 1,2	23 - 27
рН	$7,49 \pm 0,19$	7,0 - 7,6
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	62,19 ± 1,41	40 – 48
OD (mg O $L^{-1}$ )	$5,99 \pm 0,41$	>5

Nota: (\*): temperatura controlada com auxílio de termostato.

Decorridos 30 dias de aclimatação, os peixes foram colocados em béqueres contendo as soluções tratadas e não tratadas de CP, e nos béqueres do controle (água filtrada e declorada) e do controle do solvente (água filtrada e declorada + 0,2% de ACN).

Após aproximadamente 5 minutos, todos os peixes expostos à amostra da solução de CP tratada por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> morreram, enquanto que os peixes expostos à amostra tratada por radiação UVC apresentaram apenas redução da mobilidade. Todos os peixes mortos apresentaram manchas vermelhas na região

abaixo da cabeça e próximo às brânquias, característico de hemorragia interna, conforme verificado na Figura 24.

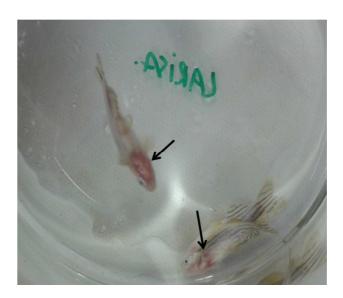


Figura 24 – Hemorragia causada após exposição à amostra tratada por processo UV/H₂O₂ (180 minutos).

Devido ao resultado obtido, uma solução da amostra-controle do processo  $UV/H_2O_2$  (água de osmose + 12 mg  $L^{-1}$   $H_2O_2$  + 0,2% de ACN) foi tratada por 180 minutos e o peróxido de hidrogênio abatido com catalase 4%. Quatro organismos foram expostos a esta solução. Todos os peixes morreram e apresentaram sinais de hemorragia, indicando que a mortalidade foi ocasionada pela exposição aos subprodutos de degradação da acetontrila gerados pelo tratamento  $UV/H_2O_2$ .

Este resultado corrobora os resultados dos ensaios de ecotoxicidade aguda com *D. magna* e *A. aegypti* e possibilita confirmar a hipótese da formação de subproduto da ACN, possivelmente íon cianeto.

O íon CN<sup>-</sup> pode ser absorvido por inalação, exposição oral ou dérmica, sendo rapidamente absorvido e alcançando diversos tecidos, principalmente através dos eritrócitos (células sanguíneas). Ao entrar na célula, o cianeto interrompe a atividade respiratória, causando anóxia celular (ZACARIAS, 2009).

Quanto às demais amostras, controle negativo (CT), controle negativo com ACN (CT ACN), CP 200 μg L<sup>-1</sup> e CP 200 μg L<sup>-1</sup> tratado por radiação UVC, os peixes foram anestesiados e sacrificados após 96 horas de exposição. Amostras de sangue

foram coletas para a realização do ensaio cometa. A Figura 25 apresenta os resultados dos escores de cada amostra.

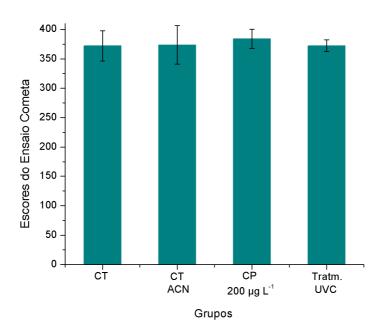


Figura 25 – Média dos escores (colunas) e desvios padrão (barra de erro) dos danos celulares analisados no 2° ensaio cometa (p=0,1545).

Os valores de escores obtidos foram elevados para todas as amostras, inclusive para as amostras dos controles, estando acima de 350. De acordo com o teste estatístico, não houve diferença significativa entre as amostras contendo CP tratado por radiação UVC e não tratado (CP=200 µg L<sup>-1</sup>), o controle negativo e do solvente (p>0,05).

Neste segundo ensaio foi verificada uma variação menor dos escores de cada réplica dentro de uma mesma amostra (desvio padrão menor), contudo houve aumento dos valores das médias dos escores em relação ao ensaio anterior, principalmente para a amostra do controle.

Essa diferença pode ser observada na Figura 26, onde é possível verificar que entre os dois diferentes ensaios houve diferença estatística (para amostras iguais em ambos os ensaios) (p<0,05).

O aumento dos escores nas amostras do segundo ensaio pode ser justificado pela interferência da água de aclimatação e do preparo das soluções não tratadas com água filtrada e declorada. Embora a água utilizada não tivesse

presença de cloro, outros compostos dissolvidos na água podem ter influenciado sua qualidade e consequentemente no resultado do ensaio cometa.

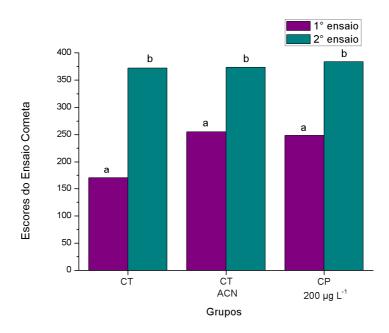


Figura 26 – Comparação das médias dos escores dos danos celulares analisados no 1° e 2° ensaio cometa.

Nota: Diferentes letras indicam diferença estatística (p<0,05), letras iguais não indicam diferença estatística entre amostras (p>0,05).

Não há na literatura informações referentes à interferência da qualidade da água nos resultados de ensaio cometa. Contudo, ao se trabalhar com peixes, principalmente ornamentais, muitos fatores podem causar o estresse nestes organismos: compostos nitrogenados, variações de temperatura e pH da água, manuseio frequente dos peixes, alimentação pobre em vitaminas e nutrientes, e possíveis doenças (FRANÇA, 2007).

Nestes ensaios, todos estes fatores foram controlados, principalmente dureza, pH, temperatura e amônia. Para evitar a formação de amônia, a matéria fecal e restos de comida foram sifonados diariamente. As medições de amônia ao longo do período de aclimatação variaram de 0,01 a 0,87 mgL<sup>-1</sup> [NH3-N].

#### 5.4.5 Ensaios de Fitotoxicidade de Clorpirifós com Lactuca sativa

Preliminarmente às amostras de CP, foram preparadas soluções de ACN nas proporções 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0% (v/v) a fim de verificar o efeito da ACN na germinação das sementes de alface.

Após 5 dias de incubação, verificou-se efeito de inibição do crescimento das radículas somente na concentração de 1,0%. Nas demais concentrações não houve efeito significativo.

Sendo assim, foram realizados ensaios com soluções aquosas de CP com 0,2% de ACN. Para o ensaio preliminar foi definida uma faixa ampla de concentração do CP (0,02 a 200 µg L<sup>-1</sup>). Os resultados foram avaliados de acordo com os IG (índices de germinação) e ICR (índices de crescimento relativo) de cada concentração em relação ao controle negativo. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados do ensaio preliminar de fitotoxicidade do clorpirifós (CP 0,02 a 200 μg L<sup>-1</sup> em solução aquosa + 0,2% de ACN) em *L. sativa*.

