



Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional

10a. Aula – Ecotoxicologia Aquática Teste de Ecotoxicidade para peixes e Daphnia

Prof. Responsável: Joaquim Gonçalves Machado Neto - Out/2018

10a. Aula – Ecotoxicologia aquática e Ensaio de ecotoxicidade de agrotóxicos para peixes e Daphnia

1 – Introdução

2 - Ecotoxicologia Aquática.

3 – Ensaio de avaliação da toxicidade aguda de agrotóxicos para Daphnia.

4 - Ensaio de avaliação da toxicidade aguda e crônica e de bioconcentração de agrotóxicos com peixes.

PRÁTICA: *1 - Avaliação do ensaio de toxicidade aguda de parathion metílico para minhocas.*

2 - Instalação de ensaio de toxicidade aguda de agrotóxicos para os microrganismos do solo.

Objetivo dos estudos ecotoxicológicos

- Pesquisa;
- Monitoramento Ambiental;
- Registro/periculosidade de produtos químicos;
- Avaliação de impacto ambiental de efluentes;
- Controle da qualidade das águas continentais e marinhas, sedimentos e solos;
- Estabelecimento de critérios de qualidade de águas e efluentes líquidos , resíduos em solo.



FONTES DE POLUIÇÃO



MODIFICAÇÕES AMBIENTAIS



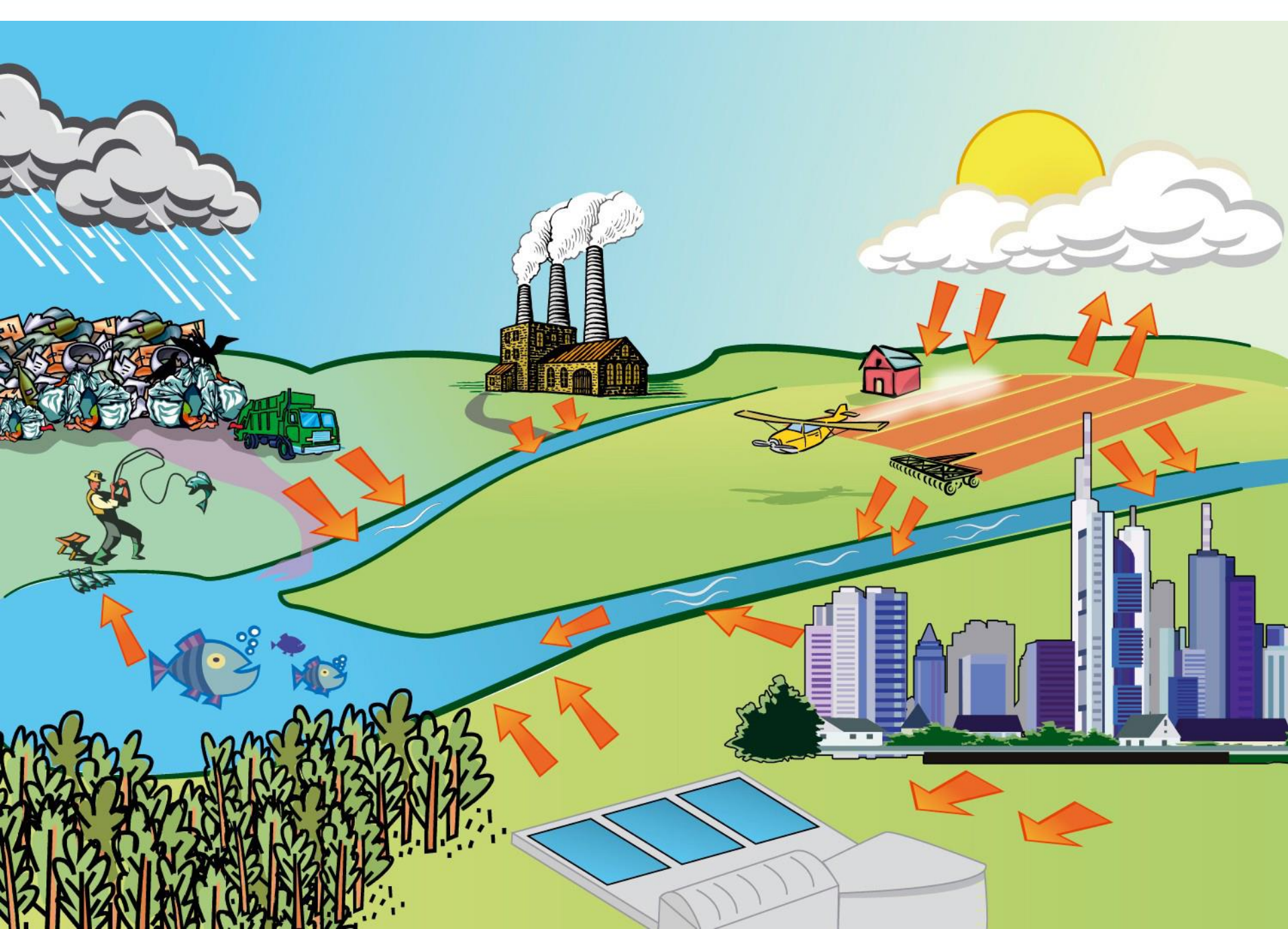
Reduz a diversidade espécies autóctones

**Aumenta as espécies indesejáveis (algas) -
nutrientes**



Reduz a qualidade da água

Aumenta a mortalidade peixes



CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: FONTES PONTUAIS / MULTIPLAS

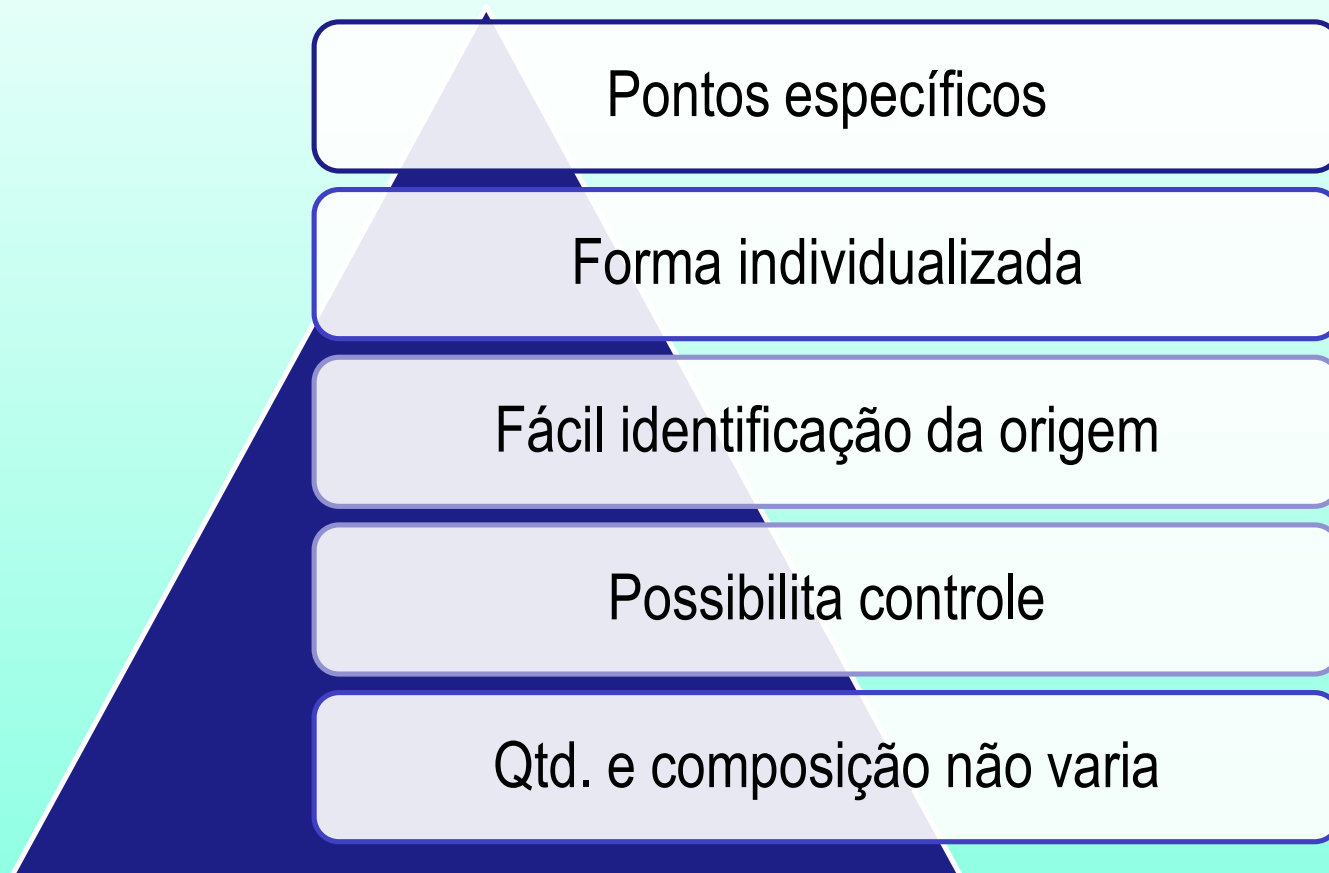
FONTES PONTUAIS: Substancias tóxicas descarregadas em **focos pontuais** (efluentes industriais, esgotos municipais, ou detritos sólidos em terrenos sanitários).

Têm a identificação da origem, o que fica facilitada e posterior controle da difusão no ambiente.

FONTES MULTIPLAS / DIFUSAS: As substancias tóxicas migrem para lagos ou reservatórios por intermédio de **múltiplas rotas** (águas superficiais, águas subterrâneas, uito chuvas e poluição atmosférica).

O controle torna-se mdifícil, e há a necessidade de medidas abrangentes.

FONTES PONTUAIS



Ex: Efluentes industriais, estações de tratamento de esgoto, detritos sólidos em terrenos sanitários.

TERMINOLOGIAS BÁSICAS DA TOXICOLOGIA AQUÁTICA

TOXICIDADE AGUDA. É definida como a **intoxicação causada por uma exposição aguda, única ou múltipla, dentro de um curto período de tempo.** Efeitos tóxicos observados em até 96 horas é considerado agudo.

CONCENTRAÇÃO LETAL (CL). É a concentração de um tóxico em que **determinado porcentual de organismos expostos morrem,** ou seja, CL_{10} ou CL_{50} , expressa em mg/L, ou ppm.

Considera-se a duração da exposição até o ponto terminal, como 24, 48, 72 ou 96 horas. Por exemplo, $CL_{50 - 96h}$

TERMINOLOGIA BÁSICA DA TOXICOLOGIA AQUÁTICA

CONCENTRAÇÃO LETAL – CL (Toxicidade aguda) (mg/L)

DOSE LETAL - DL (Toxicidade aguda em animais) (mg/kg)

VERTEBRADOS AQUÁTICOS – CL – Concentração Letal que causa a MORTALIDADE dos organismos.

INVERTEBRADOS AQUÁTICOS – CE – Concentração Efetiva que causa a IMOBILIDADE do organismos

Classificação quanto a toxicidade aguda para peixes e invertebrados (Zucker, 1985)

CATEGORIA	CL₅₀ ou CE₅₀ (mg.L⁻¹)
Extremamente tóxico	< 0,1
Altamente tóxico	< 1,0
Moderadamente tóxico	1,0 < 10,0
Ligeiramente tóxico	10,0 < 100,0
Praticamente não-tóxico	> 100,0

TOXICIDADE CRÔNICA (Efeito subletal)

É definida como a **intoxicação** causada por **exposição crônica**, continuada ao longo de um **período** de tempo relativamente **longo**, normalmente superior a um décimo do período de vida.

Crônico é um termo relativo que **depende do tempo de vida do organismo** considerado.

TOXICIDADE CRÔNICA

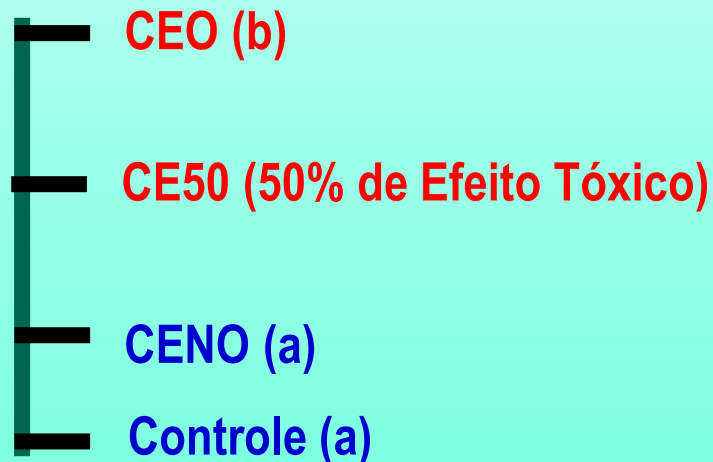
CE (Concentração Efetiva) é a concentração tóxica que pode **causar efeitos** adversos sob determinado **percentual** de organismos-teste (Ex: CE_{10} ou CE_{50}).