Amostras	Comprimento das raízes (cm)	CV (%)	IG (%)	ICR	Efeito
CT	$3,4 \pm 0,9$	27,2	-	-	-
200 μg L <sup>-1</sup>	$3.2 \pm 0.7$	24,1	96	1,0	ENS
20 μg L <sup>-1</sup>	$3.6 \pm 0.9$	25,0	107,9	1,1	ENS
2 μg L <sup>-1</sup>	$3.8 \pm 0.5$	14,1	116,6	1,1	ENS
0,2 μg L <sup>-1</sup>	$3.6 \pm 0.9$	25,6	99	1,1	ENS
0,02 μg L <sup>-1</sup>	$3.7 \pm 0.8$	22,9	99	1,1	ENS

Nota: CT: controle negativo; CV: coeficiente de variação; (IG) = índice de germinação; (ICR) = índice de crescimento relativo; (ENS) = efeito não significativo; (-) : não calculado.

Através do teste estatístico ANOVA (95% de confiança) não houve diferença estatística entre as amostras (p>0,05), confirmando os resultados avaliados pelo ICR. Como as sementes de *L. sativa* não apresentaram fitotoxicidade para a faixa de concentração de CP avaliada, não foi realizado ensaio definitivo com soluções de CP.

Este resultado pode estar relacionado às baixas concentrações de CP analisadas, o que poderia ser insuficiente para causar algum efeito sobre o processo de germinação das sementes e crescimento das radículas. Estudos semelhantes avaliaram a fitotoxicidade de CP em sementes de mostarda branca (*Sinapis alba L.*) e de milho (*Zea mayzs L.*) (GVOZDENAC; INDIC; VUKOVIC, 2013). Concentrações acima de 0,05 µg L<sup>-1</sup> não afetaram a germinação das sementes de milho, enquanto para sementes de mostarda branca houve efeito inibitório de crescimento.

Já o estudo realizado por Garcia *et al.* (2009), avaliou os efeitos tóxicos de efluentes têxteis tratados por processo TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sementes de alface. As concentrações de corantes não causaram efeito significativos.

Embora não tenha sido verificada fitotoxicidade das amostras não tratadas de clorpirifós, foi realizado ensaio com soluções tratadas por UVC e pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a fim de verificar se após o tratamento houve geração de subprodutos mais tóxicos capazes de inibir o crescimento das sementes.

### 5.4.5.1 Fitotoxicidade em L. sativa de Amostras Tratadas de Clorpirifós

Os ensaios foram conduzidos em triplicata com 17 sementes por réplica. As soluções aquosas de CP (0,2% de ACN) foram tratadas por radiação UVC e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 180 minutos, sendo ajustado o pH das soluções para aproximadamente 7 após o tratamento.

Os resultados dos ensaios de fitotoxicidade de amostras tratadas por 180 minutos são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados do ensaio de fitotoxicidade do clorpirifós (CP 200 μg L<sup>-1</sup> em solução aquosa + 0,2% de ACN) após tratamento (180 min) por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *L. sativa*.

Amostras	Comprimento das raízes (cm)	CV (%)	IG (%)	ICR	Efeito
CT 1	$3.3 \pm 0.9$	26,1	-	-	-
Tratamento UVC	$2,2 \pm 0,5$	23,7	103,8	0,7	EI
CT 2	$2.8 \pm 0.6$	22,8	-	-	-
Tratamento UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$2,0 \pm 0,5$	24,3	106,0	0,7	El

Nota: CT 1: controle negativo realizado para o ensaio com amostras tratadas por radiação UVC; CT 2: controle negativo realizado para o ensaio com amostras tratadas por processo  $UV/H_2O_2$ ; CV: coeficiente de variação; (IG) = índice de germinação; (ICR) = índice de crescimento relativo; (EI) = efeito de inibição; - : não calculado.

As soluções de CP tratadas por ambos os processos resultaram na inibição do crescimento das radículas, conforme esperado com base nos ensaios realizados com os demais organismos testes. Embora o solvente orgânico acetonitrila e o próprio CP sem tratamento, não tenham apresentado fitotoxicidade para as sementes de *L. sativa*, a geração de subprodutos de degradação interferiu negativamente no desenvolvimento das sementes.

#### 5.4.5.2 Ecotoxicidade das Amostras-controle em L. sativa

Devido aos resultados de inibição do crescimento das radículas após exposição às soluções tratadas de CP e devido aos resultados obtidos em ensaios com *D. magna*, *A. aegypti* e *D. rerio*, foram preparadas soluções das amostrascontrole de tratamento (soluções sem CP, em acetonitrila).

As soluções preparadas com o solvente metanol não foram empregadas nestes ensaios, uma vez que, através dos ensaios de ecotoxicidade aguda realizados com os demais organismos teste, não foi verificado efeito tóxico significativo das soluções contendo este solvente.

As soluções das amostras-controle dos tratamentos foram tratados por 180 minutos e ajustado o pH próximo a 7 com NaOH e HCl. A Tabela 20 apresenta os resultados dos ensaios.

Tabela 20 – Resultados do ensaio de fitotoxicidade de sementes de *L.* sativa expostas as amostras-controle tratadas por 180 minutos.

Amostras	Comprimento das raízes (cm)	CV (%)	IG (%)	ICR	Efeito
CT 1	$2,9 \pm 0,6$	22,2	-	-	-
H <sub>2</sub> O osmose + 0,2% de ACN	$2.8 \pm 0.6$	22,7	102,0	1,0	ENS
CT 2	$2,6 \pm 0,8$	30,2	-	-	-
$H_2O$ osmose + 0,2% de ACN + 12 mg $L^{-1}$ $H_2O_2$	$1,5 \pm 0,4$	29,0	102,1	0,6	EI

Nota: CT 1: controle negativo realizado para o ensaio com amostras tratadas por radiação UVC; CT 2: controle negativo realizado para o ensaio com amostras tratadas por processo  $UV/H_2O_2$ ; CV: coeficiente de variação; (IG) = índice de germinação; (ICR) = índice de crescimento relativo; (ENS): efeito não significativo; (EI) = efeito de inibição; -: não calculado.

Da mesma forma como constatado nos bioensaios de ecotoxicidade aguda, foi observada fitotoxicidade para as sementes de *L. sativa* em amostras isentas de CP, tratadas por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando na inibição do crescimento das radículas. Na amostra tratada por radiação UVC não houve efeito significativo, indicando desta forma que, o efeito tóxico resultou da formação de subprodutos da ACN.

Através dos ensaios conduzidos com *L. sativa* foi observada a importância da avaliação da ecotoxicidade de contaminantes ou de efluentes após o tratamento, uma vez que, ao se avaliar a fitotoxicidade de amostras não tratadas, não foi verificado efeito inibitório ou de crescimento, enquanto que para as amostras tratadas, constatou-se efeito inibitório.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como enfoque avaliar a degradação do CP (padrão, 99,9% de pureza) em água de osmose, em concentração similar à encontrada no meio ambiente.

Para tanto, foi avaliado inicialmente a solubilidade do composto puro em água de osmose e em outros tipos de água (de torneira, mineral e superficial). Através dos testes de solubilidade realizados, foi verificado que o CP apresenta baixa solubilidade em água, quando não há adição de solventes orgânicos. Este resultado contradiz a literatura, que indica uma solubilidade de até 1,05 mg L<sup>-1</sup>.

Desta forma, verificou-se que para a concentração de CP empregada neste estudo (200 µg L<sup>-1</sup>), foi necessário preparar a solução do composto em acetonitrila, de forma que em água a proporção de solvente fosse no mínimo 0,2% (v/v), suficiente para manter a solubilidade do CP em meio aquoso.

A degradação do CP foi realizada por fotólise direta (radiação UVC) e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com a lâmpada suspensa a 10 cm da solução, a fim de possibilitar o monitoramento do CP ao longo dos tratamentos, até 180 minutos.

Foi possível detectar o CP até 60 e 20 minutos, durante os tratamentos por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. Este resultado demonstrou que o processo oxidativo degradou o composto mais rapidamente, conforme comprovado pela constante de velocidade de reação *k*, calculado em 0,119 min<sup>-1</sup> pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,053 pela radiação UVC. A eficiência de tratamento obtida foi superior a 97% ao final de ambos os processos. Contudo, verificou-se a necessidade de monitorar a toxicidade do CP antes e após os tratamentos.

Em ensaios ecotoxicológicos, foram avaliados quatro organismos teste para ensaios de fitotoxicidade, ecotoxicidade aguda e genotoxicidade, em diferentes níveis tróficos: sementes de *Daphnia magna*, larvas de *Aedes aegypti*, *Danio rerio* e *Lactuca sativa*.

Nos ensaios de ecotoxicidade aguda em *D. magna* e *A. aegypti*, ambos os organismos foram sensíveis às amostras testadas, sendo possível calcular as respectivas CE<sub>50</sub>. Após o tratamento de soluções aquosas de CP, foi observado elevado efeito tóxico (100% de imobilidade) das amostras tratadas para *D. magna*, por ambos os processos de tratamento. Já em ensaios com *A. aegypti*, foi

observado elevada toxicidade (>90% de imobilidade) para a amostra tratada pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, após 180 minutos de tratamento.

Ensaios com amostras-controle dos tratamentos indicaram que a toxicidade elevada das amostras tratadas pelo processo oxidativo provavelmente é proveniente da formação de subprodutos da degradação da acetonitrila, (p.e. íon cianeto).

Ensaios de genotoxicidade com *D. rerio* não indicaram efeitos genotóxicos das amostras de CP antes e após os tratamentos. Ressalta-se que a amostra tratada por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causou a mortalidade de todos os peixes expostos, bem como a amostra-controle de tratamento, indicando novamente que os efeitos tóxicos da amostra tratada pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são provenientes da presença de subprodutos de degradação da acetonitrila.

Através dos ensaios de fitotoxicidade em sementes de *L. sativa* foi observada fitotoxicidade das amostras tratadas por ambos os processos de tratamento, sugerindo a formação de subprodutos mais tóxicos durante o tratamento.

Embora não tenha sido possível detectar possíveis subprodutos de degradação do CP ao longo do tratamento devido ao método analítico desenvolvido, os ensaios de ecotoxicidade realizados durante e após o tratamento demonstraram efeito tóxico das amostras, resultados estes que evidenciam a necessidade de se usar ensaios ecotoxicológicos na avaliação de amostras tratadas com *AOP*.

Através deste estudo foi observado que a ecotoxicidade do CP puro em solução não provém, em maior parte, de seus metabólitos, mas sim dos subprodutos de degradação do solvente utilizado para proporcionar a solubilização do agrotóxico. Esse resultado demonstra que os efeitos ecotoxicológicos de uma solução devem ser avaliados não apenas em relação ao composto de interesse, mas sim a todos os componentes de uma solução.

A partir destes resultados, sugerem-se estudos posteriores para avaliar os possíveis subprodutos do CP e de solventes orgânicos após o tratamento, bem como a avaliação de parâmetros bioquímicos, como a AChE, a fim de confirmar a toxicidade do CP após o tratamento com diferentes parâmetros bioquímicos e organismos de níveis tróficos.

## **REFERÊNCIAS**

ABNT: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

ABNT: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088:**NBR Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 201.

ABRAHAM, J.; SILAMBARASAN, S. Kinetic studies on enhancement of degradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP by a newly isolated *Alcaligenes* sp. JAS1.**Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 438-445, 2013.

ADDAMO, M.; AUGUGLIARO, V.; COLUCCIA, S.; FAGA, M.; GARCÍA-LÓPEZ, E.; LODDO, V.; MARCÌ, G.; MARTRA, G.; PALMISANO, L. Photocatalytic oxidation of acetonitrile in gas—solid and liquid—solid regimes. **Journal of Catalysis**, v. 235, p. 209-220, 2005.

ADEYEMI, J.; MARTINS-JUNIOR, A.; BARBOSA JR, F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v.** 172-173, p. 7-12, 2015.

AFFAM, A. C.; CHAUDHURI, M..Degradation of pesticides chloryrifos, cypermethrin and chlorothalonil in aqueous solution by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. **Journal of Environmental Management**, v.130, p.160-165, 2014.

ALI, D.; NAGPURE, N.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemixal Toxicology**, v. 47, p. 650-656, 2009.

ALHARBI, H.; LETCHER, R.; MINEAU, P.; CHEN, D.; CHU, S. Organophosphate pesticide method development and presence of chlorpyrifos in the feet of nearctic-neotropical migratory songbirds from Canada that over-winter in Central America agricultural areas. **Chemosphere**, v. 144, p. 827-835, 2016.

ALMARAJ, A.; PIUS, A. Photocatalytic degradation of monocrotophos and chlorpyrifos in aqueous solution using TiO<sub>2</sub> under UV radiation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 7, p. 94-101, 2015.

ANDRADE, A. S.; QUEIROZ, V.; LIMA, D.; DRMUND, L.; QUEIROZ, M.; NEVES, A. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do Alto Paranaíba – MG. **Química Nova,** v.34, n.7, p. 1129-1135, 2011.

ANTONIOU, M.; ANDERSEN, H. Comparison of UVC/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2</sup>– with UVC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in terms of efficiency and cost for the removal of micropollutants from groundwater. **Chemosphere**, 2014.

ANTONOPOULOU, M.; EVGENIDOU, E.; LAMBROPOULOU, D.; KONSTANTINOU, I.A review on advanced oxidation processes for the removal of taste and odor compounds from aqueous media. **Water Research**, v. 53, p. 215-234, 2014.

ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, **Resolução n.899**, de 29 mai 2003.

ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma assistência à Habilitação. Brasília: SENAI/DN, 2005.

ANWAR, S.; LIAQUAT, F.; KHAN, Q.; KHALID, Z.; IQBAL, S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p. 400-405, 2009.

ARALDI, R. P.; MELO, T.; MENDES, T.; JÚNIOR, P.; NOZIMA, B; ITO,E.; CARVALHO, R.; SOUZA, E.; STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

AREZON, A.; NETO, T.; GERBER, W. **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais**. Porto Alegre: CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2011.