RESULTADOS DA TOXICIDADE CRÔNICA:

- CEO (LOEC): É a menor CONCENTRAÇÃO DE EFEITO OBSERVADO.
- CE50 (EC50): É a CONCENTRAÇÃO EFETIVA que causa 50% de efeito.
- CENO (NOEC): É a maior CONCENTRAÇÃO DE EFEITO NÃO OBSERVADO – comportamento similar ao controle.

*Escala
comparativa
entre as
concentrações
e o controle*



As respostas comumente utilizadas em testes de cronicidade são alterações na fecundidade, relações entre idade/tamanho ou a presença de tumores (carcinogenicidade).

Essas respostas normalmente são analisadas em relação às condições de “nenhum efeito observado” (NOEL) do tóxico considerado, ou em relação às Concentrações Máximas Aceitáveis do Tóxico (MATC), associadas a uma resposta aceitável.

Ensaio crônico identifica as respostas dos organismos às substâncias tóxicas

A NOEC. **C**oncentração de **E**feito **N**ão **O**bservado.

É a maior concentração tóxica à qual os organismos-teste podem ser expostos sem se verificar efeitos adversos.

Os efeitos podem incluir: SUBLETALIDADE ou LETALIDADE.

SUBLETALIDADE: concentração de estímulo abaixo do nível que causa a morte (menor reprodução, fertilização, crescimento ou anormalidades).

OS EFEITOS TAMBÉM INCLUEM:

- Sobrevivência do ciclo de vida
- Ciclo de vida parcial
- Primeiros estágios da vida com organismos aquáticos.

CONSIDERAÇÕES SOBRE TOXICIDADE

Os testes agudos são importantes, pois são estudos realizados para determinar a “magnitude do risco” de determinada substância tóxica

A menor dose ou concentração necessária para produzir uma resposta aguda é um indicador de maior risco que a substância oferece ao meio ambiente.

Um efeito crônico é produzido por concentração baixa e sob um longo tempo de exposição.

BIOCONCENTRAÇÃO: É o processo pelo qual uma substância é absorvida pelo organismo-teste apenas da água, por via branquial, dérmica e/ou por ingestão oral e fica mais concentrada no corpo do animal que na água .

FATO DE BIOCONCENTRAÇÃO (BCF)

Pode ser definido como a relação entre a concentração de uma substância nos tecidos do animal exposto e a concentração na água, na **ausência** da **cadeia alimentar**.

Fator de bioconcentração de inseticidas organoclorados em invertebrados aquáticos.

ORGANISMOS	FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO
Cladocera (crustáceos)	25.400 – 114.100
Amphipoda (crustáceos)	4.600 – 20.600
Decapoda (crustáceos)	<u>880 – 2.900</u>
Ephemeroptera	9.400 – 32.600
Odonata	910 – 3.500
<u>Diptera</u>	7.800 – <u>133.600</u>

EFEITOS DAS MISTURAS DE COMPOSTOS TÓXICOS (INTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS)

EFEITO DE ADIÇÃO - efeito da mistura de dois agentes contaminantes é exatamente a soma dos efeitos de cada um.

EFEITO DE POTENCIALIZAÇÃO - um dos contaminantes só tem efeito tóxico quando combinado com outro.

EFEITO ANTAGÔNICO - quando misturados, diminui a ação tóxica.

EFEITO SINÉRGICO – efeito combinado de dois contaminantes é muito maior do que a soma dos efeitos de cada um deles aplicados sozinhos.

EFEITOS DAS MISTURAS DE COMPOSTOS TÓXICOS (INTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS)

Tipo de interação	Efeito tóxico do agente A	Efeito tóxico do agente B	Efeito combinado de A + B
Adição	20%	30%	50%
Sinergismo	5%	10%	100%
Potencialização	0%	20%	50%
Antagonismo	20%	30%	5%

INTERAÇÕES PODEM SER VARIÁVEIS, DEPENDE DA MAGNITUDE DA EXPOSIÇÃO.

PERIGO

Avaliado em experimentos com animais de laboratório normas oficiais (nacionais ABNT, IBAMA, CETESB) e (internacionais EPA, OECD, WHO, ASTM, etc)

Dados toxicológicos dos produtos (DL50, CL50, CE 50 etc).



Portaria Normativa N. 84 (15/10/96) – IBAMA.

Art. 2. A classificação quanto ao **Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA)** baseia-se nos parâmetros biocumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, **carcinogênico, obedecendo a seguinte graduação:**

Classe I – Produto altamente Perigoso

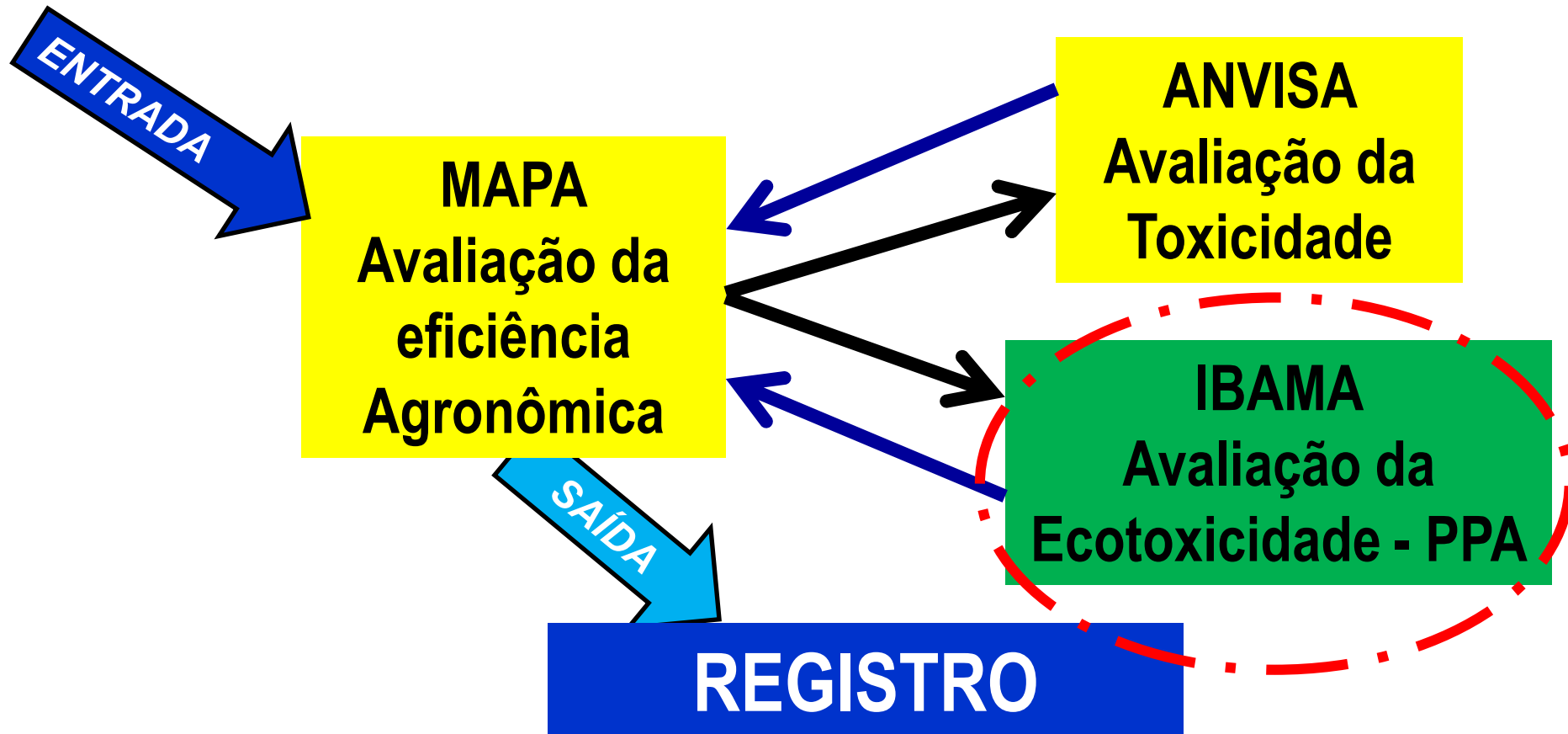
Classe II – Produto Muito Perigoso

Classe III – Produto Perigoso

Classe IV – Produto Pouco Perigoso

REGISTRO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL – MODELO TRIPARTITE

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS **AGRONÔMICAS TOXICOLÓGICAS**
E ECOTOXICOLÓGICAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS E SEUS EFEITOS



SISTEMA DO IBAMA PARA A CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS PELO PPA

PORTARIA NORMATIVA Nº 84, DE 15/10/96

PPA - IBAMA

(D.O.U. de 23/10/96)

Tabela IBAMA

O PRESIDENTE DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, no uso de suas atribuições legais que lhe confere o artigo 24 do anexo I do Decreto nº 78, de 5 de abril de 1991, bem como o Regimento Interno do IBAMA, aprovado pela Portaria Ministerial nº 445, de 16 de agosto de 1989, do Ministério do Interior, e tendo em vista o disposto na Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981 e Lei nº 7.802, de 11 de janeiro de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990, modificado pelo

DA AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL

Art. 6º - A avaliação do risco ambiental, será realizada quando a classificação de periculosidade ambiental considerando os usos propostos caracterizar a necessidade de informação de campo, ou quando, a critério do IBAMA, for verificada a sua necessidade.

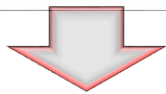
§ 1º - A avaliação do risco ambiental exigido das formulações já registrados ou a registrar, podendo implicar na alteração, suspensão ou cancelamento dos registrados, quando a avaliação indicar a maximização ou minimização dos riscos ambientais previstos na classificação de potencial de periculosidade ambiental.

§ 2º - O registro será mantido conforme as especificações estabelecidas para as mesmas sempre que as hipóteses do parágrafo anterior não se verificarem.

ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

Ecotoxicologia Ambiental

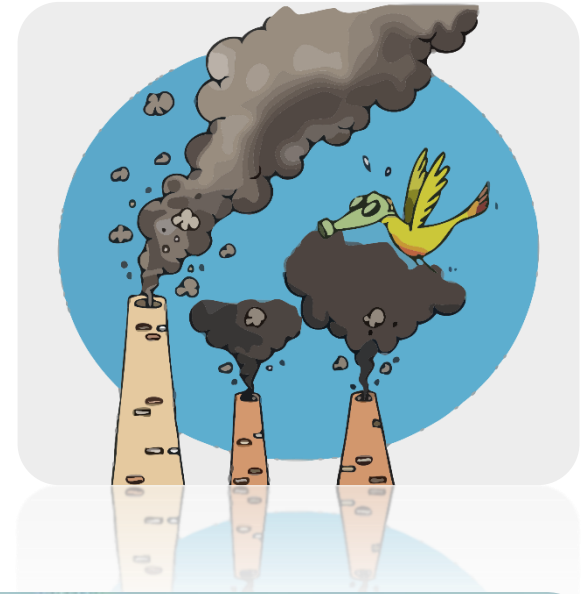
Estuda os efeitos adversos de produtos químicos