AUGUGLIARO, V.; PREVOT, A.; VÁZQUEZ, J.; GARCÍA-LOPEZ, E.; IRICO, A.; LODDO, V.; RODRÍGUEZ, S.; MARCI, G.; PALMISANO, L.; PRAMAURO, E. Photocatalytic oxidation of acetonitrile in aqueous suspension of titanium dioxide

irradiated by sunlight. **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 329-335, 2004.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIECKA, M. The Comet assay in insects - Status, prospects and benefits for Science. **Mutation research / Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 67-76, 2016.

AZEVEDO, F; CHASIN, A. **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia**. Cap. 3, p.100. 1, ed. São Paulo: RiMa, 2003. São Paulo: Intertox, 2003.

BADAWY, M. I.; GHALY, M. Y.; GAD-ALLAH, T. A. Advanced oxidation processes for the removal of organophosphorus pesticides from waste water. **Desalination**, v.194, p.166-175, 2005.

BAGUR-GONZÁLEZ, M; ESTEPA-MOLINA, C; MARTÍN-PEINADO,F; MORALES-RUANO, S. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **The Journal of Soils and Sediments**, v. 11, n. 2, p. 281-289, 2011.

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

BAR, A.; ANDREW, J. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Larvae. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, p. 1-21, 2013.

BARATA, C.; ALAÑON,P.; GUTIERREZ-ALONSO, S.; RIVA, M.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents. **Science of the total Environmental**, v. 405, p. 78-86, 2008.

BONY, S.; GILLET, C.; BOUCHEZ, A.; MARGOU, C.; DEVAUX, A. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 197-203, 2008.

BOSIRE, C.; DEYOU, T.; KABARU, J.; KIMATA, D.; YENESEW, A. Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, p. 531-535, 2014.

BOTTÉ, E.; JERRY, D.; KING, S.; SMITH-KEUNE, C.; NEGRI, A. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. **Marine Pollution Bulletin**, v.65, p.384-393, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 396,** 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n°2.914de 12 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2011.

BÜCKER, A; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

CÁCERES, T.; HE, W.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. **Water Research**, v.41, p.4497-4503, 2007.

CALDAS, S.; GONÇALVES, F.; PRIMEL, E.; PRESTES, O.; MARTINS, M.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia a líquido com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v.34, n.9, p.1604-1617, 2011.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine—based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology,** v. 49, p. 1431-1435, 2011.

CETESB. **Ficha de Informação do Produto Químico.** Disponível em: <a href="http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha\_completa1.asp?consulta=FORMALDE%CDDO">http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha\_completa1.asp?consulta=FORMALDE%CDDO</a>>. Acesso em 10 fev. 2016.

CHENG, Y.; EKKER, M.; CHAN, H. Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 112, p. 7-14, 2015.

CHISHTI, Z.; HUSSAIN, S.; ARSHAD, K.; KHALID, A.; ARSHAD, M. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. **Journal of Environmental Management**, v.114, p.372-280, 2013.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, 1960. Disponível em:

<a href="http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers\_19">http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers\_19</a> 60.pdf >. Acesso em: 10 out. 2015.

CHU, W. Modeling the quantum yields of herbicide 2,4-D decay in  $UV/H_2O_2$  process. **Chemosphere**, v.44, p.935-941, 2000.

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC. São Paulo: Editora Blucher, 1998.

CODEX ALIMENTARIUS.**Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis**.CAC/GL 40-1993, 2010. Disponível em: <>. Acesso em: 05 dez. 2015.

COLOVIC, M.; KRSTIC, D.; USCUMLIC, G.; VASIC, V. Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v.100, 2011. Cambridge University, 1960.

DE LA CRUZ, N.; ESQUIUS, L.; GRANDJEAN, D.; MAGNET, A.; TUNGLER, A.; ALENCASTRO, L.; PULGARÍN, C. Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. **Water Research**, v.47, p.5936-5845, 2013.

DEVI, L.; MURTHY, B.; KUMAR, S. Photocatalytic activity of V<sup>5+</sup>,Mo<sup>6+</sup> and Th<sup>4+</sup> doped polycrystalline TiO<sub>2</sub> for the degradation of chlorpyrifos under UV/solar light. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.308, p.174-181, 2009.

DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C.; MENDO, S.; SOARES, A. Biomarkers as a tool to asses effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C,** v. 152, p. 338-345, 2010.

DOOLETTE, C.; MCLAUGHLIN, M.; KIRBY, J.; NAVARRO, D. Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to lettuce (*Lactuca sativa*): Effect of agricultural amendments on plant uptake. **Journal if Hazardous Materials**, v. 300, p. 788-795, 2015.

ESTÉVEZ, E.; CABRERA, M.; MOLINA-DÍAZ, A.; ROBLES-MOLINA, J.; PALACIOS-DÍAZ, M. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). **Science of Total Environmental**, v.433, p.538-546, 2012.

EUROPEAN COMISSION. Review report for the active substance chlorpyrifos. **2005**. Disponível em: <a href="http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1130">http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1130</a>. Acesso em: 19 abr. 2014.

EUROPEAN COMISSION. **EU Pesticide Data Base**. 2009. Disponível em: <a href="http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>. Acesso em: 07 dez. 2015.

FAO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**.1996. Disponível em: <a href="http://www.fao.org/fi/website/MultiQueryAction.do">http://www.fao.org/fi/website/MultiQueryAction.do</a>. Acesso em 05 jan. 2016.

FDA: U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTTRATION. **Reviewer Guidance – Validation of Chromatographic Methods.**1994. Disponível em: <a href="http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM134409.pdf">http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM134409.pdf</a> Acesso em: 05 dez. 2015.

FEMIA, J.; MARIANI, M.; ZALAZAR, C.; TISCORNIA, I. Photodegradation of chlorpyrifos in water by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment: toxicity evaluation. **Water Science and Technology**, v.68, p.2279-2286, 2013.

FLASKOS, J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. **Toxicology Letters**, v.209, p.86-93, 2011.

FRANÇA, K. **Dossiê Técnico: Criação de peixes ornamentais.** Instituto de Tecnologia do Paraná, 2007. Disponível em:<a href="http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc3">http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc3</a>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FREAR, D.; BOYD, J. Use of *Daphnia magna* for the microbioassay of pesticides. I. Development of Standardized techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage-mortality curves for pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, n.5, p. 1228-1236, 1967.

- GARZÓN, A.; MEDINA, P.; AMOR, F.; VIÑUELA, E.; BUDIA, F. Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). **Chemosphere**, v. 132, p. 87-93, 2015.
- GOMATHY, N.; SUMANTRAN, V.; SHABNA, A.; SULOCHANA, K.; Tolerance of ARPE 19 cells to organophosphorus pesticide chlorpyrifos is limited to concentration and time of exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v. 117, p. 24-30, 2015.
- GÓMEZ, M. J.; HERRERA, S.; SOLÉ, D.; GARCÍA-CALVO, E.; FERNÁNDEZ-ALVA, A. Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin effects by urban, agricultural and industrial pollution. **Science of Total Environment**, v.420, p.134-145, 2012.
- GUIMARÃES, O.; FILHO, D.; SIQUEIRA, A.; FILHO, H.; SILVA, M. Optimization of the AZO dyes decoloration process through neural networks: Determination of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition critical point. **Chemical Engineering Journal**, v.141, p.35-41, 2008.
- GVOZDENAC, S.; INDIC, D.; VUKOVIC, S. Phytotoxicity of Chlorpyrifos to White Mustard (*Sinapis alba* L.) and Maize (*Zea mays* L.): Potential Indicators of Insecticide Presence in Water. **Pesticides and phytomedicine**, v. 28, v. 4, p. 265-271, 2013.
- HE, L.; LUO, X.; XIE, H.; WANG, C.; JIANG, X.; LU, K. Ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. **Analytica Achimica Ata**, v.665, p. 52-59, 2009.
- HERNÁNDEZ-MORALES, A.; ARVIZU-GÓMEZ, J.; CARRANZA-ÁVAREZ, C.; GÓMEZ-LUNA, B.; ALVARADO-SÁNCHEZ, B.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E.; MOLINA-TORRES, J. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anophelesalbimanus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, p. 227-231, 2015.
- HOSSAIN, M.; FAKHRUDDIN, A.; CHOWDHURY, A.; ALAM, M. Degradation of chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide in aqueous solution with gamma irradiation and natural sunlight. **Journal of Environmental Chemical Engeneering**, v.1, p.270-274, 2013.
- HUANG, C. P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Manage**, v. 13, p. 361-377, 1993.

IBAMA: INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins**. Histórico de Vendas – 2000 a 2012. Brasília, 2012. Disponível em: <a href="http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3">http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3</a>. Acesso em: 14 jun. 2016.

IBAMA: INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS.. **Boletim 2013**. Disponível em: <a href="http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3">http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3</a>. Acesso em 05 jan. 2016.

INMETRO: INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos— DOQ-CGCRE-008**. 2011. Disponível em:

<a href="http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\_04.pdf">http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\_04.pdf</a>. Acesso em: 10 dez. 2014.

IPCS-INCHEM: INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Organophosphorus Insecticides: A general introduction.** Environmental Health Criteria 63. Disponível em: <a href="http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm">http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc63.htm</a>. Acesso em: 08 jul. 2014.

ISMAIL, M.; KHAN, H.; SAYED, M.; COOPER, W. Advanced oxidation for the treatment of chlorpyrifos in aqueous solution. **Chemosphere**, v.93, p.645-651, 2013.

ISO: **ISO 15088:** Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio). Informative Section, 2007. Disponível em: <a href="https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15088:ed-1:v1:en">https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15088:ed-1:v1:en</a>. Acesso em: 05 dez. 2015.

JHA, A.; Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.

JIN, Y.; ZHENG, S.; PU, Y.; SHU, L.; SUN, L.; LIU, W.; FU, Z. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 82, p. 398-404, 2011. JOHN, E., SHAYKE, J. Chlorpyrifos: pollution and remediation. **Environmental Chemical Letter**, 2015.

JURADO, A.; VÀZQUEZ-SUNÉ, E.; CARRERA, J.; ALDA, M.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. **Science of the Total Environmental**, v. 440, p.82-94, 2012.

KARPUZCU, M.; SEDLAK, D.; STRIGFELLOW, W. Biotransformation of chlorpyrifos in riparian wetlands in agricultural watersheds: Implications for wetland management. **Journal of Hazardous Materials**, v.244-245, p.111-120, 2012.

KHALID, S.; HASHMI, I.; KHAN, S. Bacterial assisted degradation of chlorpyrifos: The key role ofenvironmental conditions, trace metals and organic solvents. **Journal of Environmental Management,** v. 168, p. 1-9, 2016.

KIKUCHI, M.; SASAKI, Y.; WAKABAYASHI, M. Screening of organophosphate insecticide pollution in water by using *Daphnia magna*. **Ecototoxicology and Environmental Safety**. v. 47, p. 239-245, 2000.

KIM, H.; PARK, Y.; SHIN, D.; OH, S.; CHUNG, K. Appropriate In Vitro Methods for Genotoxicity Testing of Silver Nanoparticles. **Environmental Health and Toxicology,** v. 28, p. 1-8, 2013.

KLAMERTH, N.; RIZZO, L.; MALATO, S.; MALDONADO, M.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Degradation of fifteen emerging contaminants at mg L<sup>-1</sup> initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluent. **Water Research**, v.44, p.545-554, 2010.

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

KOVÁCS, R.; CSENKI, Z.; BAKOS, K.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, Á.: GARAJ-VRHOVAC, V.; GAJSKI, G.; GERIC, M.; NEGREIRA, N.; ALDA, M.; BARCELÓ, D.; HESTH, E.; KOSJEK, T.; ZEGURA, B.; NOVAK, M.; ZAJC, I.; BAEBLER, S.; ROTTER, A.; RAMSAK, Z.; FILIPIC, M. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. **Water Research**, v. 77, p. 201-212, 2015.

KRALJ, M.; FRANKO, M.; TREBSE, P. Photodegradation of organophosphorus insecticides – Investigations of products and their toxicity using gas chromatographymass espectrometry and AChE-thermal lens spectrometric biossay. **Chemosphere**, v.67, p.99-107, 2006.

KRALJ, M.; FRANKO, M.; TREBSE, P. Aplications of bioanalytical techniques in evaluating advanced oxidation process in pesticide degradation. **Trends in Analytical Chemestry**, v. 26, n.11, p.1020-1031, 2007.

- KRISHNARAJ, C.; HARPER, S.; YUN, S.*In Vivo* toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 480-491, 2016.
- LAUCHENR, D.; OLIVEIRA, L.; MARTINEZ, C. Effects of the water soluble fraction of gasoline on ZFL cell line: Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, *Accepted Manuscript*, 2015.
- LAZAREVIC-PASTI, T.; BONDZIC, A.; PASTI, I.; VASIC, V. Indirect eletrochemical oxidation of organophosphorous pesticides for eficiente detection via acetylcholinesterase test. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 236-242, 2012.
- LEONG, K.; TAN, L.; MUSTAFA, A. Contamination levels of selected organochlorine and organophosphate pesticides in the Selangor River, Malaysia between 2002 and 2003. **Chemosphere**, v. 66, p. 1153-1159, 2007.
- LI, X.; HE, J.; LI, S..Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas sp.* strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene. **Research in Microbiology**, v. 58, p.143-49, 2007.
- LIMA, R. M. Estudo da degradação do pesticida organofosforado clorpirifós por processos fenton e foto-Fenton. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- LIU, B.; McCONNELL, L.; TORRENTS, A. Hydrolysis of chlorpyrifos in natural Waters of Cheasapeake Bay. **Chemosphere**, v.44, p.1315-1323, 2000.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1 ed. Rio de Janeiro: AS-PTA Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- LOURES, C. C. A.; ALCÂNTARA, M.; FILHO, H.; TEIXEIRA, A.; SILVA, S.; PAIVA, T.; SAMANAMUD, G. Advanced Oxidative Degradation Processes: Fundamentals and Applications. **International Review of Chemical Engineering**, v.5, n.2, p. 102-120, 2013.
- MAPA: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de Garantia da Qualidade analítica.** Brasília: MAPA/ACS, 2011.