Ecosistema

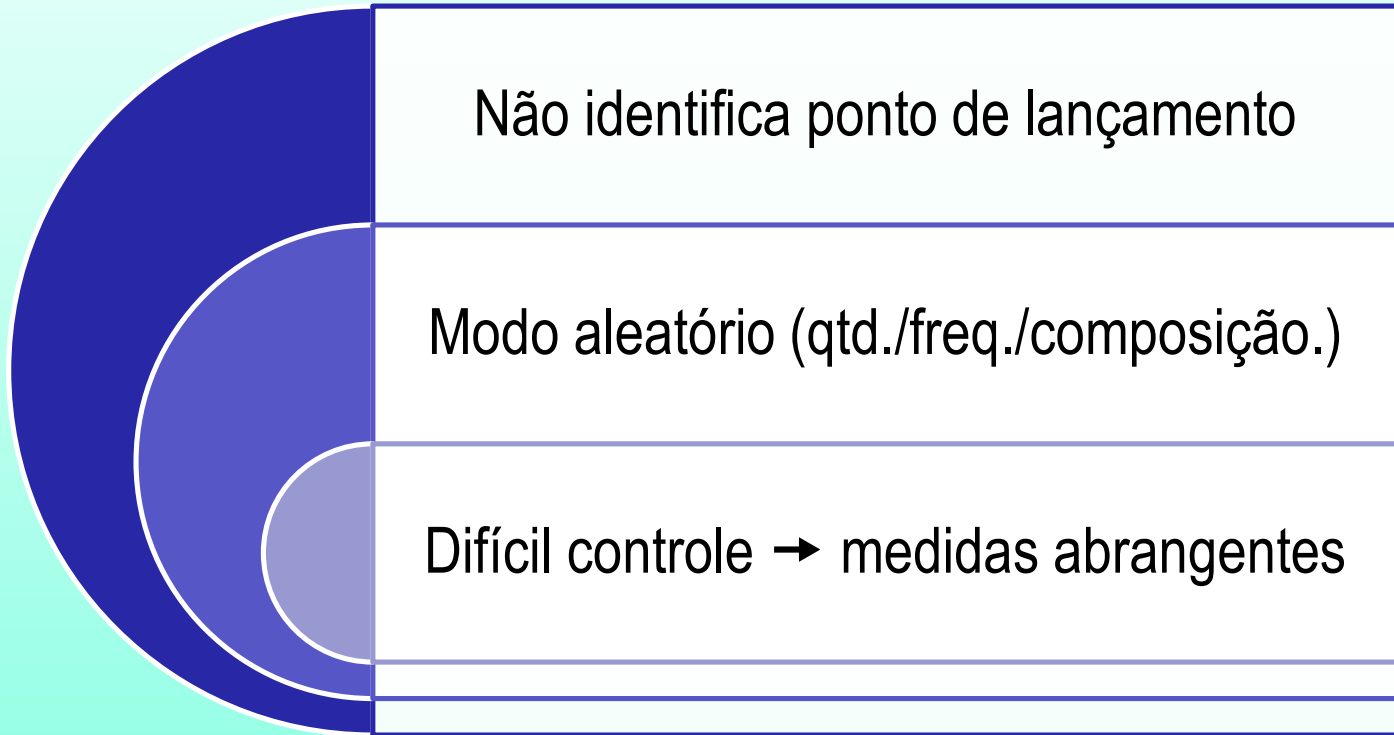


Determinar os riscos que representam para todos os organismos do ambiente e saúde humana



MÚLTIPLAS ROTAS OU FONTES DIFUSAS

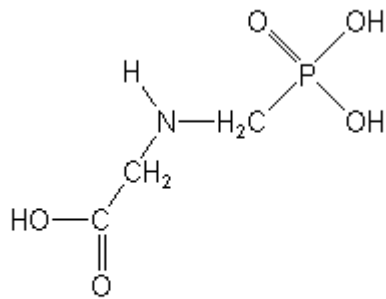
(NÃO PONTUAIS)



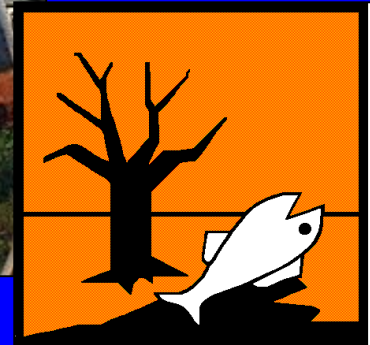
Ex: Águas superficiais, águas subterrâneas, chuvas (sobre campos agrícolas e acidentes com produtos químicos ou combustíveis) e poluição atmosférica.

AVALIAÇÃO DE RISCO

- ⇒ *Identificação do perigo (Ex: concentração, toxicidade)*
- ⇒ *Avaliação da exposição (Ex: oral, dérmica, respiratória)*
- ⇒ *Integração perigo e exposição (relação dose/resposta)*
- ⇒ *Caracterização do risco (tomada de decisão)*



GLYPHOSATE



ENVIRONMENTAL
HAZARD

AVALIAÇÃO DE RISCO

Formulação do problema e Identificação do perigo

PROCESSO DE
AVALIAÇÃO DE
RISCO

ADAPTADO DA
EPA (1992)

ANÁLISES

CARACTERIZAÇÃO

EFEITOS

EXPOSIÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

CRITÉRIO DE ACEITABILIDADE DO RISCO

ACEITÁVEL

NÃO ACEITÁVEL

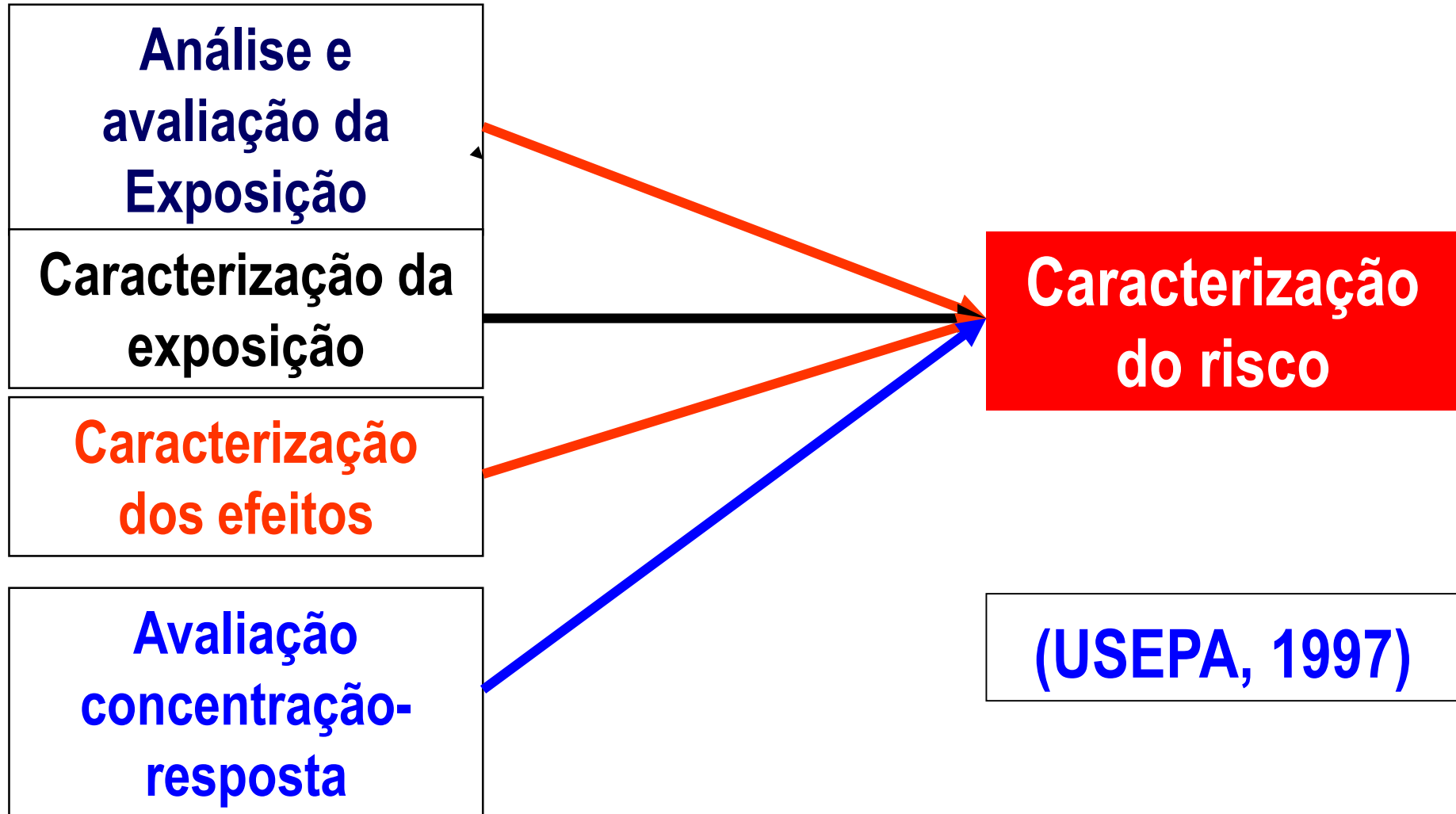
MEDIDAS MITIGADORAS

CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DE ESPÉCIES COMO BIOINDICADORA

- 1. Ser sensíveis ao contaminante ou aos fatores ambientais.**
 - 2. Vasta distribuição geográfica, abundância e disponibilidade.**
 - 3. Importância recreacional, econômica ou ecológica.**
 - 4. Disponibilidade de métodos para sua cultura e reprodução.**
 - 5. Boas condições físicas, livres de parasitas e doenças.**
-
- 6. Capacidade de acumular várias substâncias tóxicas.**
 - 7. Ser comum e facilmente coletada.**
 - 8. Ter tamanho adequado para amostras de tecidos.**
 - 9. Estar presente na área de impacto e em áreas não poluídas.**
 - 10. Ter correlação com níveis ambientais de substâncias tóxicas.**

Caracterização do Risco

Formulação do Problema com a Identificação do Perigo



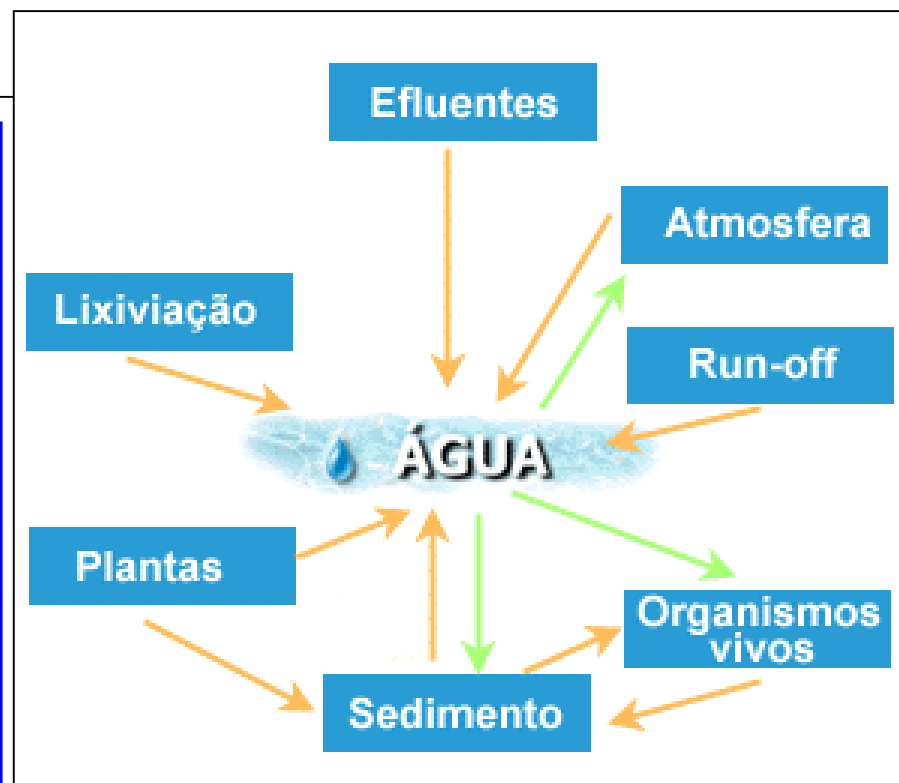
O CONTROLE DAS SUBSTÂNCIAS TÓXICAS DEMANDA OS SEGUINTE CONHECIMENTOS

- 1. identificação e controle das fontes dos compostos tóxicos prioritários.**
- 2. determinação do destino para elaborar os balanços dos compostos tóxicos prioritários.**
- 3. abordagem de bacias para lagos e rios a fim de controlar os compostos tóxicos.**

Avaliação da exposição

(Caracterização da Exposição)

Na avaliação da exposição usa-se informação sobre níveis ambientais, destino e transporte, análises ecológicas, **EXPOSIÇÕES NO PONTO DE CONTATO**, dados de modelagem farmacocinética e características demográficas (USEPA 1989).



LUCHINI, 2003

Caracterização do risco

Etapa final do processo é a aplicação formal de análises matemáticas aos dados para estimar os riscos individual e populacional, ou se há um nível limiar de dose que esta sendo excedido.

- **Reversibilidade dos efeitos.**
- **Evidências científicas e o seu peso para suportar as conclusões.**
- **Incerteza sobre a magnitude e natureza do risco.**
- **Alcance das informações sobre a natureza e a probabilidade de risco.**
- **Confiança do analista sobre as predições feitas.**

Gerenciamento do risco

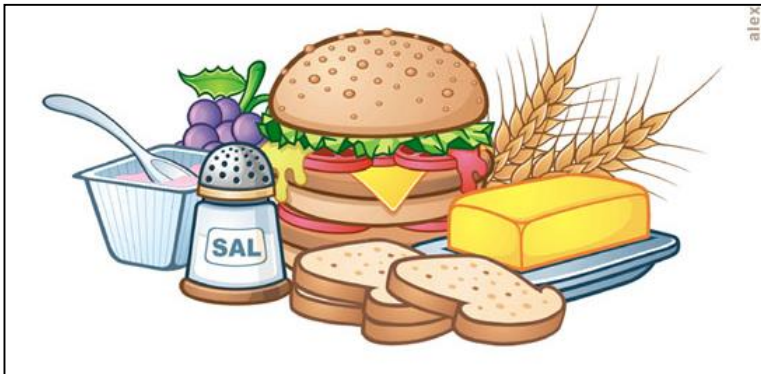
Gerenciamento do risco é uma decisão técnica e política.

Depende dos interesses relacionados com a produção, comercialização, consumo ou emprego da substância.

$RISCO = (F) \text{ Toxicidade} \times \text{Exposição} \times \text{Probabilidade}$

BASEADO EM CRITÉRIO DE ACEITABILIDADE DO RISCO






Risco pode ser diminuído através da adoção de medidas de segurança que limitam a exposição e/ou a toxicidade.



Gerenciamento do risco

CRITÉRIO DE ACEITABILIDADE DO RISCO

Tabela 2.7 Diretrizes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) para determinar o risco das substâncias tóxicas para os organismos aquáticos (Urban & Cook, 1986).

Pressuposição regulamentadora	Toxicidade aguda	Toxicidade crônica
 Sem riscos	$EEC < 1/10 LC_{50}$	$EEC < \text{nível sem efeito crônico (NOEL)}$
 Riscos que podem ser mitigados mediante restrição de uso	$1/10 LC_{50} \leq EEC < 1/2 LC_{50}$ $EEC \geq 1/10 LC_{50}$	Não aplicável
 Risco inaceitável		
 <u>Espécies não ameaçadas</u>	$EEC \geq 1/2 LC_{50}$	$EEC \geq \text{níveis com efeitos crônicos, inclusive efeitos reprodutivos}$
 <u>Espécies em risco</u>	$EEC > 1/20 LC_{50}$ ou $EEC > 1/10 LC_{50}$	$EEC \geq \text{níveis com efeitos crônicos, inclusive efeitos reprodutivos; além de qualquer modificação nos habitats}$

EEC: Estimated Environmental Concentration / CAE = Concentração Ambiental Estimada.

Risco Ambiental - $Q = CAE/CL50$ ou $CE50$ (Urban e Cook, 1986)

- . Nenhum efeito adverso - $Q \leq 0,1$**
- . Moderado risco de efeito adverso - $0,1 \leq Q \leq 10$**
- . Alto risco de efeito adverso - $Q > 10$**

Risco de intoxicação aguda ambiental (Goktepe, 2004)

Quociente de Risco (RQ) = $CAE/CL50$ ou $CE50$

- $RQ > 0,5 \implies$ Alto risco**
- $0,05 < RQ < 0,5 \implies$ Moderado risco**
- $RQ < 0,05 \implies$ Baixo risco**

Classificação do inseticida diflubenzuron pela toxicidade aguda aos organismos aquáticos pelo risco ambiental (SOUZA, 2008)

Espécies	Toxicidade Aguda	Q		Risco ambiental
		Sem sed.	Com sed.	
<i>D. magna</i>	Extremamente tóxico	3.571,44	-	Alto risco de efeito
<i>P. reticulata</i>	Não-tóxico	0,0132	0,0072	Nenhum efeito
<i>L. minor</i>	Não-tóxico	0,0044	0,0029	Nenhum efeito

Risco Ambiental - $Q = CAE/CE50$ ou $CL50$ (Urban e Cook, 1986)

- Nenhum efeito adverso se $Q \leq 0,1$
- Moderado risco de efeito adverso se $0,1 \leq Q \leq 10$
- **Alto risco de efeito adverso se $Q > 10$**



Sistema de Classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental - PPA

Transporte	Persistência	Bioconcentração	Diversos organismos	
Solubilidade	Hidrólise	Log Kow	Micro-organismos	4
4	4		4	
Mobilidade	Fotólise	FBC X 2	Minhocas	4
4	4		4	
Adsorção	Biodegradabilidade x 2	4	Microcrustáceos	4
4	4		4	
Total	Total (peso 2)	Total (peso 2)	Algas	4
4	4	4	4	
			Peixes	4
			4	
			Aves	4
			4	
			Abelhas	4
			4	
			Oral (rato)	4
			4	

Classe - PPA	
36	CLASSE IV

Tabela Classes Ensaio

Frases de advertência

Portaria Normativa N. 84 (15/10/96) – IBAMA.

Anexo IV - **PARTE D – TOXICIDADE PARA ORGANISMOS NÃO-ALVO**

D.1 – Microorganismos.

D.2 – Algas.

D.3 – Organismos do solo (minhocas)

D.4 – Abelhas.

D.5 – Microcrustáceos. D.5.1 – Agudo. D.5.2 – Crônico

D.6 – Peixes. D.6.1 – Agudo. D.6.2 – Crônico.

D.7 – Bioconcentração em peixes.

D.8 – Aves. D.8.1 – Dose única. D.8.2 – Dieta. D.8.3 – Reprodução.

D.9 – Plantas. D.9.1 – Fitotoxicidade para plantas não-alvo

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS - IBAMA

MINTER

MINISTÉRIO DO INTERIOR

SEMA

SECRETARIA ESPECIAL DO MEIO AMBIENTE

MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS

NORMA
BRASILEIRA

ABNT NBR
12713

Terceira edição
19.11.2009

Válida a partir de
19.12.2009

**Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda —
Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea,
Cladocera)**

*Aquatic ecotoxicology – Acute Toxicity – Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea)*

<http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=57167>

TOXICIDADE AGUDA PARA *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea)

Número do teste no manual do IBAMA: D.2.1.

**OBJETIVO: Avaliar a toxicidade aguda para
Daphnia similis.**

FUNDAMENTO:

Exposição de neonatos por 48 horas.

ORGANISMO – TESTE:

Jovens com 6 a 24 horas de idade.

5 animais / tubo de ensaio, com 10 ml da solução com as concentrações testadas, mantidos em estante a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro.

TOXICIDADE AGUDA PARA *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea)

Número do teste no manual do IBAMA: D.2.1.

Organismo – Teste



TOXICIDADE AGUDA PARA *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) (IBAMA: D.2.1.)

CONTROLE DE QUALIDADE

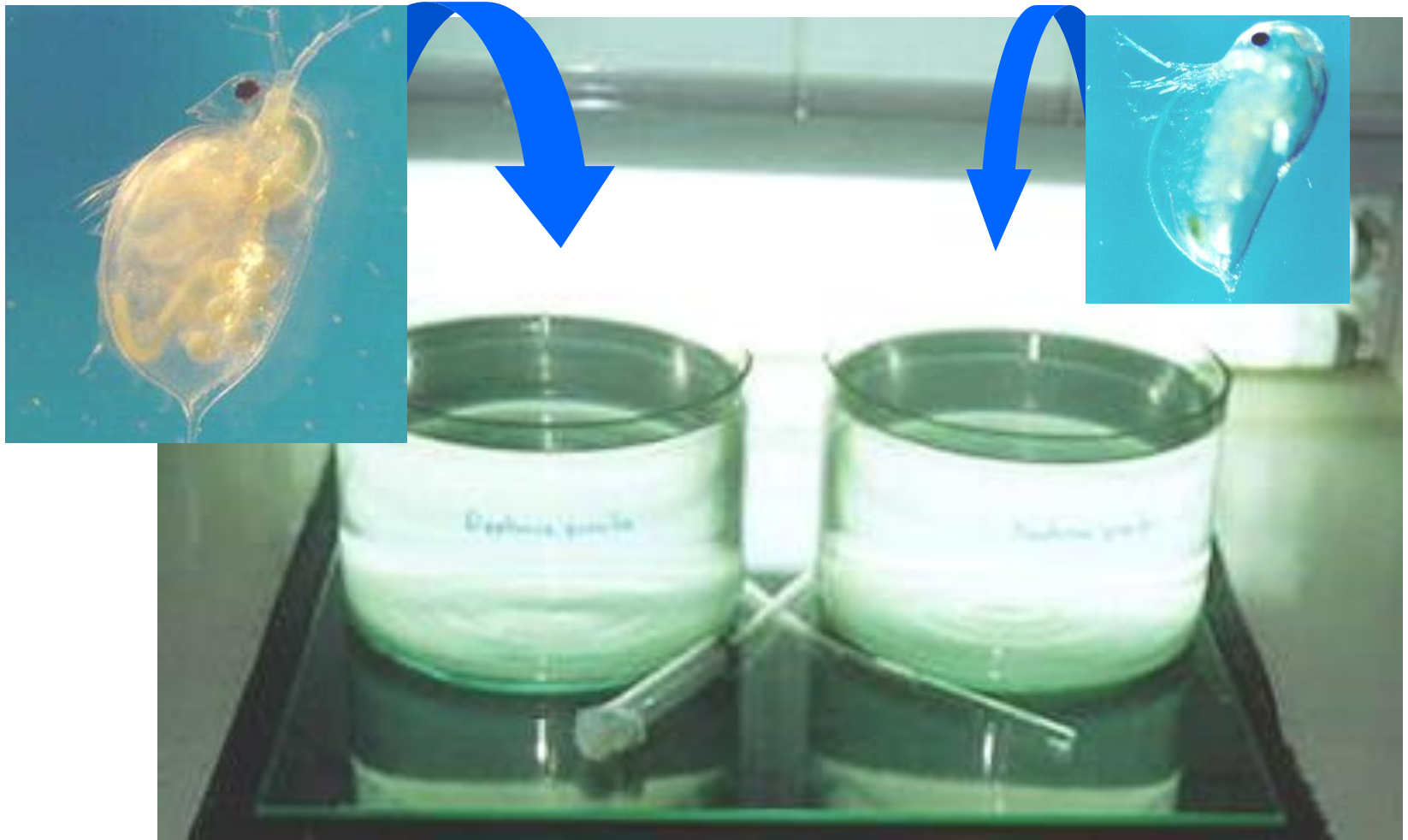
- < 10% imobilidade
testemunha
- 2 mg/L O₂ dissolvido
solução
- Temperatura deve ser
mantida a 20 ± 2° C
- CE (50-48h) - K₂Cr₂O₇ entre
0,04 a 0,17 mg/L