MAPA: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <a href="http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\_cons/principal\_agrofit\_cons">http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\_cons/principal\_agrofit\_cons</a>. Acesso em: 16 ago. 2014.

MARTINS, L. R. R. Perfil cromatográfico e análise multivariada para controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra). Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Departamento de Química da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

MARTINS, A. S. Estudo e otimização da degradação dos herbicidas hexazinona e diuron utilizando processos oxidativos avançados (POA): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e foto-Fenton. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

MISRA, N.The contribution of non-thermal and advanced oxidation technologies towards dissipation of pesticides residues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 229-244, 2015.

MOMANI, F.; SANS, C.; ESPUGLAS, S. A comparative study of the advanced oxidation of 2,4-dichlorophenol. **Journal of Hazardous Materials**, v.B107, p.123-129, 2003.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.268, p.157-177, 2013.

MUHAMAD, S. Kinetic studies of catalytic photodegradation of chlorpyrifos insecticide in various natural Waters. **Arabian Journal of Chemistry**, v.3, p.127-133, 2010.

MULLER, M. HESS, L.; TARDIVO, A.; LAJMANOVICH, R.; ATTADEMO, A.; POLETTA, G.; SIMONIELLO, M.; YODICE, A.; LAVARELLO, S.; CHIALVO, D.; SCREMIN, O. Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. **NeuroToxicology**, v.45, p.22-30, 2014.

MURILLO, R.; SARASA, J.; LANAO, M,; OVELLEIRO, J.L. Degradation of chlorpyriphos in water by advanced oxidation processes. **Water Science & Technology: Water Supply**, v. 10.1, p.1-6, 2010.

OECD: THE ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals:** Proposal for Updating Guideline 208. Terrestrial Plant test: Seedling emergence and seddling growth test. 2006. Disponível em:

<a href="http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf">http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf</a>. Acesso em 04 jan. 2016.

OGA, S.; CAMARGO, M. A.; BATISTUZZO, OLIVEIRA, J. A. **Fundamentos de Toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLIVEIRA, A.; RIBEIRO, J.; OLIVEIRA, J.; KEUKELEIRE, D.; DUARTE, M.; NASCIMENTO, R. Degradation of the pesticide chlorpyrifos in aqueous solution with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Optimization and effect of interfering anions. **Journal of Advanced Oxidative Technology**, v. 17, n. 1, p. 133-138, 2014.

OLIVER, A.; SANZ-LANDALUZE, J.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; GUINEA, J.; CÁMARA, C. Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration. **Water Research**, v. 45, p. 6515-6524, 2011.

OLMEZ-HANCI, T.; ARSLAN-ALATON, I.; DURSUN, D. Investigation of the toxicity of common oxidants used in advanced oxidation processes and their quenching agents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 330-335, 2014.

OMS: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistence on Mosquito Larvae to Insecticides. 1981. Disponível em: <a href="http://apps.who.int/iris/handle/10665/69615">http://apps.who.int/iris/handle/10665/69615</a>. Acesso em 01 dez. 2015.

OMS: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guías para la calidad del agua potable.** Recomendaciones. Vol. 1, 2008. Disponível em: <a href="http://www.who.int/water\_sanitation\_health/dwq/gdwq3rev/es/">http://www.who.int/water\_sanitation\_health/dwq/gdwq3rev/es/</a>. Acesso em: 15 jul. 2014.

OMS: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chlorpyrifos: WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides**. 2009. Disponível em: < http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos\_WHO\_specs\_eval\_Mar\_2009.pdf >. Acesso em: 02 mai. 2014.

PAN: PESTICIDE ACTION NETWORK. **Pesticide Database.** Disponível em: <a href="http://www.pesticideinfo.org/">http://www.pesticideinfo.org/</a>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

- PINTO, M.; SALGADO, R.; COTTRELL, B.; COOPER, W.; BURROWS, H.; VALE, C.; SONTAG, G.; NORONHA, J. Influence of dissolved organic matter on the photodegradation and volatilization kinetics of chlorpyrifos in coastal waters. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 310, n. 1, p. 189-196, 2015.
- PORTO, K.; ROEL, A.; SILVA, M.; COELHO, R.; SCHELEDER, E.; JELLER, A. Ativiade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (*Linnaeus, 1762*((*Diptera, Culicidae*). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v.46, n. 6, p. 586-589, 2008.
- POSTIGO, C.; BARCELÓ, D. Synthetic organic compounds and their transformation products in groundwater: Occurrence, fate and mitigation. **Science of Total Environmental**, v. 503-504, n. 15, p. 32-47, 2015.
- QIN, G.; LIU, T.; GUO, Y.; ZHANG, X.; MA, E.; ZHANG, J. Effects of chlorpyrifos on glutathione S-transferase in migratory locust, *Locustamigratoria*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.109, p.1-5, 2014.
- RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B e A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri UFPR). 2007. 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética) Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; MELO, L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RIVADENEIRA, P.; AGRELO, M.; OTERO, S.; KRISTOFF, G. Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.90, p.82-88, 2013.
- RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation process in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, p. 4311-4340, 2011.
- ROBLES-MOLINA, J.; VIDALES, M.; GARCÍA-REYES, J.; CAÑIZARES, P.; SÁEZ, C.; RODRIGO, M.; MOLINA-DÍAZ, A. Conductive-diamond eletrochemical oxidation of chloryrifos in wastewater and identification of its main degradation products by LCTOFMS. **Chemosphere**, v.89, p.1169-1176, 2012.

ROCHA, H.; PAIVA, M.; SILVA, N.; ARAÚJO, A.; CAMACHO, D.; MOURA, A.; GÓMEZ, L.; AYRES, C.; SANTOS, M. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. **Acta Tropica**, v. 152, p. 66-73, 2015.

ROCCO, L.; SANTONASTASO, M.; MOTTOLA, F.; COSTAGLIOLA, D.; SUERO, T.; PACIFICO, S.; STINGO, V. Genotoxicity assessment of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 113, p. 223-230, 2015.

RODRÍGUEZ-FUENTES.; RUBIO-ESCALANTE, J.; NOREÑA-BARROSO, E.; ESCALANTE-HERRERA, K.; SCHLENK, D.Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 172-173, p. 19-25, 2015.

SACRISTÁN, D.; RECATALÁ, L.; ROSSEL, R. Toxicity and bioaccumulation of Cu in an accumulator crop *(Lactuca sativa* L.) in different Australian agricultural soils.**Scientia Horticultarae**, v. 193, p. 346-352, 2015.

SCHICK, R.; STRASSER, I.; STABEL, H. Fluorometric determination of low concentrations of  $H_2O_2$  in water: comparison with two other methods and application to environmental samples and drinking water treatment. **Water Research.** v. 31, n. 6, p. 1371-1378, 1997.

SIVAGAMI, K.; KRISHNA, R.; SWAMINATHAN, T. Photo catalytic degradation of pesticides in immobilized bead photo reactor under solar irradiation. **Solar Energy**, v.103, p.488-493, 2014.