Organismo – Teste

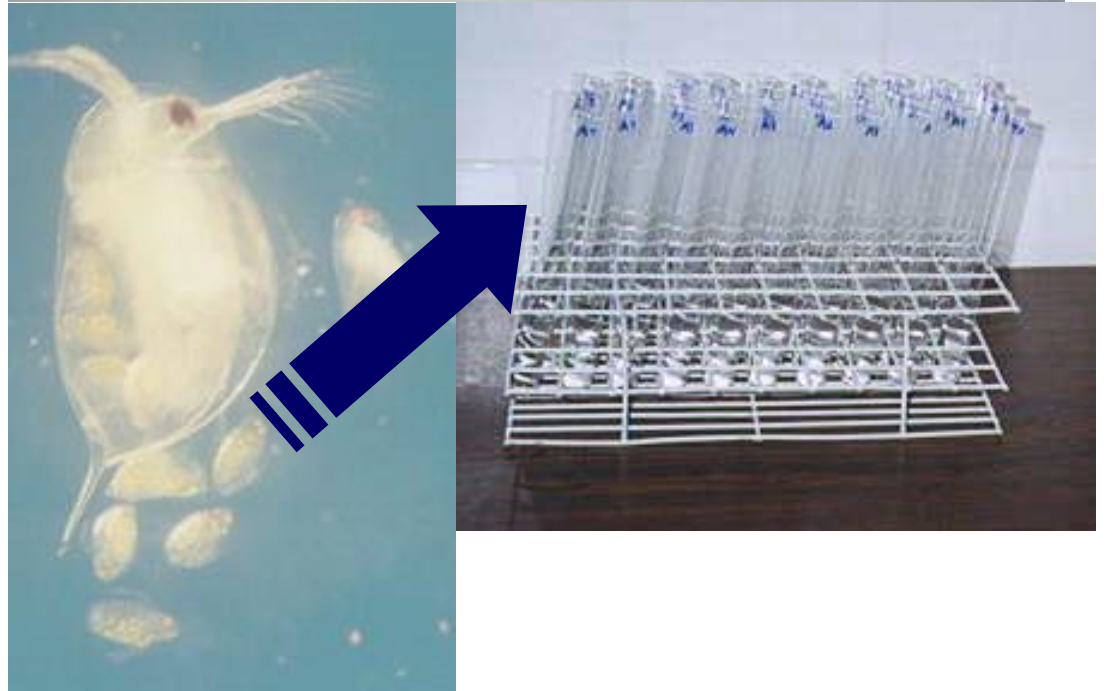
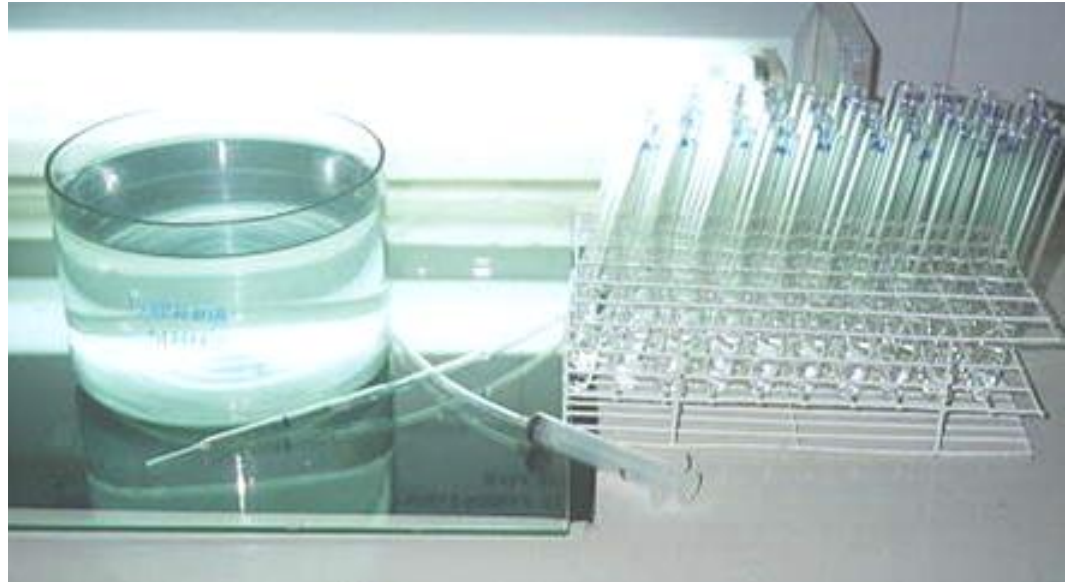
Cultivo de Daphnias

- **Cristalizadores de 4 L colocar 3 L água de cultivo:**
 - 40 *Daphnias* adultas e 40 com idade heterogênea.



Teste de sensibilidade ao $K_2Cr_2O_7$

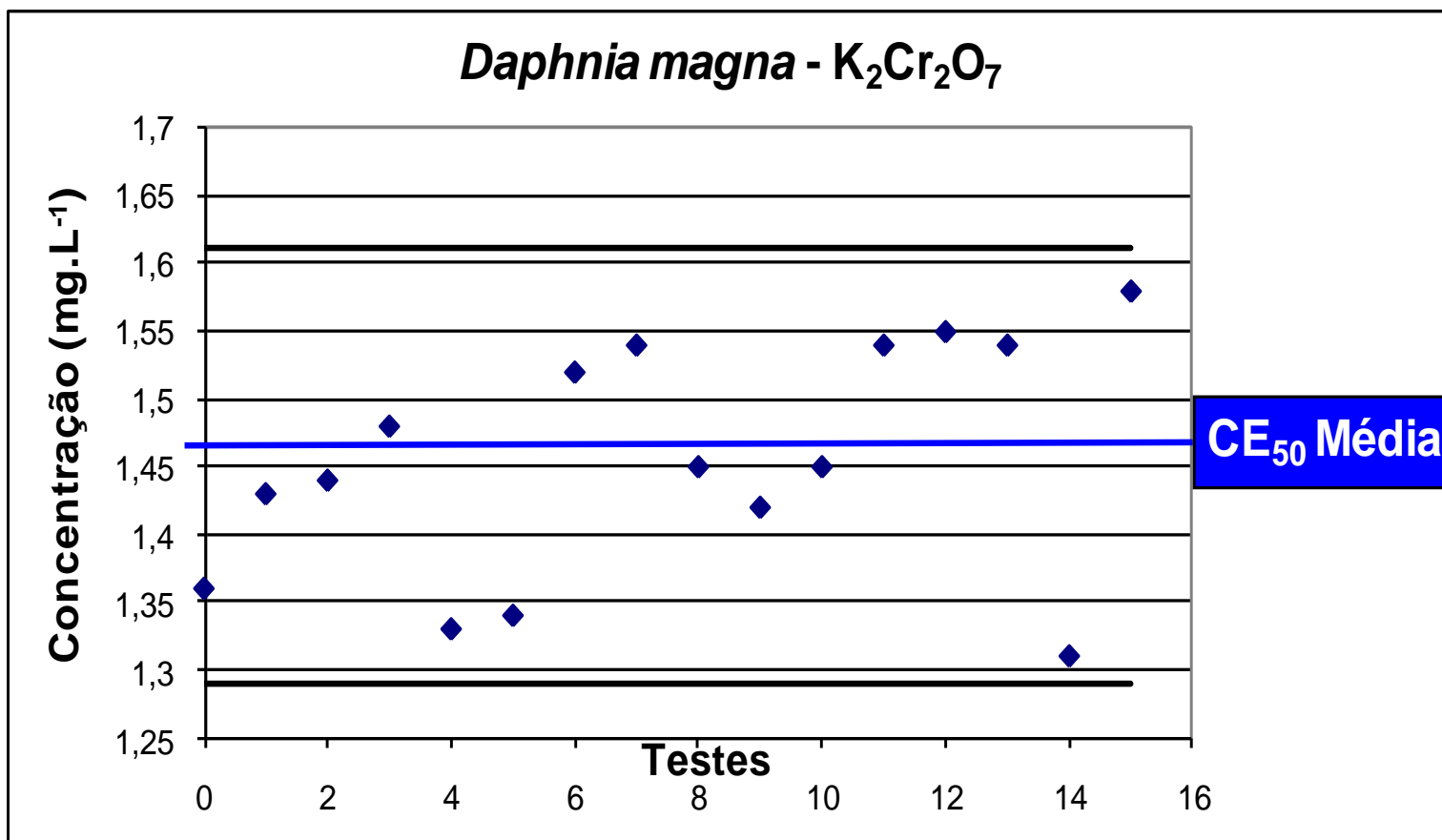
- **Completar para 10 mL com 1 mL de água de cultivo mais 5 neonatos.**
- **Deixar na câmara de bioensaios a $20 \pm 2^\circ C$ durante 24 h.**



TOXICIDADE AGUDA PARA *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea)

Número do teste no manual do IBAMA: D.2.1.

CONTROLE DE QUALIDADE: CE50, 48 h - $K_2Cr_2O_7$ entre 0,04 a 0,17 mg/L.



Organismos aquáticos - **Microcrustáceos**

CE50 (mg/L) - 48h

Informar valor	100
----------------	-----

Classificação	4
---------------	---

0	≤	x	<	1	1	Altamente tóxico
1	≤	x	<	10	2	Muito tóxico
10	≤	x	<	100	3	Medianamente tóxico
100	≤	x			4	Pouco tóxico

NORMAS DA ABNT PARA PEIXES

NBR 12.714 de 03/1993 - Ensaio de toxicidade com peixes - Parte I – Sistema estático.

NBR 12.715:1993 - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte II – Sistema semi-estáticos.

NBR 12.716:1993 - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte III – Sistema de fluxo contínuo.

NBR 15.088:2016– Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae).

NBR 15.499:2016 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes.

NORMA
BRASILEIRA

ABNT NBR
15088

PEIXES

CL50 (mg/L) - 96h		Organismos aquáticos - Peixes						
Informar valor	100	0	≤	x	<	1	1	Altamente tóxico
		1	≤	x	<	10	2	Muito tóxico
Classificação	4	10	≤	x	<	100	3	Medianamente tóxico
		100	≤	x			4	Pouco tóxico

Terceira edição
13.12.2016

**Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda —
Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*)**

*Aquatic ecotoxicology — Acute toxicity — Test with fish (*Cyprinidae*)*

NORMA
BRASILEIRA

ABNT NBR
15499

Terceira edição
08.04.2016

**Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de
curta duração — Método de ensaio com peixes**

Aquatic ecotoxicology — Short-term chronic toxicity — Test with fish

TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

OBJETIVO: Avaliar a toxicidade aguda para espécies de peixes.

FUNDAMENTO: Exposição de peixes a várias concentrações em sistema de fluxo contínuo por 96 h. **Determina-se a Concentração Letal Inicial Média - CL(I)50 - 96h .**



ACLIMATAÇÃO

TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONCENTRAÇÃO LETAL INICIAL MÉDIA - $CL(I)_{50-96h}$: Concentração nominal do agente químico que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos-teste em 96 h de exposição.

TESTE PRELIMINAR: Determinar o intervalo de dosagem letal (0 e 100%).

ESPÉCIES



Danio rerio
(Cyprinidae) - paulistinha



Poecilia reticulata
(Poeciliidae) - guarú

TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONTROLE DE QUALIDADE

Organismos-teste:

Lotes diferentes – fazer teste de toxicidade aguda com 24 h, com uma substância de referência.



Substância referência (ABNT NBR:15088, 2011):

Cloreto de sódio (NaCl)

Cloreto de potássio (KCl)

Sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Dodecil sulfato de sódio (DSS)

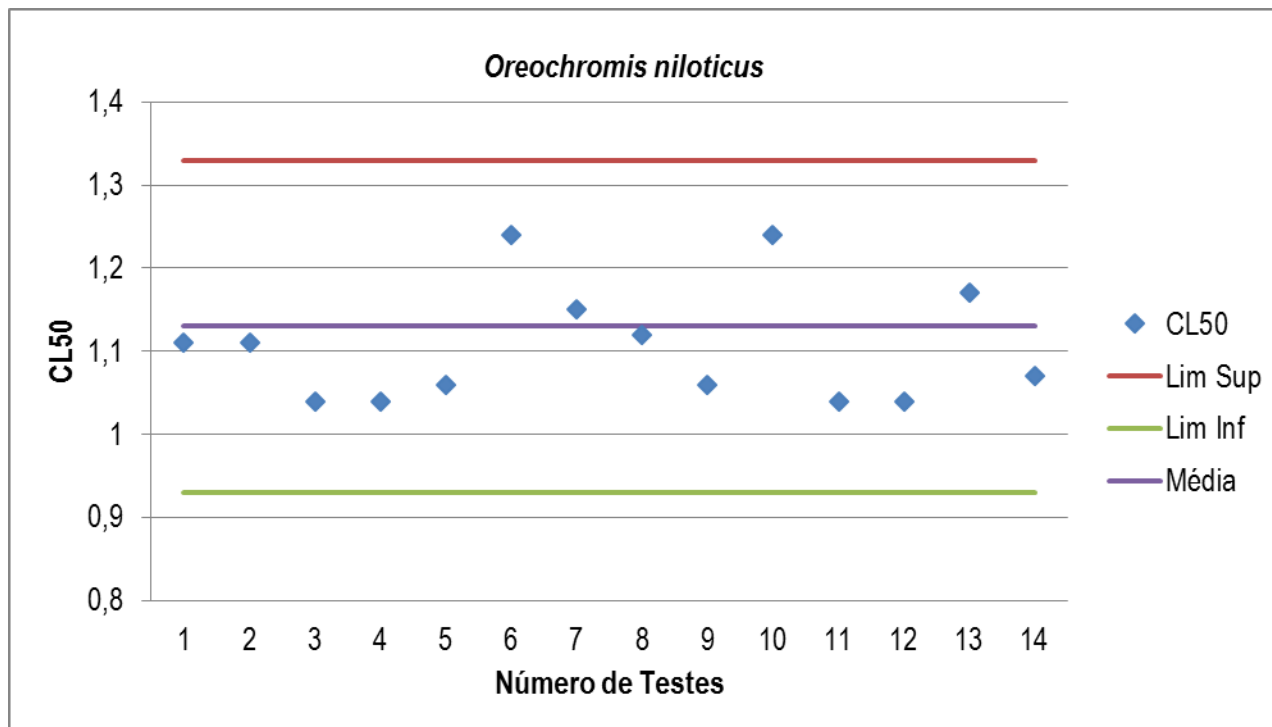
Dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Número do teste no manual do **IBAMA: D.3.1.**

CONTROLE DE QUALIDADE

Culturas de laboratório por longos períodos: fazer teste de toxicidade aguda 24 h pelo menos uma vez por mês. $CL(I)_{50-24h} = \pm 2$ d.p. em relação aos valores médios anteriores.



CL₅₀ Média

TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONTROLE DE QUALIDADE

Do Organismo-teste:

A letalidade e ou proporção de peixes com comportamento anormal no lote $< 5\%$ em 48 h antes do teste

Do teste:

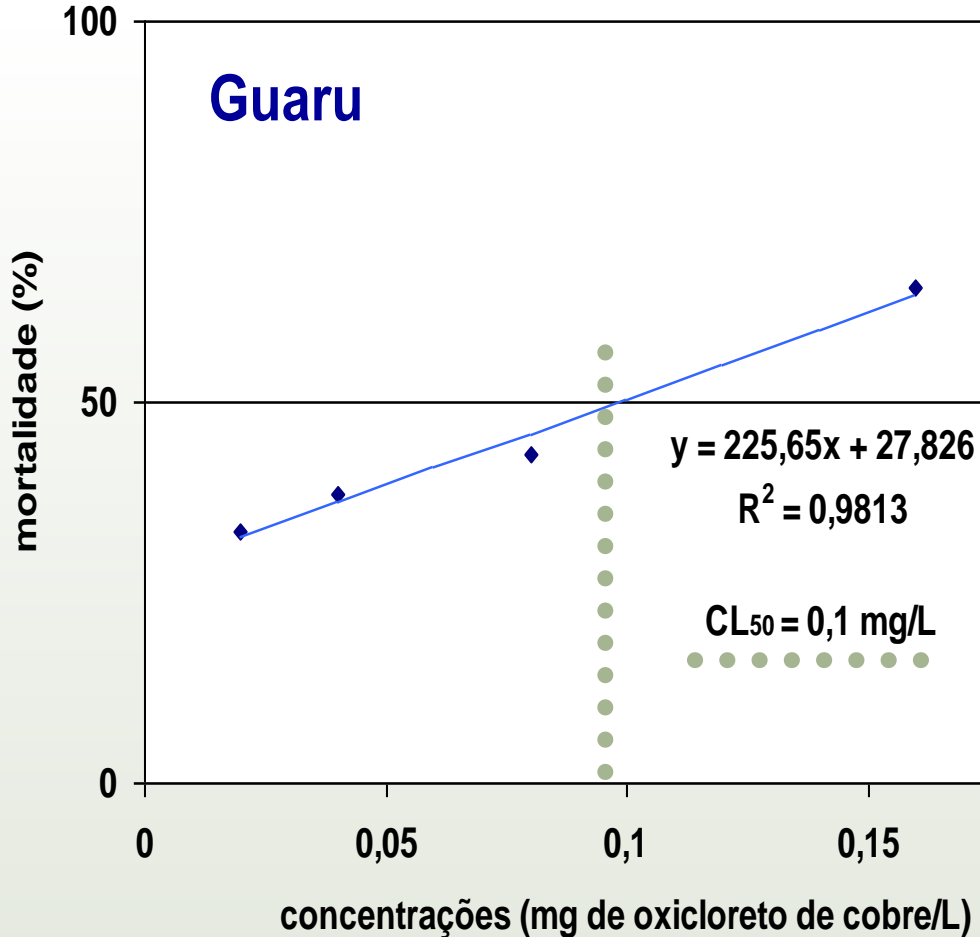
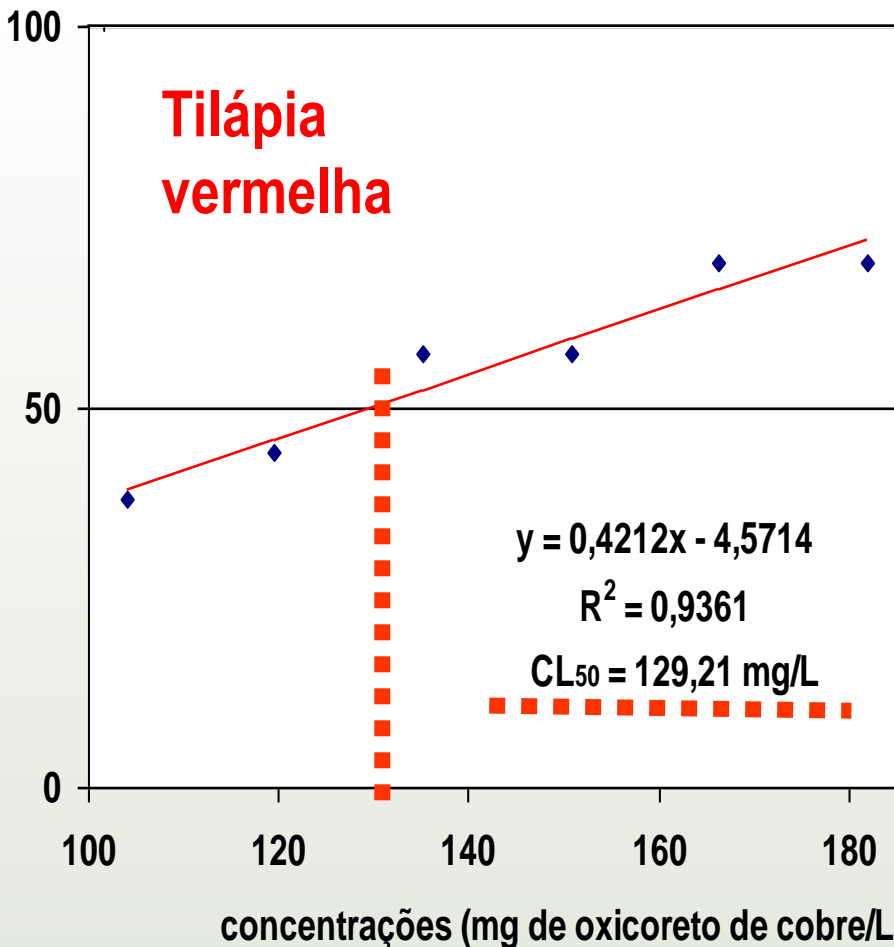
- O_2 dissolvido $\geq 40\%$ do valor da saturação H_2O
- Letalidade e ou comportamento anormal no controle $< 10\%$.



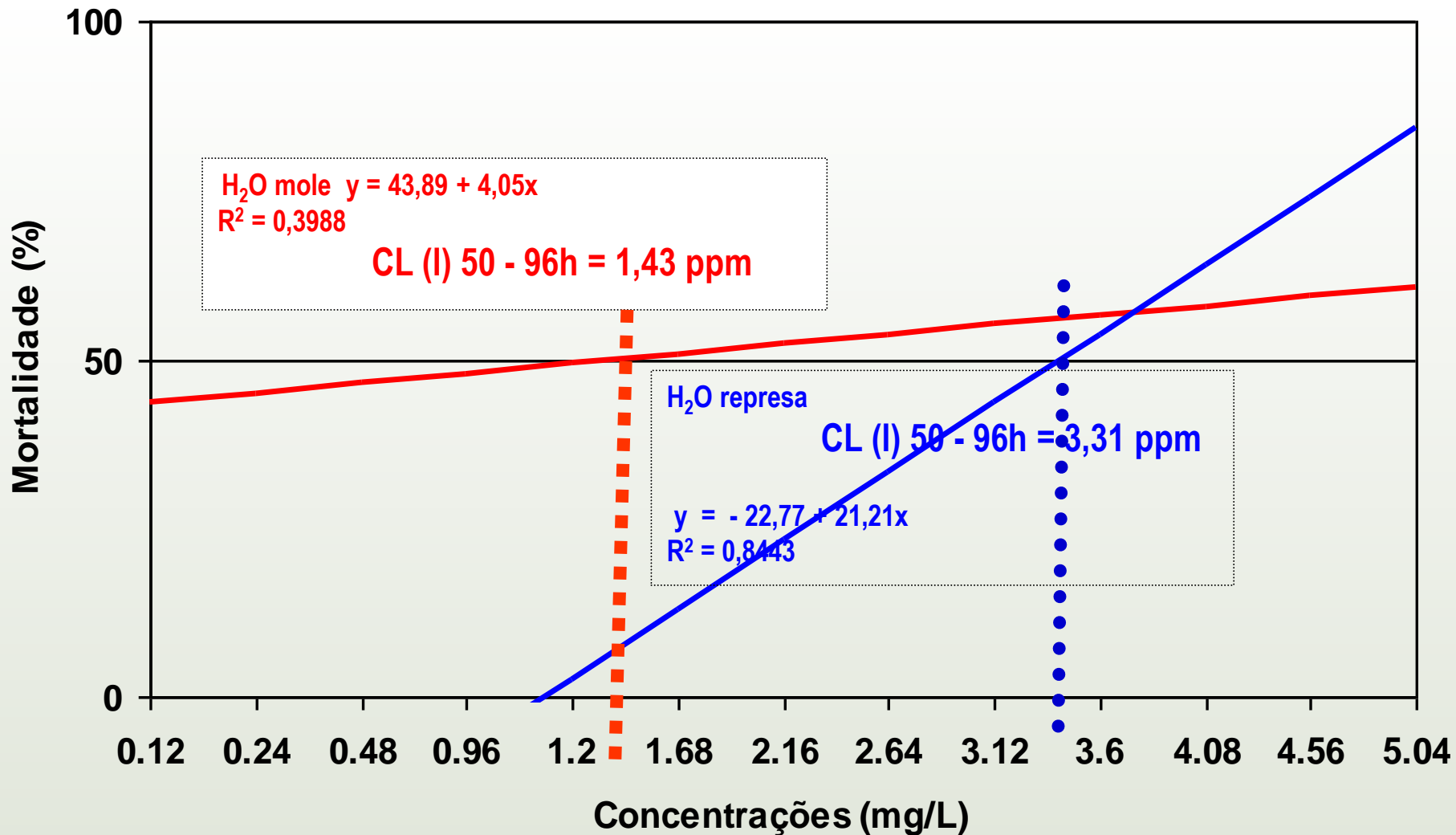
Aquário de aclimação de peixes em sala climatizada para testes de toxicidade de agrotóxicos.



Teste de toxicidade aguda de agrotóxicos para peixes em sala climatizada.



Curvas de regressão linear entre concentrações de oxicloreto de cobre e porcentagem de mortalidade de tilapia vermelha e guaru, em água mole (Boock, 1998).



Valores de cobre acumulado ($\mu\text{g/g}$) em tilápia vermelha e guaru durante o teste definitivo de toxicidade aguda de oxicloreto de cobre em 96 hs em águas mole (Boock, 1998).

Toxicidade aguda diferencial do **parathion methyl** para espécies aquáticas.

ESPÉCIE	EXP (h)	CL ₅₀ (mg/L)	Referência
<i>Brachydanio rerio</i>	96	2,26	WIJK & KRAAIJ (1994)
<i>Channa orientalis</i>	72	4,88	SHEREKAR & KULKARNI (1989)
<i>Daphnia magna</i>	24	0,009	KUNGOLOS et al. (1999)
<i>Daphnia magna</i>	48	0,002	KUNGOLOS et al. (1999)
<i>Fathead minnow</i>	96	8,90	POST (1987)
<i>Heteropneustes fossilis</i>	96	10,00	JAMES & SAMPATH (1994)
<i>Largemouth bass</i>	96	5,22	POST (1987)
<i>Neomysis mercedis</i>	96	0,20	BRANDT et al. (1993)
<i>Rainbow trout</i>	96	2,70	TOMILIN (1995)
<i>Rainbow trout</i>	96	2,75	POST (1987)
<i>Selenastrum sp</i>	48	0,047	KUNGOLOS et al. (1999)
<i>Tubifex tubifex</i>	96	0,60	SUSEELA et al. (1994)
<i>Vibrio fischeri</i>	48	2,20	KUNGOLOS et al. (1999)

TOXICIDADE CRÔNICA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.2.