SHAWAQFEH, A. T.; MOMANI, F. A. Photocatalytic treatment of water soluble pesticide by advanced oxidation technologies using UV light and solar energy. **Solar Energy**, v.89, p.1157–1165, 2010.

SILVA, N. Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha. 2013. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SNYDER, R.; KIRKLAND, J.; DOLAN, W. Introduction to modern liquid chromatography.3. ed. New York: Wiley, 2009.

- SOBRERO, M. S.; RONCO, A. Ensayo de Toxicidad aguda con semillas de lechuga. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad del Agua: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Ottawa, IDRC, p. 71-79. 2004.
- SPADOTTO, C.; GOMES, M.; LUCHINI, L.; ANDRÉA, M. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004.
- SPARLING, D,; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylii*. **Environmental Pollution**, v.147, p.535-539, 2006.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *In*: Henderson, D.S. (Ed.), **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols Eukaryotic Systems**, vol. 113, Human Press, Totowa, p. 203-211, 1999.
- TIWARI, M. K.; GUHA, S. Kinetics of biotransformation of chlorpyrifos in aqueous and soil slurry environments. **Water Research**, v.51, p.73-85, 2013.
- USEPA: U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Organophosphate Pesticide Degradation Under Drinking Water Treatment Conditions**. U.S Environmental Protection Agency. Office of Research and Development, Washington D.C., 2005.
- VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227-236, 2001.
- WU, C.; LINDEN, K. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides: Roles of hydroxyl and carbonate radicals. **Water Research**, v.44, p.3585-3594, 2010.
- YOUNG, B.; RIERA, N.; BEILY, M.; BRES, P.; CRESPO, D.; RONCO, A. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.
- YIN, X. ZHU, G.; LI, X.; LIU, S. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 680, p. 2-6, 2009.

YU, K., LI, G.; FENG, W.; LIU, L.; ZHANG, J.WU, W.; XU, L.; YAN, Y. Chlorpyrifos is estrogenic and alters embryonic hatching, cell proliferation and apoptosis in zebrafish. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, p. 26-33, 2015.

ZACARIAS, C. Exposição ocupacional a cianetos — Uma breve revisão. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco ambiental e Sociedade,** v. 2, n. 3, p. 42-50, 2009.

ZALIZNIAK, L; NUGEGODA, D. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos in three successive generations of *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 207-214, 2005.

ZHANG, Y.; HOU, Y., CHEN, F.; XIAO, Z.; ZHANG, J.; HU, X. The degradation of chlorpyrifos and diazinon in aqueous solution by ultrasonic irradiation: Effect of parameters and degradation pathway. **Chemosphere**, v.82, p.1109-1115, 2011.

ZHAO, H.; XU, S.; ZHONG, J.; BAO, X. Kinetic study on the photo-catalytic degradation of pyridine in TiO<sub>2</sub> suspension systems. **Catalysis Today**, v. 93-95, p. 857-861, 2004.

### APÊNDICE A - Composição da água de diluição para Daphnia magna

### Soluções para o preparo da água de diluição

Reagente	Quantidade
Solução 1 do meio de cultivo	3,2 mL para 1000 mL de solução
Solução 2 do meio de cultivo	0,8 mL para 1000 mL de solução
Solução 3 do meio de cultivo	0,8 mL para 1000 mL de solução
Solução 4 do meio de cultivo	0,8 mL para 1000 mL de solução

### Preparo da água de diluição

Para o preparo de 1000 mL de água de diluição utilizar os volumes das soluções 1 a 4 descritos acima e completar com água destilada. A solução deve ser aerada por pelo menos 12 horas antes da utilização. O pH da água deve estar entre 7,6 e 8,0.

### Soluções para o preparo do meio de cultivo\*

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73500	Dissolver e diluir a
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123300	1000 mL com água
3	KCI	5800	processada
4	NaHCO₃	64800	processada

<sup>\*</sup> Apenas as soluções 1 a 4, descritas pela ABNT NBR 12713:2009

## APÊNDICE B - Carta controle Daphnia magna

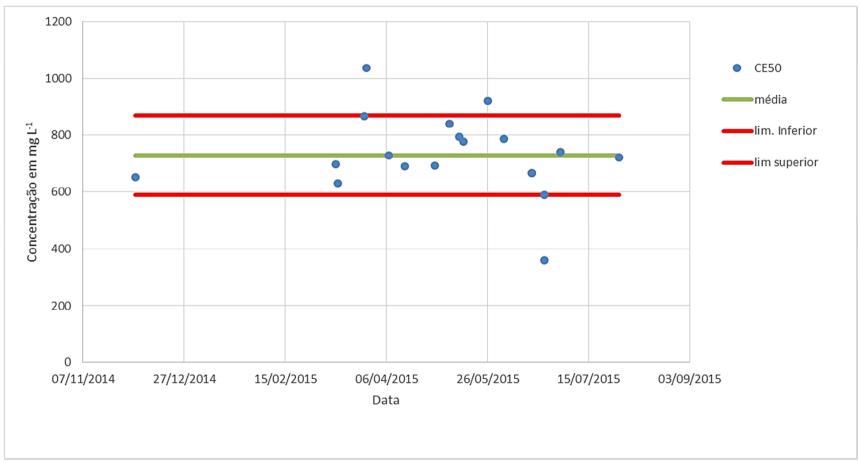


Figura 27- Carta-controle apresentando o gráfico com resultados de  $CE_{50}$  para a *D. magna* ao cloreto de potássio.

## APÊNDICE C – Composição da água de diluição para Danio rerio

Preparo das soluções para água de diluição

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	Sulfato de cálcio di- hidratado (CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	1500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
2	Cloreto de potássio (KCI)	200	
	Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	4800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água
	Sulfato de magnésio hepta- hidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	5100	processada

<sup>\*</sup> Conforme descrito pela NBR 15088 (ABNT, 2011)

## Preparo da água de diluição

Adicionar 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água processada (destilada).

## APÊNDICE D - Protocolo para preparação de agarose

Agarose Normal (1,5%)		
Quantidades para 100 mL de solução estoque		
Quantidades Produto		
1,5 g	Agarose normal	
100 mL	PBS	
E	tapas da preparação:	
1)Dissolver a agarose em PBS agita	ndo por um tempo de aproximadamente 2 horas.	
2) Colocar para aquecer. Pode ser e	m micro-ondas.	
3) Quando levantar fervura desligar.	Agitar a solução em agitador magnético.	
4) Deixar solidificar em temperatura	ambiente.	
5) Picar em pedaços e voltar à ferve	r. Agitar a solução.	
6) Deixar solidificar em temperatura	ambiente.	
7) Repetir a etapa 5.		
8)Levar para banho maria à 80°C. C	banho deve ficar no nível da agarose.	
9) Mergulhar as lâminas limpas na agarose, devendo alcançar a parte esmerilhada.		
10) Procurar formar uma camada bem fina de agarose.		
11) Retirar a lâmina da agarose e lin	npar com papel o lado oposto ao esmerilhado.	
12) Secar a lâmina de um dia para o outro, em temperatura ambiente, na posição vertical.		
As lâminas podem ser estocadas por várias semanas.		
Agarose de ba	nixo ponto de fusão (LMP) (0,5%)	
Quantidades para 20 mL de solução		
Quantidades	Produto	
0,1 g	Agarose LMP	
20 mL	PBS	
Etapas da preparação:		
1)Dissolver a agarose em PBS agitando bem.		
2) Colocar para aquecer. Pode ser em micro-ondas.		
3) Quando levantar fervura, desligar. Agitar a solução.		
4) Deixar em banho maria à 37°C.		