OBJETIVO: Avaliar a toxicidade crônica de agentes químicos durante os estágios larvais de peixes.

FUNDAMENTO: Exposição de larvas de peixes recém-eclodidas, em sistema de fluxocontínuo por 7 dias.

Avalia-se os efeitos deletérios à sobrevivência e/ou crescimento (peso).

TOXICIDADE CRÔNICA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.2.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: Fotoperíodo de 11 h de luz, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fluxo contínuo, ou semi-estático (renovação da água em 24 h).

AVALIAÇÕES:

- **CONCENTRAÇÃO DE EFEITO NÃO OBSERVADO (CENO):**

É a maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução em 7 dias de exposição.

TOXICIDADE CRÔNICA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.2.

- **CONCENTRAÇÃO DE EFEITO OBSERVADO (CEO):**

É a menor concentração nominal do agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução em 7 dias de exposição.

- **VALOR CRÔNICO (VC):**

Média geométrica dos valores CENO e CEO.

- **CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE50) :**

Concentração nominal do produto que causa efeito deletério a 50% dos organismos-testes em um tempo de exposição.

TOXICIDADE CRÔNICA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONTROLE DE QUALIDADE:

Organismos-teste:

Lotes diferentes – fazer teste de toxicidade aguda com 24 h, com uma substância de referência.

Culturas de laboratório por longos períodos: fazer teste de toxicidade aguda 24 h pelo menos uma vez por mês.

CL(I)50 – 24h = ± 2 D.P. em relação aos valores médios anteriores.

TOXICIDADE CRÔNICA PARA PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONTROLE DE QUALIDADE:

Do Organismo-teste:

A letalidade e ou proporção de peixes com comportamento anormal no lote $< 5\%$ em 48 h antes do teste .

Do teste:

- O_2 dissolvido $\geq 40\%$ do valor da saturação H_2O .
- Letalidade e ou comportamento anormal no controle $< 20\%$.

BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.3.

OBJETIVO: Avaliar o grau de bioconcentração de agentes químicos em peixes.

FUNDAMENTO: Exposição de espécies de peixes autóctones durante um certo período de tempo.

O sistema de exposição pode ser estático (substâncias solúveis), semi-estático

(Solubilidade < 200 mg/L) ou de fluxo contínuo (Solubilidade < 1 mg/L).

CONDIÇÕES DO TESTE: Alimentação normal com ração seca, 1 g de peixe / L, fotoperíodo de 11 h de luz natural, temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

AVALIAÇÃO:

A intervalos regulares amostras de água e de peixes são coletados para acompanhar a assimilação da substância até a sua acumulação máxima, que é atingida no estado de equilíbrio.

Após esta fase, os peixes são transferidos para água limpa, para avaliação do grau de depuração da substância bioacumulada.

A partir destes dados é calculado o fator de bioconcentração e as concentrações de assimilação e depuração.



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
 DIRETORIA DE QUALIDADE AMBIENTAL
 COORDENAÇÃO-GERAL DE AVALIAÇÃO E CONTROLE DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
 COORDENAÇÃO DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL DE SUSBTÂNCIAS E PRODUTOS PERIGOSOS

Sistema de Classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental - PPA

Transporte	Persistência	Bioconcentração	Diversos organismos	
Solubilidade	Hidrólise	Log Kow	Micro-organismos	4
4	4		4	
Mobilidade	Fotólise	FBC X 2	Minhocas	4
4	4		4	
Adsorção	Biodegradabilidade x 2	4	Microcrustáceos	4
4	4		4	
Total	Total (peso 2)	Total (peso 2)	Algas	4
4	4	4	4	
			Peixes	4
			4	
			Aves	4
			4	
			Abelhas	4
			4	
			Oral (rato)	4
			4	

Classe - PPA	
36	CLASSE IV

Tabela Classes Ensaio

Frases de advertência

BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.3.

BIOCONCENTRAÇÃO: Aumento da concentração da substância no organismo vivo em relação à concentração na água.

ASSIMILAÇÃO: Processo de absorção da substância pelo organismo teste.

DEPURAÇÃO: Processo de eliminação da substância do organismo teste para o meio.

D.7 - Fator de Bioconcentração

FBC

Informar valor 0

Classificação 4

0	<	FBC	≤	10	4	Pouco ou não bioconcentrável
10	<	FBC	≤	100	3	Medianamente bioconcentrável
100	<	FBC	≤	1000	2	Muito bioconcentrável
1000	<	FBC			1	Altamente bioconcentrável

BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.3.

FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO (FB_c)

Razão entre a concentração da substância no organismo (C_p) e a concentração na água (C_a).

ESTADO DE EQUILÍBRIO:

Condição em que a concentração no organismo é constante em relação ao tempo exposição.

CONTROLE DE QUALIDADE:

- Menos de 10% de mortalidade na testemunha;**
- Variação de 1 °C na temperatura;**
- Oxigênio dissolvido na água pelo menos 3 mg/ L.**

BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONTROLE DE QUALIDADE:

Organismos-teste:

Lotes diferentes – fazer teste de toxicidade aguda com 24 h, com uma substância de referência.

Culturas de laboratório por longos períodos: fazer teste de toxicidade aguda 24 h pelo menos uma vez por mês.

$CL(I)_{50-24h} = \pm 2 \text{ D.P.} / \text{ aos valores médios anteriores.}$

BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES

Número do teste no manual do IBAMA: D.3.1.

CONTROLE DE QUALIDADE:

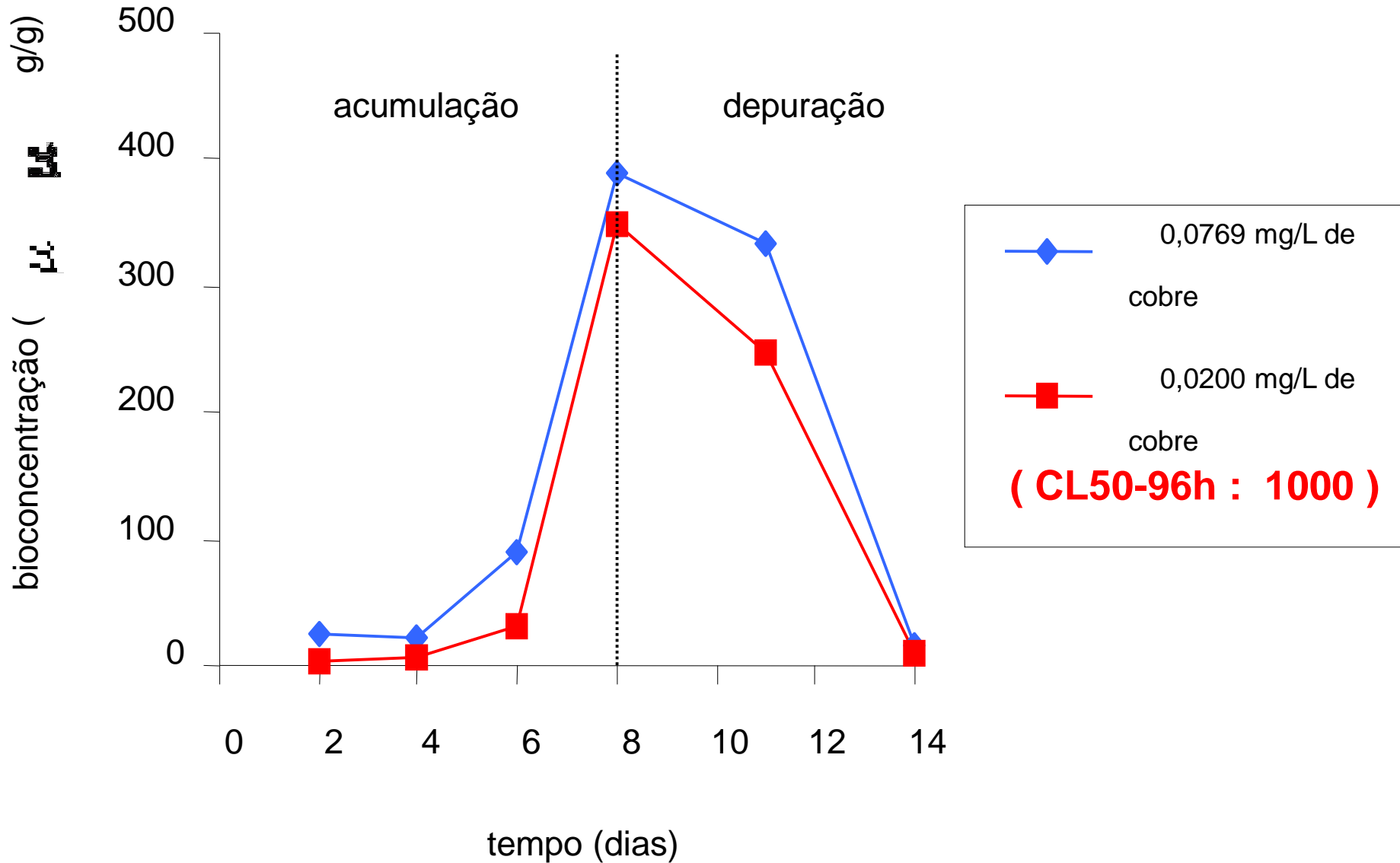
Do Organismo-teste:

A letalidade e ou proporção de peixes com comportamento anormal no lote $< 5\%$ em 48 h antes do teste .

Do teste:

- O_2 dissolvido $\geq 40\%$ do valor da saturação H_2O
- Letalidade e ou comportamento anormal no controle $< 10\%$.

BIOCONCENTRAÇÃO EM PEIXES



Bioconcentração e depuração do cátion Cu^{2+} em **TILÁPIA VERMELHA**, descontado os valores da testemunha (BOOCK, 1999).

10a. Aula – Ecotoxicologia aquática e Ensaio de ecotoxicidade de agrotóxicos para peixes e Daphnia

PRÁTICA: 1 - Avaliação do ensaio de toxicidade aguda de parathion metílico para minhocas.

D.3 - Organismos do solo (minhoca)						
CL50 14 dias (mg/kg-solo)						
Informar valor	1000					
Classificação	4					
0	≤	x	<	10	1	Altamente tóxico
10	≤	x	<	100	2	Muito tóxico
100	≤	x	<	1000	3	Medianamente tóxico
1000	≤	x			4	Pouco tóxico

2 – Instalação de ensaio de toxicidade aguda de agrotóxicos para os microrganismos do solo.

D.01 - Micro-organismos do solo	
Informar valor	4
Classificação	4
1	Produziu efeitos nas taxas de respiração e nitrogenação
4	Não produziu efeitos

Tratamentos

METHYL PARATHION (Folisuper®)

AREIA

- 1 – TESTEMUNHA
- 2 – 6 mg/kg substrato
- 3 – 12 mg/kg substrato
- 4 – 18 mg/kg substrato
- 5 – 24 mg/kg substrato

Tratamentos

METHYL PARATHION (Folisuper®)

ARGILOSO

- 6- TESTEMUNHA
- 7 – 60 mg/kg substrato
- 8 – 120 mg/kg substrato
- 9 – 180 mg/kg substrato
- 10 – 240 mg/kg substrato

Tratamentos

METHYL PARATHION (Folisuper®)

SOLO ORGÂNICO

- 10- TESTEMUNHA
- 11 – 60 mg/kg substrato
- 12 - 80 mg/kg substrato
- 13 – 160 mg/kg substrato
- 14 – 240 mg/kg substrato
- 15 – 320 mg/kg substrato





***PRÁTICA: Instalação de um teste de toxicidade de agrotóxicos
para minhocas***

AVALIAÇÃO - 14 DIAS DE EXPOSIÇÃO

- 1 - Abrir os sacos plásticos e despejar o substrato sobre uma folha de jornal***
- 2 - Procurar e separar as minhocas vivas – contar***
- 3 - Pesquisar as minhocas vivas encontradas em cada saco plástico.***
- 4 - Calcular a $CL(I)_{50}$ e a redução no peso médio dos animais.***



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
 DIRETORIA DE QUALIDADE AMBIENTAL
 COORDENAÇÃO-GERAL DE AVALIAÇÃO E CONTROLE DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
 COORDENAÇÃO DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL DE SUSBTÂNCIAS E PRODUTOS PERIGOSOS

Sistema de Classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental - PPA

Transporte	Persistência	Bioconcentração	Diversos organismos	
Solubilidade	Hidrólise	Log Kow	Micro-organismos	4
4	4		4	
Mobilidade	Fotólise	FBC X 2	Minhocas	4
4	4		4	
Adsorção	Biodegradabilidade x 2	4	Microcrustáceos	4
4	4		4	
Total	Total (peso 2)	Total (peso 2)	Algas	4
4	4	4	4	
			Peixes	4
			4	
			Aves	4
			4	
			Abelhas	4
			4	
			Oral (rato)	4
			4	

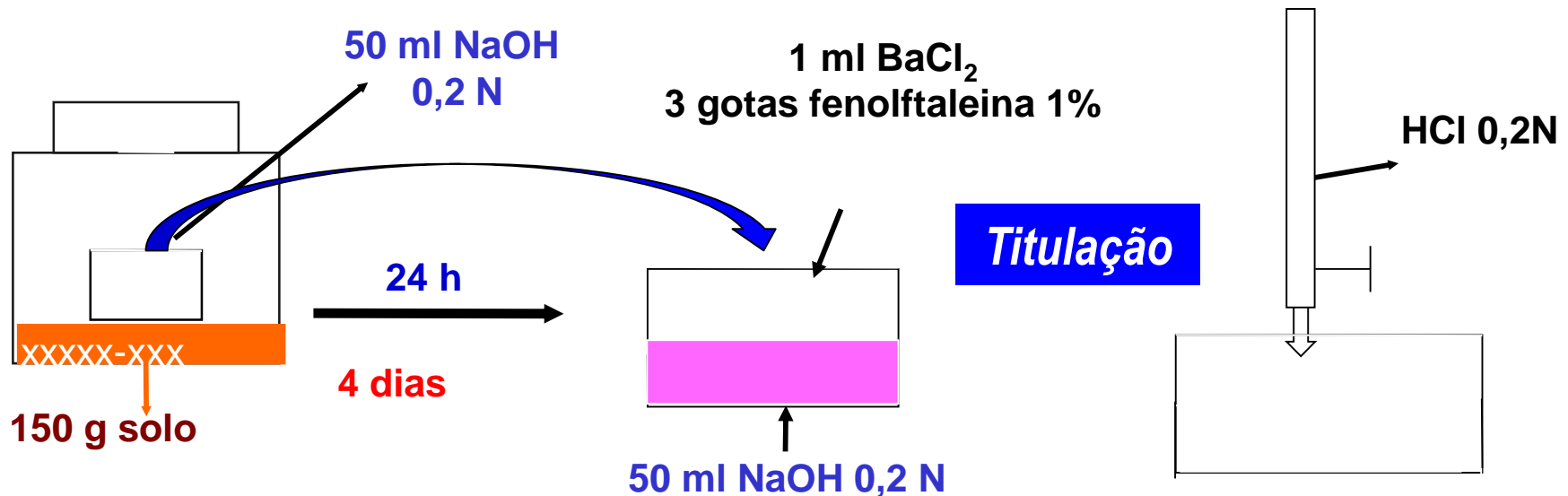
Classe - PPA	
36	CLASSE IV

Tabela Classes Ensaio

Frases de advertência

Teste sobre efeitos de agrotóxicos sobre os microrganismos do solo, por meio da avaliação da evolução de CO₂ do solo.

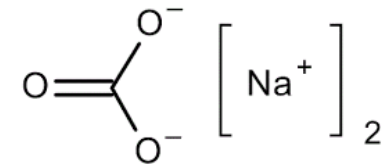
II INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO



PRINCÍPIO DO MÉTODO



80 mg NaOH reage com 44 mg CO₂



PRÁTICA:

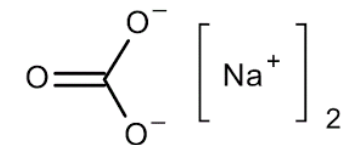
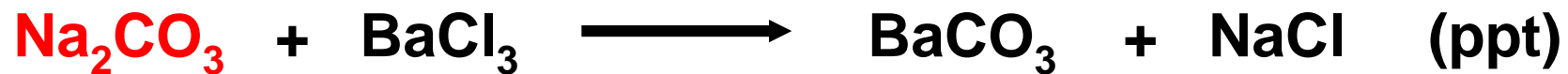
2 – Teste sobre efeitos de agrotóxicos sobre os microrganismos do solo, por meio da avaliação da evolução de CO₂ do solo.

TITULAÇÃO

HCl 0,2 N reage com NaOH que não reagiu com o CO₂ interno



HCl também reage com Na₂CO₃ ANTES de reagir com BaCl₂



2 – Teste sobre efeitos de agrotóxicos sobre os microrganismos do solo, por meio da avaliação da evolução de CO₂ do solo.

TITULAÇÃO

Exemplo: Se gastou 13 mL de HCl na titulação.

Então supõe-se que 37 mL de NaOH reagiu com o CO₂ evoluído do solo

CÁLCULOS: 1 mL NaOH 0,2 N → 8 mg
37 mL → 296 mg

Na Reação → 80 mg NaOH reagem com 44 mg de CO₂

Então: 296 mg NaOH reagiu com 162,8 mg de CO₂

Evolução do CO₂ do solo = 162,8 mg / dia / 150 g de solo

Z = ← 100 g de solo

Z = 108,53 mg de CO₂ / 100 g de solo / dia

Teste sobre efeitos de agrotóxicos sobre os microrganismos do solo, por meio da avaliação da evolução de CO₂ do solo.

Tratamentos

- 1- **CONTROLE - Branco**
- 2 - **CONTROLE - Solo úmido**
- 3 - **CONTROLE - Solo ativado com C/N**
- 4 - **PrioriXtra - 0,5 L p.c./ha C/N**
- 5 - **PrioriXtra - 5,0 L p.c./ha C/N**
- 6 - **PrioriXtra - 50,0 L p.c./ha C/N**
- 7 - **MSMA Sanachem 720 - 4,0 kg/ha**
- 8 - **MSMA Sanachem 720 - 40,0 kg/ha**
- 9 - **MSMA Sanachem 720 - 400,0 kg/ha**
- 10 - **MSMA Sanachem 720 - 4,0 kg/ha C/N**
- 11 - **MSMA Sanachem 720 - 40,0 kg/ha C/N**
- 12 - **MSMA Sanachem 720 - 400,0 kg/ha C/N**

AGROTÓXICOS: DOSAGEM:

C = 0,25% de glucose (p/p solo) - fonte de Carbono

N = 0,012% de NH₄NO₃ (p/p solo) – fonte de Nitrogênio

Solo argiloso: densidade = 1,2. Profund. solo = 2,5 cm

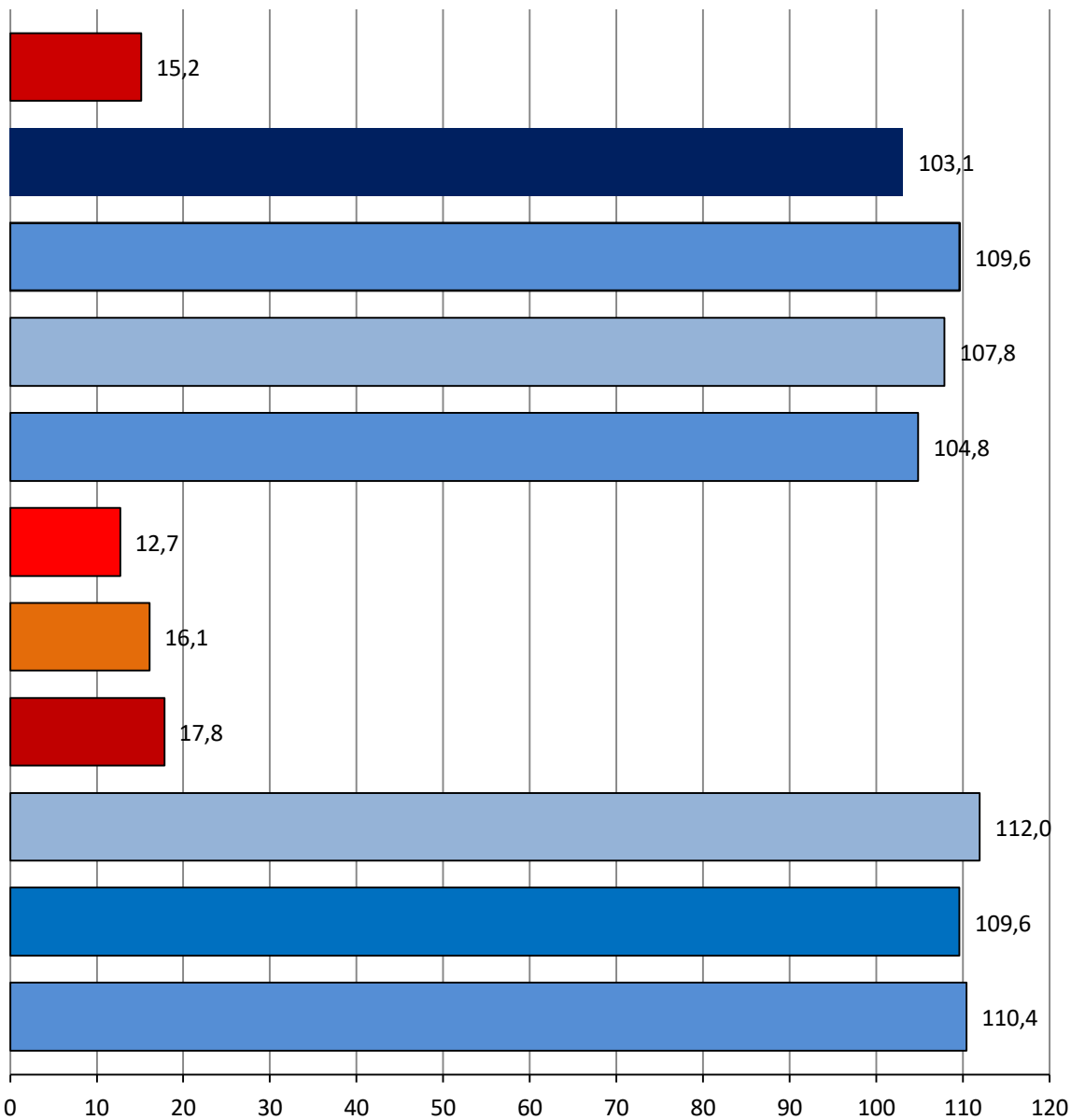
PRÁTICA:

2 – Teste sobre efeitos de agrotóxicos sobre os microrganismos do solo, por meio da avaliação da evolução de CO₂ do solo.

TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS PARA OS MICRORGANISMOS DO SOLO, AVALIADA PELA EVOLUÇÃO DE CO₂.

VALORES EM ML DE HCl GASTOS NA TITULAÇÃO COM NaOH

Tratamentos	A	B	C	Média
1- CONTROLE - Branco				
2 - CONTROLE - Solo úmido				
3 - CONTROLE - Solo ativado com C/N				
4 - PrioriXtra - 0,5 L p.c./ha C/N				
5 - PrioriXtra - 5,0 L p.c./ha C/N				
6 - PrioriXtra - 50,0 L p.c./ha C/N				
7 - MSMA Sanachem 720 - 4,0 kg/ha				
8 - MSMA Sanachem 720 - 40,0 kg/ha				
9 - MSMA Sanachem 720 - 400,0 kg/ha				
10 - MSMA Sanachem 720 - 4,0 kg/ha C/N				
11 - MSMA Sanachem 720 - 40,0 kg/ha C/N				
12 - MSMA Sanachem 720 - 400,0 kg/ha C/N				



- **2 - Test - Solo úmido**
- **3 - Test - solo ativado com C/N**
- **4 - PrioriXtra - 0,5 L p.c./ha C/N**
- **5 - PrioriXtra - 5,0 L p.c./ha C/N**
- **6 - PrioriXtra - 50,0 L p.c./ha C/N**
- **7 - MSMA Sanachem 720 - 4,0 kg/ha**
- **8 - MSMA Sanachem 720 - 40,0 kg/ha**
- **9 - MSMA Sanachem 720 - 400,0 kg/ha**
- **10 - MSMA Sanachem 720 - 4,0 kg/ha C/N**
- **11 - MSMA Sanachem 720 - 40,0 kg/ha C/N**
- **12 - MSMA Sanachem 720 - 400,0 kg/ha C/N**

mg de CO₂ evoluído por 100 g de solo em 3 Dias