### APÊNDICE E - Protocolo para preparação da solução de lise

Solução de lise – Estoque  Quantidades para 1000 mL de solução estoque		
890 mL	Agua destilada/milique/deionizada	
146,2 g	NaCl 2,5 M	
37,2 g	Edta 100 mM	
1,2 g	Tris 10 mM	
8 g	NaOH sólido	
10 g	Lauril Sarcosinato de sódio	
Etapas da proparação:		

### Etapas da preparação:

- 1) Misturar os 5 primeiros reagentes até dissolver bem.
- 2) Acertar o pH com NaOH até atingir pH 10.
- 3) Adicionar laurel saracosinato de sódio à solução, misturando bem lentamente a fim de formar grumos.

Obs: Todo o procedimento é realizado sem aquecimento. A solução pode ser estocada a temperatura ambiente, no escuro. Nestas condições, a solução pode ser mantida até seu uso total.

Solução de lise – Uso		
Quantidades para 100 mL de solução		
1 mL	Triton X – 100	
10 mL	DMSO	
89 mL	Solução estoque	
Etapas de preparação:		

- 1) Misturar os reagentes em uma proveta.
- 2) Embalar o frasco em papel alumínio,, pois a solução deve ser preparadas no escuro e na hora do uso.
- 3) Deixar a solução na cubeta de lâminas, no escuro, por 60 minutos em temperatura de 4°C, antes de colocar as lâminas.
- 4) Colocar as lâminas na cubeta e deixar de 1 a 24 horas.

## APÊNDICE F - Protocolo para preparação da solução de eletroforese

Solução de NaOH (300 mM)				
Quantidades	Produto			
21,6 g	NaOH			
54 mL	Água deionizada			
Solução estoque de EDTA (200 mM)				
14,89	EDTA			
200 mL	Água deionizada			
OBS: Corrigir o pH para 10 com NaOl	1			
	Solução de uso			
1800 mL	Água deionizada gelada (4°C)			
9 mL	Solução de EDTA			
54 mL	Solução de NaOH			
OBS: Corrigir o pH para >13 com NaOH				
Eta	pas de preparação:			
1)Preparar a solução de uso a cada vez que for realizar a eletroforese.				
2) Misturar bem os reagente e conservar a solução em geladeira.				

## APÊNDICE G - Protocolo para preparação da solução de neutralização

Tampão de neutralização		
Quantidades	Produto	
24,25 g	TRIS	
475 mL	Água deionizada	
OBS: Corrigir o pH para 7,5 com HCI		

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



# Ministério da Educação UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ Câmpus Dois Vizinhos Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



### PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGROTÓXICOS E SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	
Área Temática:	Toxicologia	
Pesquisador / Professor:	Adriane Martins de Freitas	
Instituição:	Curitiba/Ecoville	
Financiamento:	Capes e CNPq	
Versão:	02	

### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA

Protocolo nº 2015-23

### Apresentação do Projeto:

Agrotóxicos organofosforados, especialmente clorpirifós, são tóxicos devido a inibição da enzima AChE em animais. Estes compostos atacam o sistema nervoso e estão associados ao estresse oxidativo, à geração de radicais livres e a oxidação de lipídeos. Estes compostos não são eficientemente removidos ou degradados por sistemas de tratamento convencionais, dessa forma tratamentos avançados necessitam ser aplicados. A partir deste problema, este trabalho avaliará o potencial de degradação dos agrotóxicos clorpirifós (CP) e deltametrina (DM) por meio de processo avançado de oxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seguido de avaliação da toxicidade pré e pós tratamento. O objetivo do presente trabalho é avaliar a eficiência do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na degradação e remoção da ecotoxicidade de CP e DM em concentrações ambientais. Para tanto serão realizados bioensaios com três diferentes organismos: *Lactuta sativa* (semente de alface), *Daphnia magna* e *Astyanax sp.* (lambari). Os animais serão expostos por 96 horas aos dois agrotóxicos (tratado e não), e deles serão coletados fígado, sangue e cérebro para os ensaios de toxicidade.

### Objetivo:

### **Objetivo Geral**

Avaliar a ecotoxicidade de agrotóxicos (antes e após tratamento por processos avançados de oxidação) em peixes (*Astyanax* sp.), através de biomarcadores bioquímicos.

### **Objetivos Específicos**

- Implementar protocolos para análise de biomarcadores bioquímicos (proteínas totais, acetilcolinesterase, glutationa reduzida e glutationa-S transferase) em amostras de tecidos de Astyanax sp. (lambari);
- Avaliar a sensibilidade de Astyanax sp. (lambari) aos agrotóxicos clorpirifós e deltametrina mediante exposição aguda;
- Avaliar a toxicidade aguda de clorpirifós e deltametrina antes do tratamento por processo avançado de oxidação, utilizando biomarcadores bioquímicos;
- Avaliar a toxicidade aguda de clorpirifós e deltametrina após tratamento por processo avançado de oxidação, utilizando biomarcadores bioquímicos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** a espécie utilizada neste projeto (*Astyanax* sp.) será adquirida em criadouros comerciais, somente na quantidade suficiente para a realização dos experimentos. Além disto, não se trata de uma espécie ameaçada de extinção. Para minimizar o sofrimento dos animais, os mesmos serão anestesiados com benzocaína antes de qualquer procedimento e/ou da eutanásia. Ao final dos ensaios preliminares e definitivos, as soluções com os

12.300



## Ministério da Educação UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ Câmpus Dois Vizinhos



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

agrotóxicos utilizadas nos experimentos serão tratadas pelo mesmo processo de tratamento e monitorados até a mineralização total do composto (monitoramento por carbono orgânico total – COT).

**Benefícios:** o uso de uma espécie nativa de peixe, com ampla distribuição em rios e lagos brasileiros, pode revelar os efeitos deletérios da presença de agrotóxicos e de seus subprodutos em ambientes aquáticos, mesmo que em baixíssimas concentrações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa apresente alta relevância científica.

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos e documentos: 1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto; 2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR; 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG); 5) declaração de não início do projeto (com assinatura e data) foi corretamente apresentada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

**APROVADO** 

Considerações Finais a Critério da CEUA:

Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGROTÓXICOS E SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO", protocolo nº 2015/23, sob a responsabilidade de Adriane Martins de Freitas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 10/12/2015.

Vigência do projeto:	10/12/2015 - 31/12/2016
Espécie/linhagem:	Astyanax sp.
Número de animais:	180
Peso/Idade:	5-10g/ juvenis
Sexo:	Ambos
Origem:	Aquisição comercial

Dois Vizinhos, 10 de dezembro de 2015.

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná